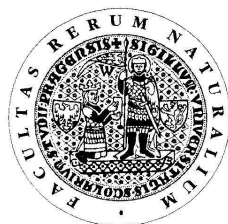


Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Jaroslava Zavázalová

**ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE AMINODERIVÁTŮ NAFTALENU A
BIFENYLU NA PLATINOVÝCH ELEKTRODÁCH**

The electrochemical detection of amino derivatives of naphthalene and biphenyl
using platinum electrodes

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Karolina Pecková, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

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

V Praze, 12. 5. 2011

Bc. Jaroslava Zavázalová

Tato práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2009 – 2011 a byla finančně podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekty LC 06035, MSM 0021620857 a RP 14/63), Technologickou agenturou České republiky (projekt TA01020565), projektem SVV 2011-263204 a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (projekt 92010).

Velmi ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Karolině Peckové, Ph.D. a své konzultantce Mgr. Haně Dejmkové za výborné vedení mé práce po spletité cestě chemické, jejíž konec se na začátku zdál být v nedohlednu. Děkuji za trpělivost při všech konzultacích a za čas, který mi věnovaly. Děkuji ostatním členům Katedry analytické chemie za vřelý přístup a ochotu, se kterou mi poskytovali pomoc.

Dále bych ráda poděkovala svým rodičům za důvěru, kterou do mě vložili a za vytvoření podmínek pro studium na vysoké škole. Díky patří i mému příteli Jiřímu za veškerou podporu, kterou mi každý den poskytoval.

Abstrakt

Tato práce se zabývá studiem elektrochemické detekce genotoxických aminoderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků s využitím platinových elektrod, konkrétně se jedná o 2-aminobifenyl, 4-aminobifenyl, 1-aminonaftalen a 2-aminonaftalen.

Stacionární disková platinová elektroda neposkytuje pro vsádkovou voltametrickou analýzu spolehlivé výsledky vzhledem k předpokládaným problémům s pasivací elektrodového povrchu.

Platinová mikrocyklindrická elektroda byla použita jako pracovní elektroda ampérometrického detektoru v HPLC. Byla optimalizována metoda stanovení a určeny meze stanovitelnosti: $1,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ pro 2-aminobifenyl, $8,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ pro 4-aminobifenyl, $3,8 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ pro 1-aminonaftalen a $4,8 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ pro 2-aminonaftalen. V porovnání s platinovým tubulárním detektorem je mikrocyklindrický detektor méně citlivý.

Dále byla navržena metoda pro stanovení studovaných látek v moči s využitím předběžné separace a prekoncentrace studovaných analytů pomocí extrakce na tuhé fázi, která byla použita pro analýzu reálného vzorku moči kuřáka.

Abstract

This thesis is focused on the electrochemical detection of genotoxic organic compounds, concretely 2-aminobiphenyl, 4-aminobiphenyl, 1-aminonaphthalene, and 2-aminonaphthalene using stationary platinum disk electrode.

Stationary platinum disc electrode provides for batch voltammetric methods unconvincing results due to presumed passivation of the electrode surface.

Microcylindric platinum electrode was used as working electrode for amperometric detector in HPLC. The method for the determination of tested analytes was optimized and limits of quantitation were determined: $1,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ for 2-aminobiphenyl, $8,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ for 4-aminobiphenyl, $3,8 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ for 1-aminonaphthalene and $4,8 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ for 2-aminonaphthalene.

In comparison with the platinum tubular detector is the microcylindrical detector less sensitive.

Further, a method for the determination of the studied compounds in urine was proposed using a preliminary separation and preconcentration of the studied analytes using solid phase extraction. The method was used for the analysis of real urine sample of a heavy smoker.

Předmětová hesla:

genotoxické sloučeniny

extrakce

elektrochemie

průtokové systémy

Klíčová slova:

aminoderiváty bifenyly

aminoderiváty naftalenu

voltametrie

vysokoučinná kapalinová chromatografie

elektrochemická detekce

platinová disková elektroda

extrakce na tuhé fázi

Obsah

Seznam použitých zkratk	9
1. Úvod	10
1.1 Cíl práce	10
1.2 Biologické účinky, vznik a výskyt aminoderivátů bifenyly a naftalenu	11
1.3 Metody stanovení derivátů bifenyly a naftalenu	11
1.4 Konstrukce ampérometrických detektorů	12
1.5 Extrakční metody pro aminoaromáty	14
2. Experimentální část	16
2.1 Studované látky a ostatní chemikálie	16
2.2 Přehled studovaných látek	17
2.3 Aparatura	18
2.3.1 Voltametrické techniky	18
2.3.2 Chromatografická aparatura	19
2.3.3 Extrakce na tuhé fázi	19
2.4 Pracovní postupy	20
2.4.1 Voltametrická měření	20
2.4.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí	20
2.4.3 Extrakce na tuhé fázi	21
2.4.4 Kalibrační závislosti	22
2.5 Použité vzorce	23
3. Výsledky a diskuze	24
3.1 Voltametrická měření	24
3.1.1 Cyklická voltametrie	25
3.1.2 Diferenční pulsní voltametrie	27
3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí	35
3.2.1 Vliv potenciálu vkládaného na platinovou mikrocyklrickou elektrodu	35
3.2.2 Vliv průtokové rychlosti mobilní fáze	37
3.2.3 Kalibrační závislosti	39
3.2.4 Porovnání použitých detektorů	43
3.3 Extrakce na tuhé fázi	46
3.2.1 Optimalizace extrakčních podmínek	46

3.2.2 Kalibrační závislosti	48
3.2.2.1 Platinová tubulární elektroda jako pracovní elektroda	48
3.2.2.2 Platinová mikrocylindrická elektroda jako pracovní elektroda	51
3.2.3 Reálný vzorek moči	54
4. Závěr	56
5. Literatura.....	57

Seznam použitých zkratek

2-AB	2-aminobifenyl
4-AB	4-aminobifenyl
1-AN	1-aminonaftalen
2-AN	2-aminonaftalen
APAH	aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků
BDD (BDDFE)	bórem dopovaná diamantová (filmová) elektroda
BR pufr	Brittonův – Robinsonův pufru
c	molární koncentrace
C.A.S.	Chemical Abstract Services
CV	cyklická voltametrie
DPV	diferenční pulsní voltametrie
E	potenciál
$E_{poč}$	potenciál, od kterého začíná měření při cyklické voltametrii
ED	elektrochemická detekce
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
I	proud
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
k	retenční faktor
L_D, L_Q	mez detekce, mez stanovitelnosti
LLE	extrakce kapalina – kapalina
M_r	relativní molární hmotnost
N	počet teoretických pater
p.a.	pro analýzu
Q	průtoková rychlost mobilní fáze
$R_{1,2}$	rozlišení píků
RSD	relativní směrodatná odchylka
SPE	extrakce na tuhé fázi
t	čas
t_r, t_M	retenční čas, mrtvý čas
w	šířka píku při základně
$w_{0,5}$	šířka píku v polovině jeho výšky

1. Úvod

1.1 Cíl práce

Tato diplomová práce byla vypracována v rámci širšího projektu věnovaného metodám stanovení genotoxických organických sloučenin, který probíhá v UNESCO laboratoři elektrochemie životního prostředí. Hlavním cílem bylo ukázat možnosti využití platinových elektrod ve vsádkové analýze a v průtoku pro detekci genotoxických aminoderivátů bifenyly a naftalenu.

Dílčím cílem této diplomové práce bylo charakterizovat elektrochemické chování studovaných aminoaromátů, konkrétně 2-aminobifenyly (2-AB), 4-aminobifenyly (4-AB), 1-aminonaftalenu (1-AN) a 2-aminonaftalenu (2-AN) na stacionární platinové diskové elektrodě metodou cyklické voltametrie a diferenční pulsní voltametrie a ověřit, zda dochází ve vsádkovém uspořádání k pasivaci elektrodového povrchu.

Dalším cílem bylo otestovat ampérometrický detektor s platinovou mikrocyklindrickou elektrodou v průtoku pro stanovení směsi výše uvedených analytů po jejich separaci metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na reverzní fázi a porovnat parametry tohoto detektoru s ampérometrickým platinovým tubulárním detektorem

Dílčím cílem byl také návrh metody pro stanovení studovaných látek v moči s využitím předběžné separace a prekoncentrace studovaných analytů pomocí extrakce na tuhé fázi a metodu využít k analýze reálných vzorků moči kuřáka.

1.2 Biologické účinky, vznik a výskyt aminoderivátů bifenyly a naftalenu

Stanovované analyty patří mezi aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků (APAH), významných polutantů životního prostředí. Polycyklickým aromatickým uhlovodíkům jsou přisuzovány karcinogenní, mutagenní a teratogenní účinky. 4-AB byl zařazen mezi prokázané karcinogeny (dle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) skupina 1, látky prokazatelně karcinogenní pro člověka)¹. Kromě prokázané karcinogenity je 4-AB také vysoce mutagenní^{2, 3}. U 2-AB mutagenita prokázána nebyla⁴. 2-AN je prokázaný karcinogen (skupina 1)⁵. U 1-AN byly prokázány slabé mutagenní účinky⁶ (dle IARC skupina 3, není možno klasifikovat jako karcinogenní pro člověka⁷).

Do životního prostředí se tyto látky dostávají různými cestami, často spojenými s lidskou činností – používají se v průmyslu při výrobě barviv, odkud může k rozšíření dojít z odpadu při výrobě nebo prostřednictvím finálních výrobků^{8, 9}, což je o to závažnější, že mezi těmito barvivy jsou i barviva potravinářská^{10, 11} nebo barviva používaná v kosmetice¹². Dále vznikají při tepelné úpravě potravin¹³. V organismu vznikají metabolizací příslušných nitroderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků^{14, 15}, které se vyskytují ve znečištěném ovzduší^{16, 17}, včetně tabákového dýmu¹⁸. Další informace týkající se biologických účinků, vzniku a výskytu derivátů bifenyly a naftalenu jsou shrnuty v bakalářské práci¹⁹ v oddíle 1.2.

1.3 Metody stanovení derivátů bifenyly a naftalenu

Vlastnosti APAH umožňují využívat k jejich analýze široké spektrum metod. Kromě spektrometrických²⁰ jsou významné metody přímé elektrochemie, zejména voltametrie, těžící z přítomnosti oxidovatelné aminoskupiny^{21, 22}. Nejčastějšími však stále zůstávají metody chromatografické, také s ohledem na komplikované matrice, ve kterých jsou stanovení prováděna^{10, 23}. Elektrochemie nám však i zde může být užitečná jakožto selektivní a citlivý způsob detekce^{24, 25}. Bylo vyvinuto množství analytických metod pro stanovení aminobifenyly a aminonaftalenu v potravinářských barvivech, nápojích, bonbónech^{10, 11, 26} a v prstových barvách²⁷. Pro stanovení je možné použít kapilární

elektroforézu^{28,29}. Běžně používaná je plynová chromatografie^{30,31,32,33}. Ostatní průtokové metody, jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie a průtoková injekční analýza, mají také své zastoupení a nabízejí několik možných detekčních způsobů např. spektrofotometrickou^{32,34} nebo MS detekci¹². Elektrochemická detekce může být použita pro kapilární elektroforézu³⁵, průtokovou injekční analýzu^{36,37} a pro HPLC^{38,39}. Využití ampérometrické detekce v HPLC je proto perspektivním směrem analýzy APAH.

1.4 Konstrukce ampérometrických detektorů

Konstrukce ampérometrických detektorů pro kapalinovou chromatografii by měla vyhovět chromatografickým a elektrochemickým požadavkům na geometrii detekčních cel. Miniaturizací vlastního detekčního prostoru lze předcházet zbytečnému rozmývání zóny analytu, avšak upořádání by mělo být takové, aby zaručilo homogenní elektrické pole mezi pracovní a pomocnou elektrodou a zároveň co nejbližší umístění referentní elektrody, což je podmínkou pro udržení definovaného potenciálu na pracovní elektrodě při ampérometrické detekci^{40,41}. Nejběžnějším typem uspořádání ampérometrických detektorů je tenkovrstvé, „wall-jet“ a tubulární.

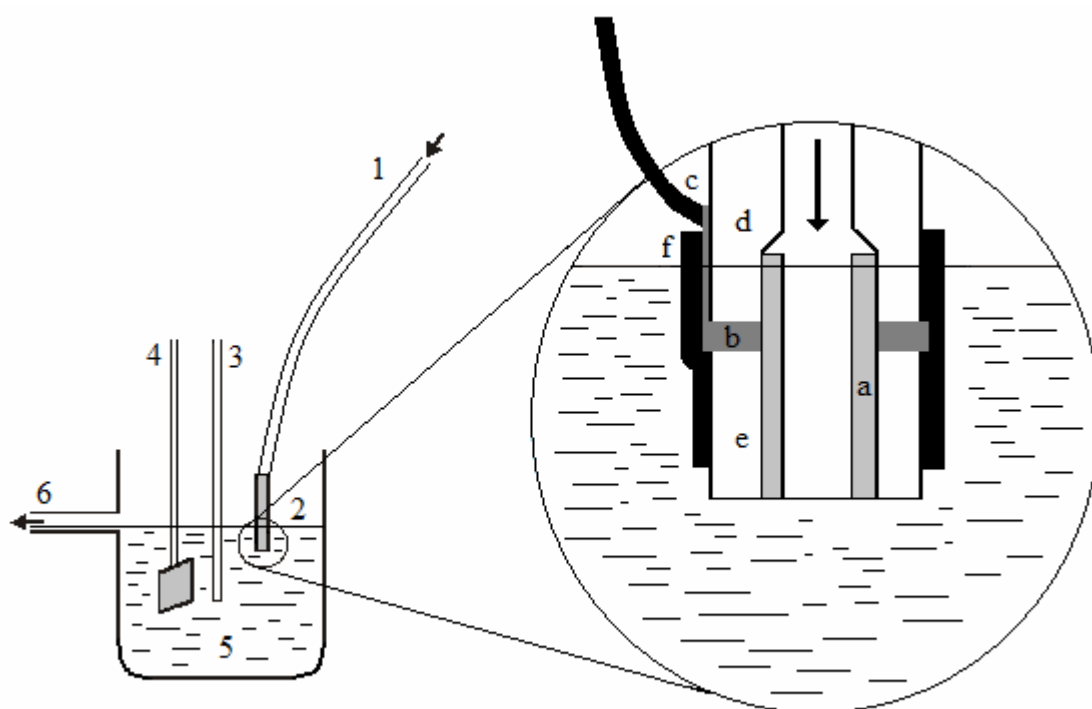
V této práci byl používán ampérometrický detektor s pracovní platinovou tubulární a platinovou mikrocyklindrickou elektrodou.

Konstrukce platinového tubulárního detektoru, navržená Cvačkou⁴¹, je popsána v bakalářské práci¹⁹ spolu s příklady dalších uspořádání ampérometrických tubulárních detektorů. Pracovní elektroda je umístěna přímo v kapiláře napojené na vývod z kolony a tato kapilára je spolu s referentní a pomocnou elektrodou ponořena v přepadové nádobce s mobilní fází. Schéma uspořádání ampérometrického tubulárního detektoru je znázorněno na obr. 1.1.

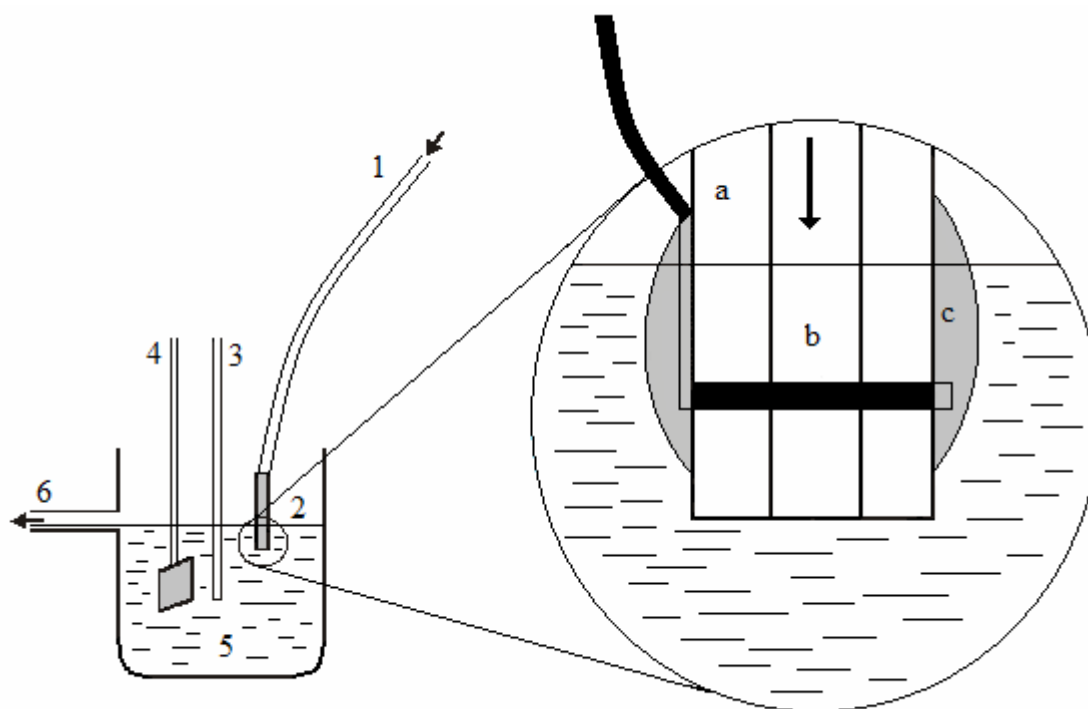
Obdobně v případě ampérometrického detektoru s platinovou mikrocyklindrickou elektrodou použitého v této diplomové práci je indikační elektroda umístěna v odtokové kapiláře z kolony⁴² (obr. 1.2) a postup její konstrukce byl následující: Teflonová kapilára (vnitřní průměr 0,5 mm) byla příčně propíchnuta ostrou jehlou a vzniklým otvorem byl protažen tenký drátek z platiny (průměr 0,1 mm). Přes část teflonové kapiláry s vyvedeným kontaktem byla přetažena teplem se stahující izolace a pomocí horkovzdušné pistole utěsněna tak, aby nedocházelo k nežádoucímu kontaktu s roztokem. Drátek byl v kapiláře zafixován tavným lepidlem, které zároveň izolovalo drátek na bocích kapiláry od styku s roztokem. Do kontaktu s analytem tedy přichází pouze část drátku uvnitř teflonové

kapiláry. Na druhý konec teflonové kapiláry byl nasazen průchozí šroub a teflonová ferule pro připojení k vývodu z kolony. Pracovní elektroda byla spolu s referentní a pomocnou elektrodou ponořena v přepradové nádobce s mobilní fází.

Tento postup byl v práci⁴² použit pro konstrukci ampérometrického detektoru s platinovou a měděnou mikrocylindrickou elektrodou (vnitřní průměr teflonové kapiláry 0,25 mm, průměr platinového drátku 0,1 mm, průměr měděného drátku 0,2 mm).



Obr. 1.1 Schéma elektrochemického tubulárního detektoru: 1 – přívod od separační kolony, 2 – platinová tubulární elektroda, 3 – referentní elektroda, 4 – pomocná elektroda, 5 – roztok elektrolytu v nádobce s přepradem, 6 – odpad, a – platinová trubička, b – cínová pájka, c – kontaktní drátek k platinové trubičce, d a e – teflonová kapilára tvořící výtok z kolony, f – teplem se stahující izolace.⁴¹



Obr. 1.2 Schéma elektrochemického mikrocyklrického detektoru: 1 – přívod od separační kolony, 2 – platinová mikrocyklrická elektroda, 3 – referenční elektroda, 4 – pomocná elektroda, 5 – roztok elektrolytu v nádobce s přepadem, 6 – odpad, a – teflonová kapilára, b – platinový drátek, c – tavné lepidlo sloužící jako izolace drátku od styku s roztokem.⁴²

1. 5 Extrakční metody pro aminoaromáty

Extrakce je separační a čistící metoda, při které přechází složka ze směsi látek v kapalně či tuhé fázi do jiné kapalně fáze. V této diplomové práci je použita metoda extrakce na tuhé fázi (SPE). Jejím principem je selektivní zadržování skupiny látek na tuhé fázi, která je umístěna ve formě sloupce nebo membrány v krátké kolonce. Extrakce na tuhé fázi je často využívána během procesu úpravy vzorků, kdy extrakcí žádané látky z kapalněho vzorku oddělíme tuto látku od rušivě matrice. Získáme tak extrakt o vyšší čistotě a koncentraci žádané látky. SPE tak lze použít pro odstranění rušivě složek matrice, pro selektivní obohacení (nakoncentrování) vzorku a také pro změnu rozpouštědla vzorku. Výhodami SPE ve srovnání s klasickou extrakcí kapalina – kapalina (LLE) je jednoduché, rychlejší a levnější provedení, protože lze pracovat s menšími objemy vzorků a tudíž je snížena spotřeba organickě rozpouštědel. Výhodou je i fakt, že vzorky

prekoncentrované na kolonkách lze snadno skladovat nebo transportovat. Sortiment SPE kolonek se neustále zvětšuje a SPE tak rychle vytlačuje do pozadí klasickou LLE.⁴³

Metodu extrakce využila ve svých pracích řada autorů. Pro stanovení aminonaftalenů a aminobifenylů ve vodě použil Zhou a kol. mikroporézní membránovou LLE²⁸, klasická LLE byla použita pro stanovení aminobifenylů²⁵ a aminonaftalenů z moči⁴⁴. Bhaskar a kol. vyvinuli nový sorbent β -cyklodextrin-polyurethan pro extrakci aromatických uhlovodíků ze vzorků vody a ten byl porovnáván s sorbenty Extrelut NT, Isolute a C18 obsahující klasické reverzní fáze pro SPE.³⁴ Shelke a kol. použili SPE s C18 pro stanovení aromatických aminů ve dvou syntetických potravinářských barvivech⁴⁵ a obdobná fáze byla použita pro extrakci aminonaftalenů z moči⁴⁴. Stabbert a kol. využili extrakce při stanovení aromatických aminů v cigaretovém kouři,¹⁸ Chiang a kol. při stanovení aromatických aminů v jedlých olejích³² a Turesky a kol. při stanovení aminobifenylů v barvách na vlasy¹². Garrigos a kol. využil extrakce superkritickou kapalinou ve spojení s plynovou chromatografií pro stanovení aromatických aminů v dětských barvách na prsty.⁴⁶

2. Experimentální část

2.1 Studované látky a ostatní chemikálie

Zásobní roztoky 2-aminobifenyly, 4-aminobifenyly (obě látky Sigma-Aldrich, 97%), 1-aminonaftalenu (Sigma-Aldrich, 98%) a 2-aminonaftalenu (Sigma-Aldrich, 95%) o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ byly připraveny rozpuštěním přesně naváženého množství dané látky v deionizované vodě (Millipore Q-plus System, Millipore, USA). Tyto zásobní roztoky byly skladovány ve tmě za laboratorní teploty. Roztoky o nižších koncentracích byly získány přesným ředěním zásobních roztoků studovaných látek.

Fosforečnanový pufr byl připraven z roztoku $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ hydrogenfosforečnanu disodného, jehož pH bylo upraveno přidávkem koncentrované kyseliny fosforečné (obě látky p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika). Brittonův – Robinsonův pufr (BR pufr) o příslušném pH byl připraven smísením vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ s roztokem obsahujícím kyselinu boritou, kyselinou fosforečnou a kyselinu octovou (vše p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika), každou o koncentraci $0,04 \text{ mol dm}^{-3}$. Přesná hodnota pH byla měřena pH metrem. Dále byly použity tyto chemikálie: acetonitril (chromatografická čistota, Merck, Německo), methanol (p.a., Merck, Německo), ethylester kyseliny octové a koncentrovaná kyselina sírová (vše p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika).

2.2 Přehled studovaných látek

2-aminobifenyl

C.A.S. Name: 2-Aminobiphenyl

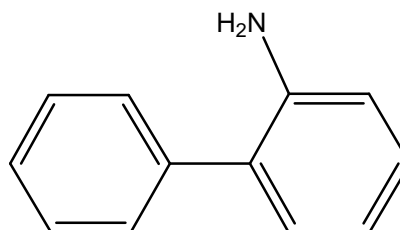
C.A.S. Registry Number: 90-41-5

$C_{12}H_{11}N$

$M_r = 169,23$

zkratka: 2-AB

$pK_A = 3,82$ (22 °C)



4-aminobifenyl

C.A.S. Name: 4-Aminobiphenyl

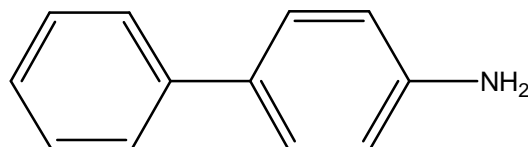
C.A.S. Registry Number: 92-67-1

$C_{12}H_{11}N$

$M_r = 169,23$

zkratka: 4-AB

$pK_A = 4,22$ (29 °C)



1-aminonaftalen

C.A.S. Name: 1-Naphthalenamine

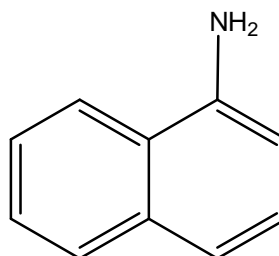
C.A.S. Registry Number: 134-32-7

$C_{10}H_9N$

$M_r = 143,19$

zkratka: 1-AN

$pK_A = 3,92$ (25 °C)



2-aminonaftalen

C.A.S. Name: 2-Naphthalenamine

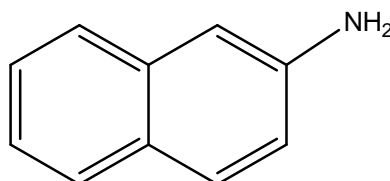
C.A.S. Registry Number: 91-59-8

$C_{10}H_9N$

$M_r = 143,19$

zkratka: 2-AN

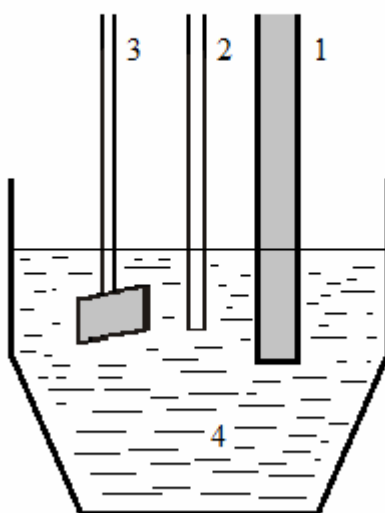
$pK_A = 4,15$ (25 °C)



2.3 Aparatura

2.3.1 Voltametrické techniky

Voltametrická měření byla prováděna pomocí Eco-Tribo polarografu (Polaro-Sensors, Praha, Česká republika) se software PolarPro (verze 5.1). Jednotlivá měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení se stacionární diskovou platinovou pracovní elektrodou, průměr platinového disku $2,0 \pm 0,1$ mm (plocha disku $3,14$ mm²) (Metrohm, Herisau, Švýcarsko). Pracovní elektroda byla ponořena v polarografické nádobce společně s Ag/AgCl (3 mol l^{-1} KCl) referentní elektrodou (ETP CZ-R00408), a platinovou plíškovou pomocnou elektrodou (obě Elektrochemické detektory, Turnov, Česká republika). Uspořádání elektrod v polarografické nádobce je znázorněno na obr. 2.1.



Obr. 2.1 Uspořádání elektrod v polarografické nádobce. 1 – pracovní stacionární platinová disková elektroda, 2 – referentní elektroda, 3 – pomocná elektroda, 4 – základní elektrolyt.

2.3.2 Chromatografická aparatura

HPLC systém se skládal z vysokotlaké pumpy HPP 5001 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika), dávkovače se smyčkou o velikosti 10 μl (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika), předkolony LiChroCART[®] PAH 4-4 (Merck, Německo), kolony LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm , 125 \times 4 mm (Merck, Německo), UV spektrofotometrického detektoru LCD 2083 (ECOM, Česká republika) a ampérometrického detektoru ADLC 2 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika). Ampérometrický detektor byl sériově zapojen za UV spektrofotometrický detektor. HPLC systém byl kontrolován pomocí software CSW 32 Chromatography station (DataApex, Česká republika) pracujícího v prostředí Windows 98 (Microsoft, USA). Dávkovaný objem vzorku byl 10 μl a průtoková rychlost Q 1 ml min⁻¹. Všechna měření probíhala za laboratorní teploty. Mobilní fáze byla 10 min odvzdušňována ultrazvukem PSO 2000A Ultrasonic Compact Cleaner (Powersonic, USA). Hodnoty pH roztoků pro přípravu mobilní fáze byly měřeny na digitálním přístroji pH Meter & Conductivity 4330 (Jenway, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou.

Ampérometrický detektor pracoval v tříelektrodovém uspořádání s platinovou tubulární nebo platinovou mikrocyklindrickou pracovní elektrodou. Pracovní elektroda byla ponořena v přepadové nádobce společně s Ag/AgCl (3 mol l⁻¹ KCl) referentní elektrodou a platinovou plíškovou pomocnou. Na začátku každého pracovního dne byla pracovní elektroda propláchnuta methanolem a následně deionizovanou vodou. Poté do ní byla nastříknuta široká zóna vodného roztoku kyseliny sírové o koncentraci 5 \cdot 10⁻² mol dm⁻³ a pracovní elektroda byla deseti až dvanácti cykly střídavě polarizována při -0,3 V a +1,4 V vždy po dobu 10 s. Stejný postup byl používán i pro čištění detektoru při případných obtížích.⁴⁷ Na konci vlastního měření byl detektor opět propláchnut methanolem a následně deionizovanou vodou.

2.3.3 Extrakce na tuhé fázi

Extrakce na tuhé fázi (SPE) byla prováděna na extrakčních kolonkách LiChrolut[®] EN 200 mg/3 ml (Merck, Německo) na bázi poly(styren-divinylbenzenu) za použití vzduchové vývěvy a dvanáctimístného vakuového extrakčního rozvodu.

2.4 Pracovní postupy

2.4.1 Voltametrická měření

Při voltametrických měřeních byl objem vzorku vždy 10 ml. Vzorek byl připravován smísením 5 ml Brittonova – Robinsonova pufru o příslušném pH a 5 ml zásobního roztoku studované látky v deionizované vodě o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ve voltametrické nádobce; výsledná koncentrace měřených roztoků tak byla $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty.

Při cyklické voltametrii (CV) byly všechny cykly prováděny polarizační rychlostí 100 mV s^{-1} .

Při diferenční pulsní voltametrii (DPV) byly použity následující parametry: polarizační rychlost 20 mV s^{-1} , pulsy o šířce 80 mV a výšce 50 mV.

Postup měření byl následující: Povrch pracovní elektrody byl před prvním cyklem, resp. skenem mechanicky očištěn leštěním suspenzí Al_2O_3 . Následovala série cyklů, resp. skenů: a) s očištěním pracovní elektrody mezi jednotlivými cykly, resp. skeny pomocí suspenze oxidu hlinitého; b) bez očištění pracovní elektrody mezi jednotlivými cykly, resp. skeny.

Leštění povrchu pracovní elektrody bylo prováděno pomocí suspenze oxidu hlinitého (velikost částic $1,1 \mu\text{m}$) naneseného společně s destilovanou vodou na samet. Pracovní elektroda byla leštěna krouživým pohybem po sametu po dobu 10 s.

Výška píků sledovaných látek byla vyhodnocována od spojnice minim před a za píkem.

2.4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí

Separace analytů byla prováděna na koloně LiChrospher[®] 100 RP-18, $5 \mu\text{m}$, $125 \times 4 \text{ mm}$, která nebyla termostatována.

Používané mobilní fáze byly připravovány smísením příslušných objemových dílů vodné složky a acetonitrilu. pH mobilních fází bylo upravováno pomocí fosforečnanového pufru změnou pH vodné složky mobilní fáze. Fosforečnanový pufr byl tvořen $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ hydrogenfosforečnanem sodným, jehož pH bylo upraveno na požadovanou

hodnotu kyselinou fosforečnou. K přípravě vodných roztoků a mobilních fází byla používána deionizovaná voda. Průtok mobilní fáze byl $1,0 \text{ ml min}^{-1}$.

byl sériově zapojen za UV detektor (UV detektor zastával kontrolní funkci pro ověření selektivity elektrochemického detektoru). Elektrochemický detektor pracoval v tříelektrodovém zapojení s referentní argentchloridovou elektrodou a pomocnou platinovou elektrodou. Jako pracovní elektroda byla použita platinová mikrocylindrická nebo platinová tubulární elektroda. Všechny elektrody, tj. pracovní, referentní a pomocná, byly ponořeny v přepadové nádobce s mobilní fází.

Při testování elektrochemické detekce byly používány optimální podmínky separace, tedy mobilní fáze tvořená acetonitrilem a fosforečnanovým pufrům o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V).

Optimální potenciál pracovních elektrod + 1,0 V byl určen z hydrodynamických voltamogramů jednotlivých látek, které byly proměřeny pomocí nástřiku $10 \mu\text{l}$ směsi studovaných látek o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ každé složky v roztoku.

2.4.3 Extrakce na tuhé fázi

Při extrakci 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN z moči byla příprava vzorků, aktivace extrakčních kolonek a dávkování vzorku prováděna podle postupu uvedeného výrobcem pro stanovení anilinu⁴⁸. pH moči bylo v den analýzy upraveno pomocí 5 mol dm^{-3} roztoku NaOH na hodnotu pH 9,0. Poté byla moč zfiltrována. Modelové vzorky pro stanovení studovaných látek v moči byly připraveny přesným ředěním zásobních roztoků upravenou močí: Do 100ml odměrné baňky bylo odpipetováno dané množství zásobních roztoků 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ a doplněno do 100 ml močí. Extrakce na tuhé fázi byla prováděna na extrakčních kolonkách LiChrolut[®] EN 200 mg/3 ml se sorbentem tvořeným kopolymerem ethylvinylbenzenu a divinylbenzenu následujícím způsobem: Tuhá fáze extrakční kolonky byla aktivována bez použití podtlaku postupným promytím 3 ml ethylacetátu, 3 ml methanolu a 3 ml deionizované vody. Poté bylo na kolonku nanášeno 100 ml analyzovaného vzorku a prosáto za pomoci podtlaku rychlostí cca 1 ml min^{-1} . Následně byla kolonka promyta 3 ml deionizované vody a 1 min sušena vzduchem. Zachycené aminobifenyly a aminonaftaleny byly eluovány 4 ml acetonitrilu bez použití podtlaku. Nakonec byl použit

podtlak po dobu 1 min pro odsátí zbytku acetonitrilu z kolonek. 10 μ l eluátu bylo nastříknuto do HPLC systému.

Reálný vzorek moči kuřáka byl podroben stejnému extrakčnímu postupu.

Výtěžek extrakce byl vyhodnocován jako poměr výšky analytu ($I_{\text{píku}}$) k výšce píku získaného přidáním potřebného objemu standardního roztoku k roztoku po extrakci slepého vzorku. Slepý vzorek byl před extrakcí upraven a extrahován stejným postupem jako modelové vzorky moči.

2.4.4 Kalibrační závislosti

Kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Meze stanovitelnosti L_Q a meze detekce L_D byly stanoveny jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna desetinásobku ($S/N = 10$) či trojnásobku ($S/N = 3$) absolutní hodnoty šumu.

2.5 Použité vzorce

Retenční faktor k :

$$k = \frac{t_r - t_M}{t_M}$$

t_r – retenční čas

t_M – mrtvý čas

Rozlišení píků $R_{1,2}$:

$$R_{1,2} = 2 \cdot \frac{t_{r,2} - t_{r,1}}{w_2 + w_1}$$

$t_{r,2}, t_{r,1}$ – retenční časy píků

w_2, w_1 – šířky píků při jejich základnách

Počet teoretických pater N :

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_{r,i}}{w_{0,5}} \right)^2$$

$t_{r,i}$ – retenční čas píků i

$w_{0,5}$ – šířka píků v polovině jeho výšky

Asymetrie píku A_S :

$$A_S = \frac{b}{a}$$

a – šířka vzestupné části píku měřená v 10 % jeho výšky

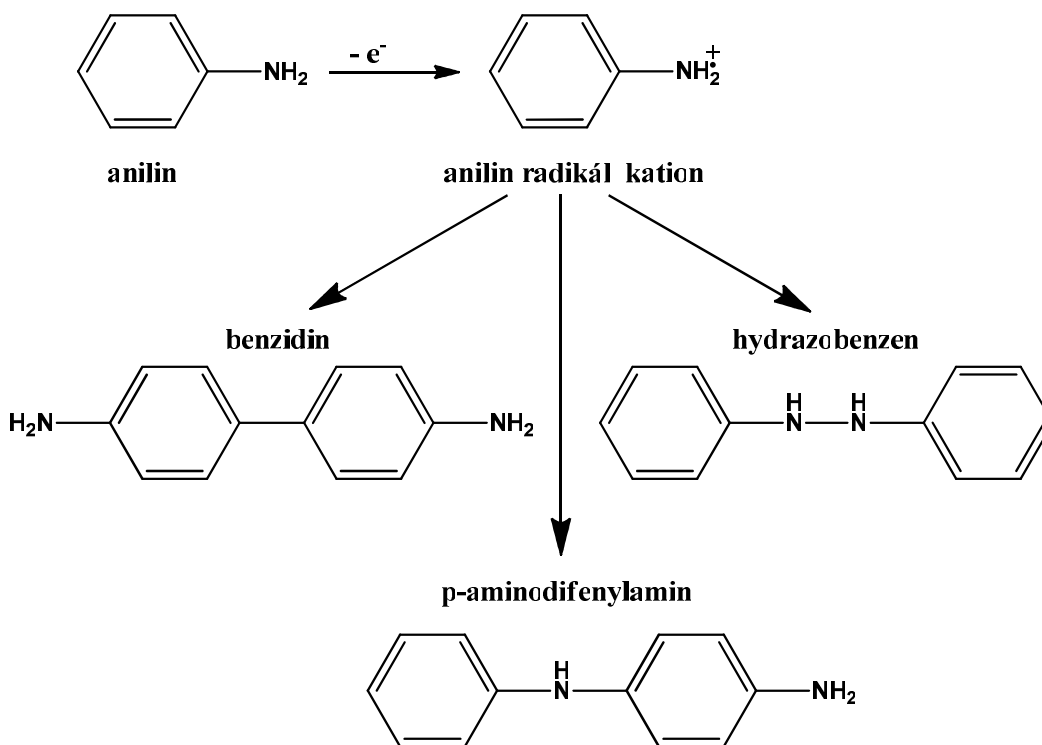
b – šířka sestupné části píku měřená v 10 % jeho výšky

3. Výsledky a diskuze

3.1 Voltametrická měření

Elektrooxidace aromatických aminů na pevných elektrodách je často provázena jejich pasivací. Proto byla nejprve provedena základní charakterizace elektrochemického chování studovaných amino aromátů na stacionární platinové diskové elektrodě metodou cyklické voltametrie a diferenční pulsní voltametrie. Především byl sledován vliv pH na signály analytů a pasivaci elektrodového povrchu.

Důvodem pasivace elektrod je mechanismus elektrooxidace. Ten je zahájen ztrátou elektronu za tvorby radikál kationtu, který iniciuje další reakce vedoucí ke tvorbě dimerů až polymerních filmů, jejichž přesná struktura není zpravidla známa^{49, 50, 51} Pro anilin je iniciační reakce a možné dimerní produkty, mezi které patří p-aminodifenylamin, benzidin či hydrazobenzen, znázorněna na obr. 3.1. Pasivace elektrodového povrchu při elektrooxidaci aromátů byla ve vodných prostředích zaznamenána např. na bórem dopované diamantové (BDD) filmové elektrodě.²²

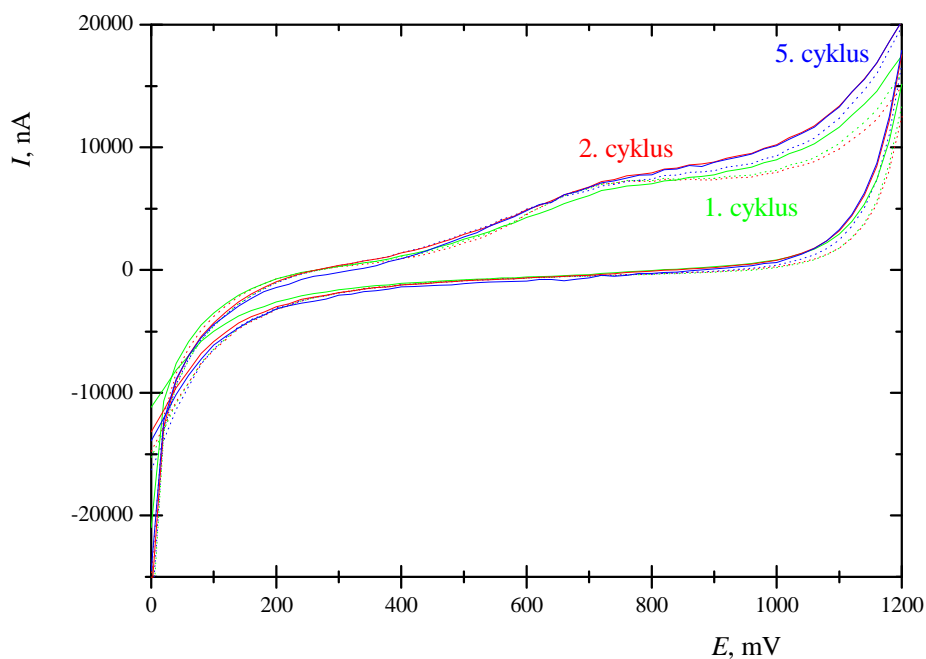


Obr. 3.1 Schéma iniciační oxidační reakce anilinu a možných vznikajících dimerních produktů

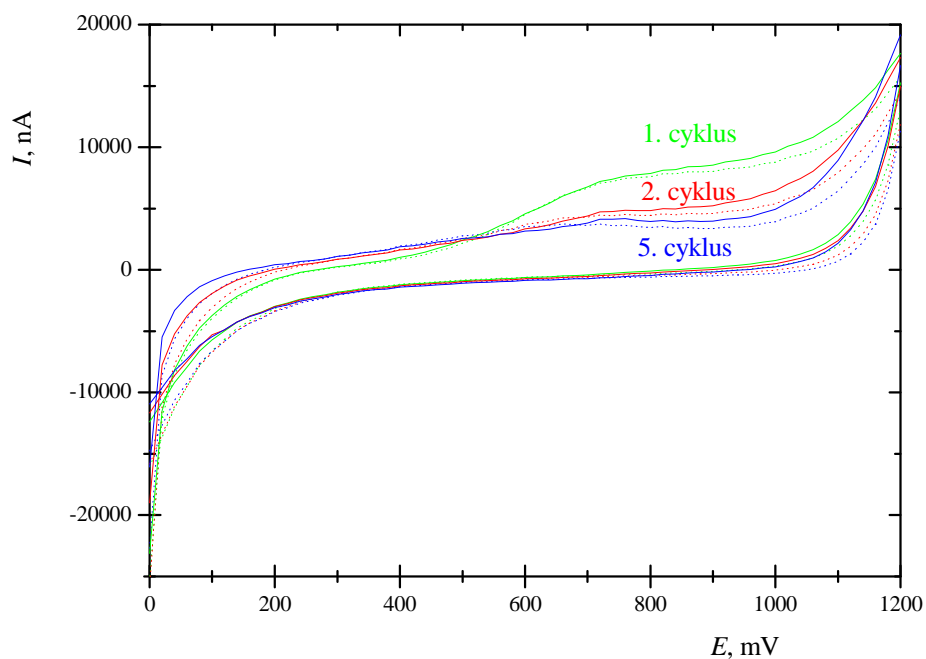
3.1.1 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) byla prováděna v kyselém, neutrálním a zásaditém prostředí – BR pufru o pH 2,0, 7,0 a 12,0 – na stacionární diskové platinové pracovní elektrodě. Použitá rychlost polarizace byla 100 mV s^{-1} . Měřeno bylo vždy od počátečního potenciálu $E_{poč} = 0 \text{ V}$. Jednotlivé analyty byly postupně měřeny v uvedeném prostředí a) s očištěním pracovní elektrody mezi jednotlivými cykly přešetřením suspenzí Al_2O_3 , čímž byla testována reprodukovatelnost měření, a b) bez očištění pracovní elektrody mezi jednotlivými cykly pro sledování pasivace pracovní elektrody. Ukázka cyklických voltamogramů 2-AB ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) pro tyto dva případy zaznamenaných v BR pufru o pH 7,0 s a bez očištění pracovní elektrody mezi jednotlivými cykly je znázorněna na obr. 3.2, respektive 3.3.

Z obou obr. je zřejmé, že při daném pH nebyl pozorován pro 2-AB zřetelný signál látky, jen mírný nárůst vlny látky oproti vlně základního elektrolytu při potenciálech kladnějších než ca +700 mV. Pro ostatní studované látky a pH základních elektrolytů byly výsledky obdobné. Ze získaných výsledků dále vyplývá, že elektrooxidace studovaných aminoaromátů je v měřené škále pH a při daných podmínkách měření ireverzibilní vzhledem k nepřítomnosti signálů analytů ve zpětném katodickém skenu. Při čištění elektrody suspenzí Al_2O_3 mezi jednotlivými cykly bylo dosaženo reprodukovatelných záznamů, jak dokládá obr. 3.2. Z pozorování záznamů pěti následných cyklů bez očištění pracovní elektrody mezi jednotlivými cykly (obr. 3.3) je patrný pokles měřených proudů pro základní elektrolyt i pro analyt, který je dokladem určité pasivace povrchu pracovní elektrody.



Obr. 3.2 Cyklické voltamogramy 2-AB ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na platinové diskové elektrodě s čištěním pracovní elektrody mezi jednotlivými cykly pomocí suspenze Al_2O_3 , prostředí BR pufru o pH 7,0, rychlost polarizace 100 mV s^{-1} . Základní elektrolyt (····) a 2-AB (—) pro 1., 2. a 5. cyklus.



Obr. 3.3 Cyklické voltamogramy 2-AB ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na platinové diskové elektrodě bez čištění pracovní elektrody mezi jednotlivými cykly v prostředí BR pufru o pH 7,0, rychlost polarizace 100 mV s^{-1} . Základní elektrolyt (····) a 2-AB (—) pro 1., 2. a 5. cyklus.

3.1.2 Diferenční pulsní voltametrie

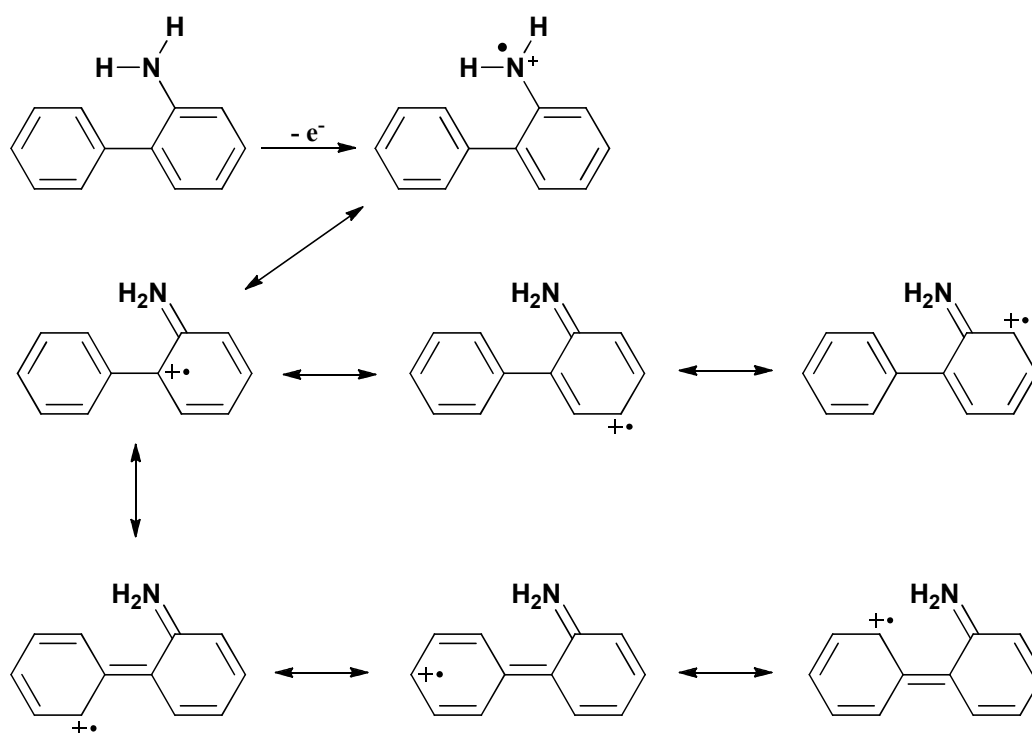
Další charakterizace elektrochemického chování 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN byla prováděna v režimu diferenční pulsní voltametrie kvůli lepšímu vykreslení signálů studovaných analytů. Jejich DP voltamogramy (opět pro $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) byly zaznamenány v prostředí BR pufru o pH 2,0, 5,0, 9,0 a 12,0 na diskové platinové pracovní elektrodě. Měřeno bylo vždy od počátečního potenciálu $E_{poč} = 0 \text{ V}$. Jednotlivé analyty byly postupně opět měřeny v uvedeném prostředí a) bez očištění pracovní elektrody mezi jednotlivými skeny a b) s očištěním pracovní elektrody mezi jednotlivými skeny. V tab. 3.1 jsou shrnuty hodnoty relativních směrodatných odchylek (RSD, počet měření $n = 5$) výšek píků a potenciálů píků (E_p) studovaných aminoaromátů pro uvedená pH BR pufru. Všechny látky poskytly zpravidla jeden signál, jehož potenciál se s klesající hodnotou pH měřeného prostředí posouvá k pozitivnějším potenciálům (výjimky jsou zřejmé z tabulky 3.1). Tento trend je obecně platný pro oxidaci aminoskupiny, jelikož vlivem její protonizace v kyselějších prostředí klesá elektronová hustota a je potřeba vynaložit vyšší energie (čili kladnějšího potenciálu) pro odebrání elektronu.

Dobře patrný je tento posun v práci Barka a kol.,²² kteří studovali elektrochemické chování 2-AB a 4-AB na nanokrystalické BDD elektrodě. V závislosti na pH BR pufru poskytuje každá z látek na této elektrodě až 4 píky, potenciál hlavního oxidačního píku se s rostoucím pH posouvá k zápornějším potenciálům. Nejlépe vyvinutý pík 2-AB se objevuje na DP voltamogramech získaných v roztoku BR pufru o pH 7,0 a nejlépe vyvinutý pík 4-AB v roztoku BR pufru o pH 9,0. Stejně prostředí bylo pro tyto dva aminobifenyly doporučeno pro jejich stanovení metodou DPV na uhlíkové pastové elektrodě,⁵² i po její modifikaci vybranými cyklodextriny, vždy po 180 s trvající akumulaci analytů na povrch pracovní elektrody při otevřeném proudovém obvodu. V těchto případech byl však pro studované aminobifenyly nalezen stejně jako na platinové diskové elektrodě v této práci pouze jeden anodický signál.

Vyšší počet píků zaznamenaných na BDD elektrodě zřejmě souvisí s její nižší tendencí k pasivaci, ke které přispívá hydrofobní povrch BDD elektrod.⁵³ U studovaných aminoaromátů lze předpokládat vysoký počet reakčních produktů a meziproductů a složitou strukturu vznikajících polymerních filmů vzhledem k vysokému počtu mesomerních forem radikál kationtu vzniklého prvotní jednoelektronovou oxidací. Sedm možných mesomerních forem s lokalizací radikál kationtu na dusíku aminoskupiny a v poloze 1, 3, 5, 2', 4', 6' pro 2-AB je znázorněno na obr. 3.4. Stejná lokalizace radikál

kationtu pro 4-AB vede vzhledem k jeho symetrii k pěti mezním mezomerním strukturám. Radikál kationt vzniklý elektrooxidací 1-AN a 2-AN lze pak popsat šesti mezními mezomerními strukturami. Vzájemné reakce těchto a dalších meziproduktů spolu s reakcemi s výchozími amino aromáty vedou ke složité struktuře polymerních film pokrývajících elektrodový povrch. Pro 4-AB na platinových elektrodách byl např. popsán vznik lineárního polymeru tvořeného bifenylovými skelety vzniklého coupling reakcí C-N konci 4-AB.⁵⁴

V několika případech byla na BDD elektrodách pozorována lepší reprodukovatelnost signálu analytu pro zásaditá prostředí, což bylo vysvětleno vyšší rozpustností a tím pádem snadnějším odstranění vzniklých polymerních filmů.^{22, 49}



Obr 3.4 Schéma sedmi možných mezních mesomerních forem 2-AB s lokalizací radikál kationtu na dusíku aminoskupiny a v poloze 1, 3, 5, 2', 4', 6'.

V této studii na Pt diskové elektrodě v zásaditém prostředí BR pufru o pH 12,0 dosahovala RSD výšek pík hodnoty v rozmezí 4,7 až 30,3 %. Naměřené voltamogramy 1-AN v prostředí BR pufru o pH 12,0 s očištěním, resp. bez očištění pracovní elektrody mezi jednotlivými skeny jsou znázorněné na obr. 3.5, resp. na obr. 3.6. Druhý postup opět vede k postupnému poklesu výšky píku, svědčící o pasivaci elektrodového povrchu (obr. 3.6)

vyjádřené vysokou hodnotou RSD výšky píku 24,1 % (viz tabulka 3.1). Tento pokles byl patrný i pro další studované analyty v BR pufru o pH 2,0, 9,0 a 12,0.

Prostředí BR pufru o pH 5,0 bylo celkově nevyhovující, píky látek byly špatně vyhodnotitelné. V prostředí BR pufru o pH 2,0 bylo nalezeno nejvíce pozitivních odezev a zároveň RSD výšek píků byly nejpříjemnější. Naměřené voltamogramy v prostředí BR pufru o pH 2,0 s očištěním pracovní elektrody mezi jednotlivými skeny pro 2-AN, resp. 1-AN, jsou znázorněné na obr. 3.7, resp. obr. 3.8.

Celkově lze konstatovat, že voltametrické metody neposkytly pro stacionární diskovou platinovou elektrodu pro vodná prostředí příliš spolehlivé výsledky. Zaznamenané píky jsou zpravidla nízké s kolísající reprodukovatelností v závislosti na stavu elektrodového povrchu. Pro optimalizaci voltametrického stanovení studovaných aminoaromátů s využitím této elektrody by bylo nutné navrhnout metodu elektrochemické aktivace povrchu pro zvýšení citlivosti a reprodukovatelnosti metody popřípadě použít rotující platinovu diskovou elektrodu.

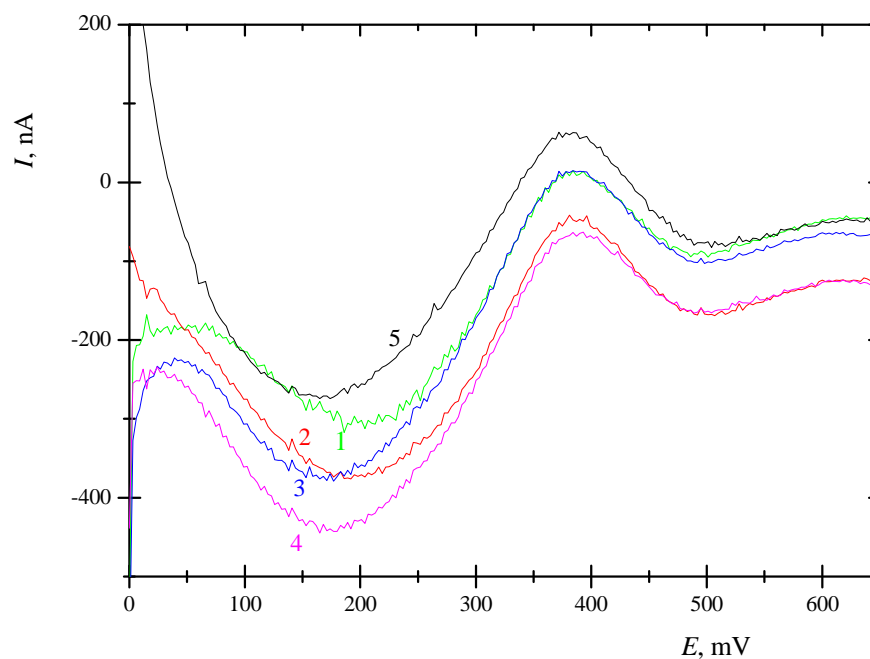
Platinové elektrody lze však s výhodou použít pro elektrochemickou detekci aminoaromátů v HPLC na reverzní fázi, která předpokládá mobilní fázi s přídavkem organického modifikátoru. Proto byla jako základní elektrolyt pro voltametrii použita ještě směs acetonitrilu s $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ fosforečnanovým pufrům o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V) odpovídající mobilní fázi pro HPLC stanovení 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN na reverzní fázi C18 popsané v bakalářské práci.¹⁹ DP voltamogram pro 2-AB zaznamenaný bez očištění a s očištěním platinové diskové elektrody je na obr. 3.9 a 3.10 Stejně jako ve většině vodných prostředích látka poskytuje jeden pík. V prvním případě je zřejmý pokles výšky píku s narůstajícím počtem skenů. RSD výšky píku pro druhý případ byla 2,0 %.

Použití Pt elektrody v průtoku (konkrétně HPLC-ED) poskytlo mnohem spolehlivější výsledky než voltametrie, jak je zřejmé pro mikrocylindrickou platinovou elektrodu z kapitoly 3.2 a z výsledků bakalářské práce pro Pt tubulární elektrodu.¹⁹ Závislost výšek píků 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na pH mobilní fáze pro HPLC-ED s detekcí na Pt tubulární elektrodě získaná z dat naměřených pro tuto bakalářskou práci¹⁹ je znázorněna na obr. 3.11. Byly získány reprodukovatelné odezvy pro všechna pH mobilní fáze (mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 2,0-7,0 v poměru 50:50 (V/V)) v rozsahu daném stabilitou použité kolony s reverzní fází. Je patrné, že v mobilní fázi o pH fosforečnanového pufru 2,5 byly výšky píků látek 2-AB, 1-AN a 2-AN největší. Relativní směrodatná odchylka pro výšku a plochu píku pro 2-AN je v tomto případě 2,56 %, respektive 1,96 %.

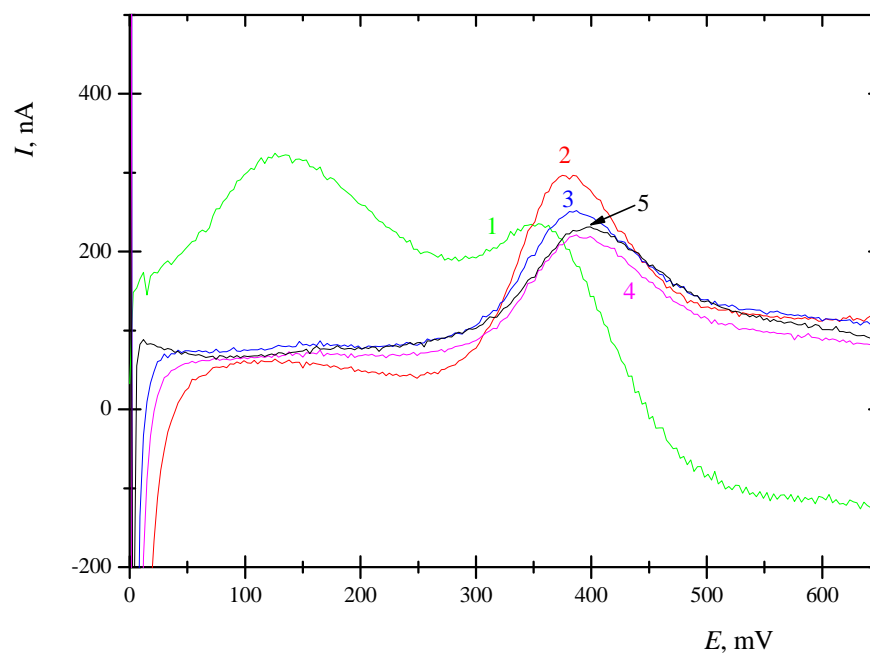
Tab 3.1 Hodnoty potenciálů píků (E_p) a relativních směrodatných odchylek výšek píků (RSD, počet měření $n = 5$) 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN ($c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³) v BR pufru o různém pH. Měření prováděno a) bez očištění pracovní elektrody mezi jednotlivými skeny; b) s očištěním pracovní elektrody mezi jednotlivými skeny přešetřením Al₂O₃. Měřeno metodou diferenční pulsní voltametrie na platinové diskové elektrodě.

		pH 2,0		pH 5,0		pH 9,0		pH 12,0	
		RSD výšky píku [%]	E_p [mV]	RSD výšky píku [%]	E_p [mV]	RSD výšky píku [%]	E_p [mV]	RSD výšky píku [%]	E_p [mV]
2-AB	s očištěním elektrody	2,9	+811	10,7	+734	7,0	+605	25,2	+500
	bez očištění elektrody	5,9	+821	– ^a	– ^a	14,6	+623	7,6	+565
4-AB	s očištěním elektrody	9,8	+738	17,5	+565	– ^a	– ^a	15,0	+389
	bez očištění elektrody	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	28,5	+554	12,2	+417
1-AN	s očištěním elektrody	4,1	+625	15,7	+546 (+739 ^b)	– ^a	– ^a	4,7	+384
	bez očištění elektrody	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	3,7	+454	24,1	+385
2-AN	s očištěním elektrody	2,9	+709	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	8,2	+460
	bez očištění elektrody	11,2	+702 (+871 ^b)	– ^a	– ^a	3,8	+539	30,3	+464

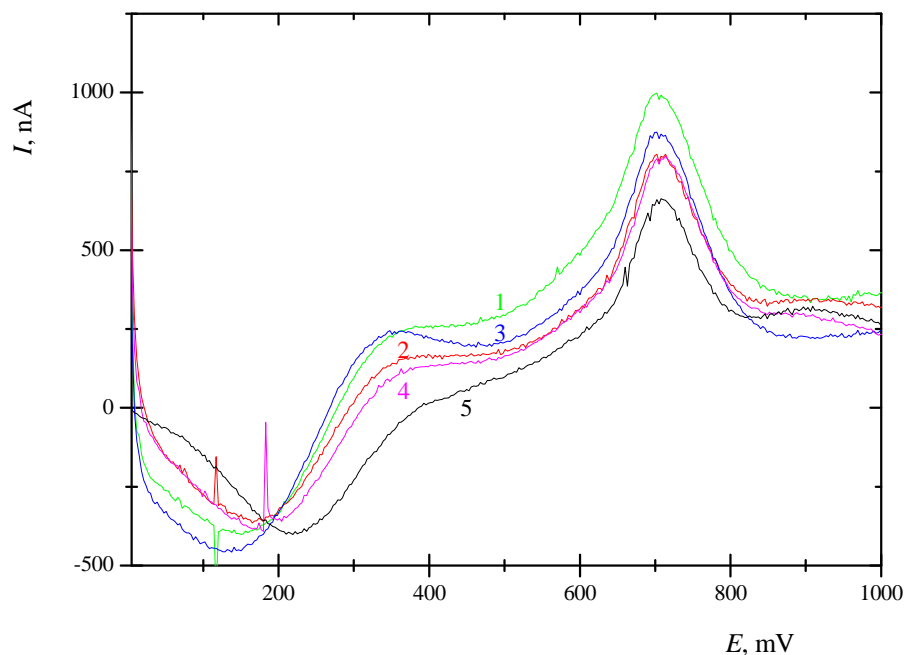
^a nelze vyhodnotit; ^b potenciál píku pro druhý pík (výšku nelze vyhodnotit)



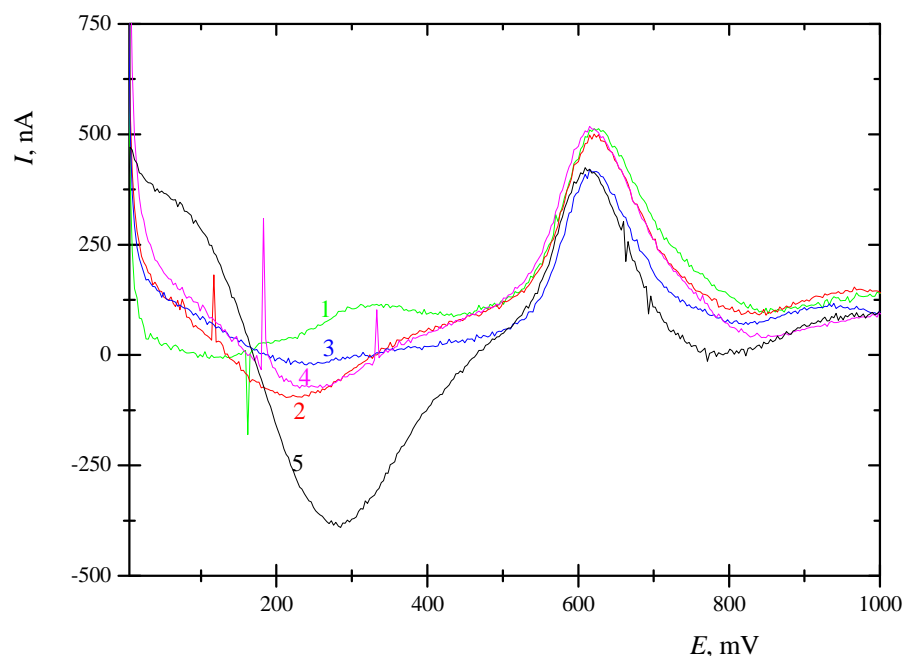
Obr. 3.5 DP voltamogramy 1-AN ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na platinové diskové elektrodě s očištěním pracovní elektrody mezi jednotlivými skeny v prostředí BR pufru o pH 12,0, rychlost polarizace 20 mV s^{-1} , pulsy o šířce 80 mV a výšce 50 mV. Vlna 1-AN pro 1., 2., 3., 4. a 5. sken po odečtení pozadí.



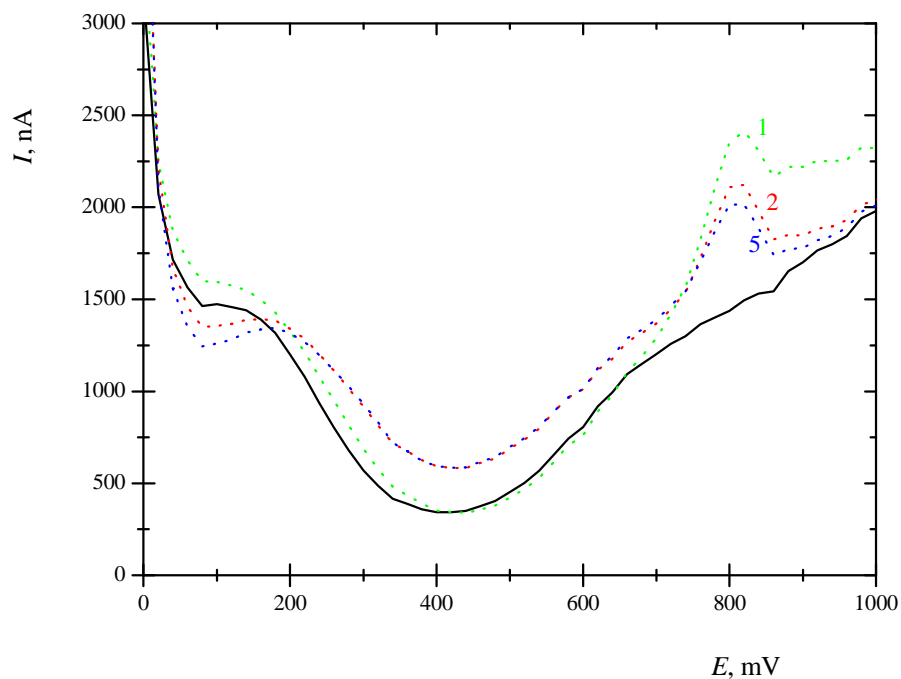
Obr. 3.6 DP voltamogramy 1-AN ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na platinové diskové elektrodě bez očištění pracovní elektrody mezi jednotlivými skeny v prostředí BR pufru o pH 12,0, rychlost polarizace 20 mV s^{-1} , pulsy o šířce 80 mV a výšce 50 mV. Vlna 1-AN pro 1., 2., 3., 4. a 5. sken po odečtení pozadí.



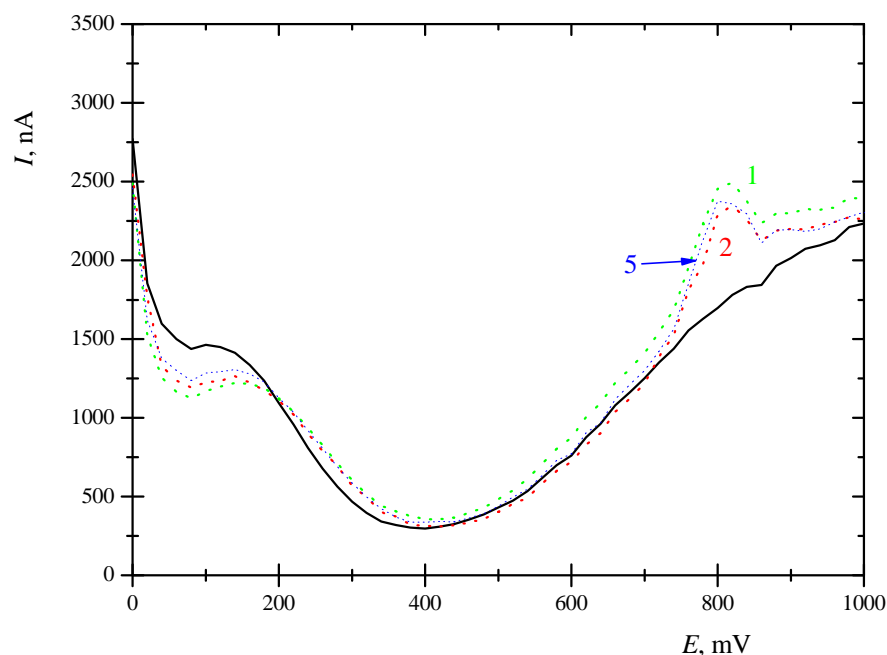
Obr. 3.7 DP voltamogramy 2-AN ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na platinové diskové elektrodě s očištěním pracovní elektrody mezi jednotlivými skeny v prostředí BR pufru o pH 2, rychlost polarizace 20 mV s^{-1} , pulsy o šířce 80 mV a výšce 50 mV. Vlna 2-AN pro 1., 2., 3., 4. a 5. sken po odečtení pozadí.



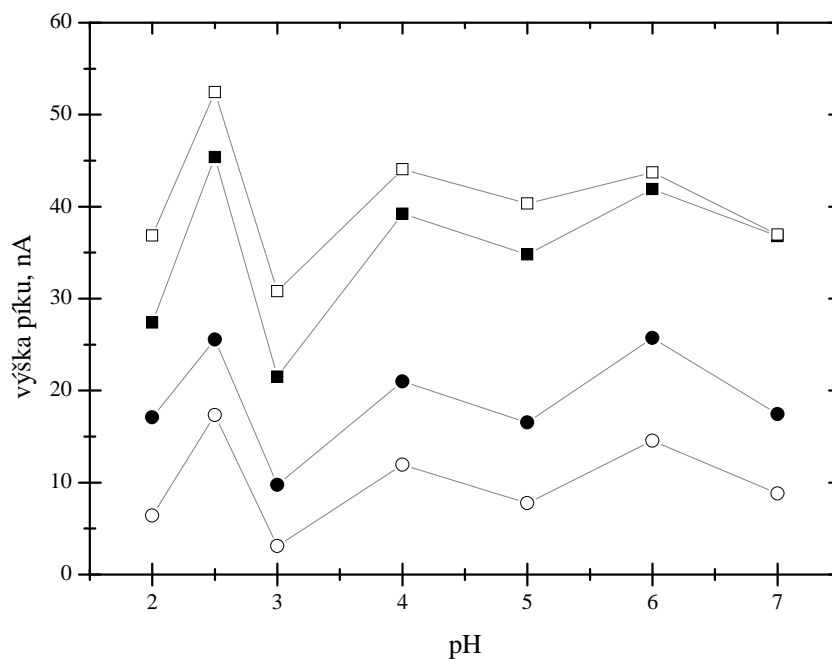
Obr. 3.8 DP voltamogramy 1-AN ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na platinové diskové elektrodě s očištěním pracovní elektrody mezi jednotlivými skeny v prostředí BR pufru o pH 2, rychlost polarizace 20 mV s^{-1} , pulsy o šířce 80 mV a výšce 50 mV. Vlna 1-AN pro 1., 2., 3., 4. a 5. sken po odečtení pozadí.



Obr. 3.9 DP voltamogramy 2-AB ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na platinové diskové elektrodě bez očištění pracovní elektrody mezi jednotlivými skeny v prostředí acetonitrilu s $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ fosforečnanovým pufrům o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), rychlost polarizace 20 mV s^{-1} , pulsy o šířce 80 mV a výšce 50 mV. Základní elektrolyt (—) a 2-AB (····) pro 1., 2. a 5. sken.



Obr. 3.10 DP voltamogramy 2-AB ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na platinové diskové elektrodě s očištěním pracovní elektrody mezi jednotlivými skeny v prostředí acetonitrilu s $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ fosforečnanovým pufrům o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), rychlost polarizace 20 mV s^{-1} , pulsy o šířce 80 mV a výšce 50 mV. Základní elektrolyt (—) a 2-AB (····) pro 1., 2. a 5. sken.



Obr. 3.11 Závislost výšky píku 2-AB (○), 4-AB (●), 1-AN (□) a 2-AN (■) na pH mobilní fáze pro HPLC-ED s platinovou tubulární elektrodou. Kolona LiChrospher® 100 RP-18, 5 μm , 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a 0,01 mol l⁻¹ fosforečnanový pufr o daném pH v poměru 50:50 (V/V), dávkováno 10 μl roztoku směsi v mobilní fázi o $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹, potenciál vkládaný na pracovní platinovou tubulární elektrodu $E_{\text{det}} = +1,0$ V

3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí

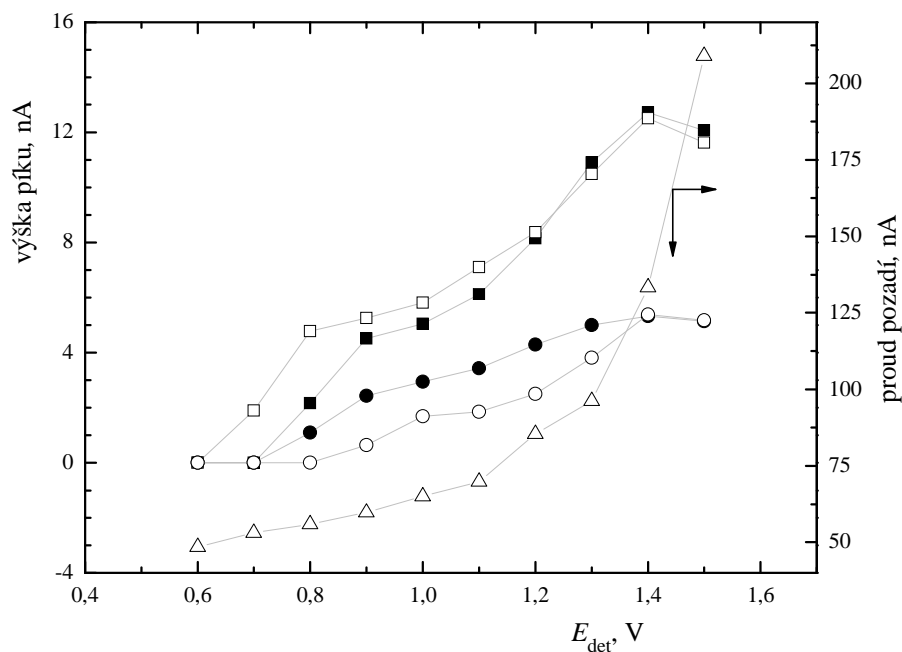
V bakalářské práci¹⁹ byly nalezeny následující podmínky pro separaci 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN: Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm , 125 \times 4 mm, mobilní fáze ve složení acetonitril a 0,01 mol l⁻¹ fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkovaný objem 10 μl , průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹. Zároveň byl nalezen vhodný potenciál pro ampérometrickou detekci studovaných látek vkládaný na pracovní platinovou tubulární elektrodu, jehož hodnota činí +1,0 V. V této diplomové práci byly separační podmínky přežaty a optimalizovány podmínky pro ampérometrickou detekci 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN s využitím platinové mikrocylindrické elektrody. Následně bylo provedeno porovnání obou typů platinových ampérometrických detektorů na základě porovnání parametrů píku 2-AN.

3.2.1 Vliv potenciálu vkládaného na platinovou mikrocylindrickou elektrodu

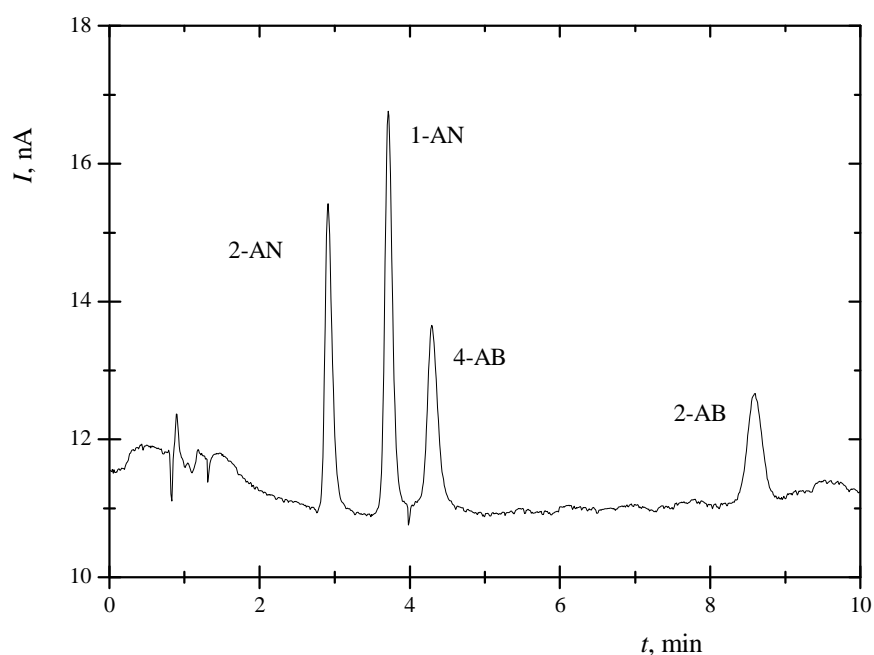
Optimální potenciál detekce E_{det} pro platinovou mikrocylindrickou elektrodu byl získán na základě proměření hydrodynamických voltamogramů jednotlivých látek, tedy závislosti výšky píku analytu na potenciálu E_{det} vkládaném na elektrodu.

Hydrodynamické voltamogramy 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN byly měřeny při optimálních podmínkách separace pro E_{det} v rozsahu +0,6 V až +1,5 V a vyhodnocovány z výšek píků. Současně bylo sledováno proudové pozadí. Získaná data jsou zpracována na obr. 3.12

Jako optimální byl zvolen potenciál detekce E_{det} +1,0 V, chromatogram změřený za optimálních podmínek je ukázán na obr. 3.13. Při vložení kladnějších potenciálů E_{det} měření negativně ovlivňuje vzrůstající proud pozadí. Na velikost šumu nemá vkládaný potenciál výrazný vliv. Tento detekční potenciál je shodný s potenciálem vybraným pro platinovou tubulární elektrodu v bakalářské práci.¹⁹



Obr. 3.12 Hydrodynamické voltamogramy 2-AB (\circ), 4-AB (\bullet), 1-AN (\square), 2-AN (\blacksquare) a proud pozadí (\triangle). Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm , 125 \times 4 mm, mobilní fáze acetonitril a 0,01 mol l⁻¹ fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 μl roztoku směsi v mobilní fázi o $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹.



Obr. 3.13 Chromatogram směsi 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN změřený za optimálního potenciálu na pracovní platinové mikrocylindrické elektrodě. Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm , 125 \times 4 mm, mobilní fáze acetonitril a 0,01 mol l⁻¹ fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 μl roztoku směsi v mobilní fázi o $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹, potenciál vkládaný na pracovní elektrodu +1,0 V.

3.2.2 Vliv průtokové rychlosti mobilní fáze

Dalším krokem bylo proměření závislosti odezvy detektoru, tedy platinové mikrocyklindrické elektrody, na průtokové rychlosti mobilní fáze. Ta byla měněna v rozmezí od $0,2 \text{ ml min}^{-1}$ do $1,2 \text{ ml min}^{-1}$ za optimálních podmínek separace. Potenciál vkládaný na platinovou mikrocyklindrickou elektrodu měl hodnotu $+1,0 \text{ V}$.

Získané závislosti výšky píku pro 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN jsou znázorněny na obr. 3.14. Z tohoto obr. je vidět, že výška píku s rostoucí průtokovou rychlostí výrazně roste, neboť závislost limitního proudu i_L na průtokové rychlosti Q pro elektrochemické detektory je určena vztahem⁴⁰

$$i_L = knFCD^{2/3}Q^x \quad (1),$$

kde i_L je limitní proud při daném potenciálu detekce (lze aproximovat výškou píku D), k je konstanta viskozity, n počet vyměněných elektronů, F Faradayova konstanta, C koncentrace analytu, D difúzní koeficient, Q průtoková rychlost a x je koeficient závisléjící na typu indikační elektrody. Hodnoty x pro různé typy detektorů publikované v práci⁴⁰ jsou uvedeny v tab. 3.2 spolu s hodnotami x určenými ze směrnice závislosti logaritmu výšek píku 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN na logaritmu průtokové rychlosti. Hodnotu x lze určit po zlogaritmování vztahu (1) jako směrnici získané závislosti $\log i_L$ na $\log Q$, neboť zlogaritmováním rovnice (1) dostaneme:

$$\log i_L = \log K + x \log Q \quad (2),$$

kde

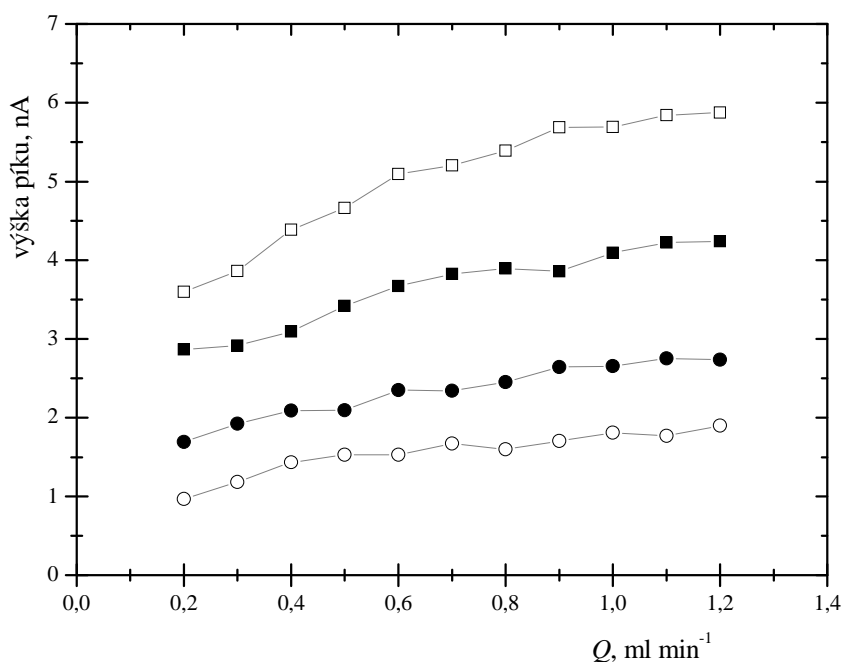
$$K = knFD^{2/3}C \quad (3).$$

Z tabulky 3.2 je vidět, že zjištěné hodnoty x v rozmezí přibližně $0,25 - 0,30$ se blíží teoretickým hodnotám pro tubulární a tenkovrstevný detektor. Teoretická hodnota x pro mikrocyklindrický detektor nebyla v literatuře dohledána; její určení bude obtížné vzhledem k předpokládánému vzniku turbulentního proudění vzhledem ke kolmému umístění platinového drátku do proudu nosného roztoku.

Všechna měření v této práci byla prováděna při průtokové rychlosti 1 ml min^{-1} , stejně jako v bakalářské práci.¹⁹ Při nižších rychlostech byla odezva nižší a píky širší, vyšší rychlosti vedly ke zhoršení separace eluovaných analytů 2-AN, 1-AN a 4-AB.

Tab. 3.2 Hodnoty koeficientů x pro různé typy ampérometrických⁴⁰ a hodnoty x určené experimentálně pro detekci 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN na mikrocyklindrické elektrodě. Podmínky měření viz obr. 3.10.

typ detektoru	„wall-jet“	tubulární	tenkovrstevný	mikrocyklindrický
x	0,75	0,33	0,33 nebo 0,5 ⁵⁵	1-AN 0,295 2-AN 0,246 2-AB 0,287 4-AB 0,294



Obr. 3.14 Závislost výšky píků 2-AB (○), 4-AB (●), 1-AN (□), 2-AN (■) na průtokové rychlosti mobilní fáze Q . Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm , 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a 0,01 mol l⁻¹ fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 μl roztoku směsi v mobilní fázi o $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³, potenciál vkládaný na pracovní platinovou mikrocyklindrickou elektrodu +1,0 V.

3.2.3 Kalibrační závislosti

Nalezené optimální podmínky detekce pro platinovou mikrocyklindrickou elektrodu byly použity pro změření kalibračních závislostí 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN. v koncentračním rozmezí od $4 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³ do $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³.

Naměřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Parametry závislostí získané vyhodnocením příslušných ploch a výšek píků z naměřených chromatogramů jsou uvedeny v tab. 3.3 a 3.4. Dosažené meze stanovitelnosti L_Q a meze detekce L_D pro šum o velikosti 0,022 nA, jsou uvedeny v tab. 3.5. Chromatogram směsi studovaných látek o koncentraci $2 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³ každé složky v roztoku je uveden na obr. 3.15. Kalibrační přímky vyhodnocené z ploch a dále z výšek píků v příslušném koncentračním rozmezí jsou na obr. 3.16 a 3.17.

Kalibrační závislosti jsou lineární v celé měřené oblasti koncentrací. Korelační koeficienty se pohybují v intervalu 0,9993 až 0,9999 pro vyhodnocení z výšek píků. Nejnížší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u 1-AN, tj. $3,8 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³, naopak nejvyšší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u 2-AB, tj. $1,4 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³ meze detekce leží pro všechny analyty v rozmezí cca $(1-4,5) \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³. To jsou hodnoty srovnatelné s ampérometrickou detekcí aminoaromátů v HPLC na elektrodě ze skelného uhlíku a BDD elektrodě v tenkovrstevném uspořádání⁵⁶ ($8,2 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³ respektive $1,2 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³ pro 2-AB; $6,4 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³ respektive $1,3 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³ pro 1-AN). Nižších mezí detekce bylo dosaženo například pro uhlíkovou pastovou elektrodu v uspořádání wall-jet⁵⁷ ($1,3 \cdot 10^{-8}$ mol dm⁻³ pro 1-AN; $8,8 \cdot 10^{-9}$ pro 2-AN) či platinovou tubulární elektrodou (porovnání viz následující kapitola 3.2.4

Tab. 3.3 Parametry kalibračních závislostí pro HPLC s elektrochemickou detekcí na platinové mikrocyklindrické elektrodě při potenciálu +1,0 V. Vyhodnoceno z ploch píků. Kolona LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a 0,01 mol dm⁻³ fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 µl roztoku směsi, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹.

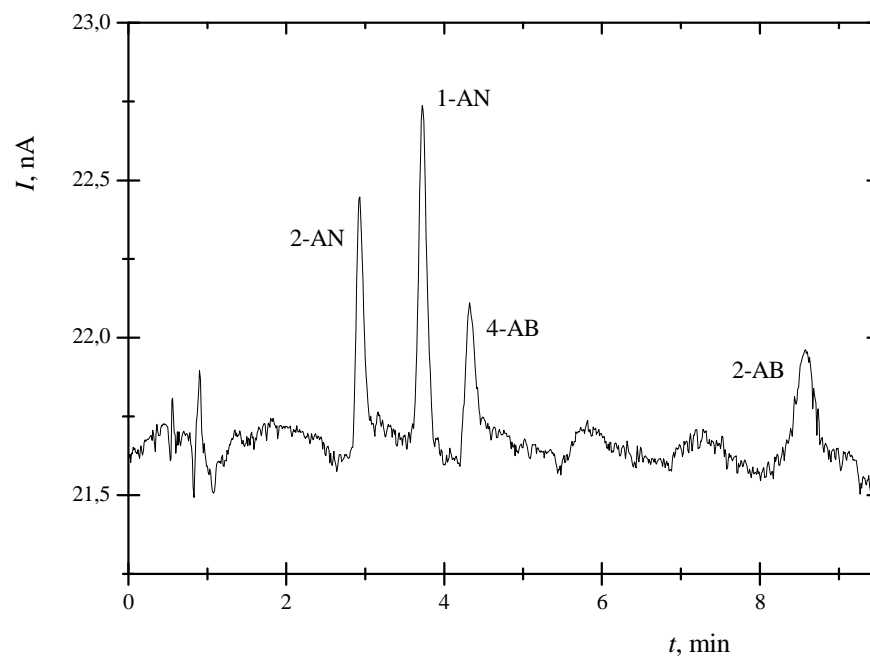
analyt	lineární dynamický rozsah, mol dm ⁻³	směrnice, nA s mol ⁻¹ dm ³	úsek, nA s	korelační koeficient
2-aminobifenyl	4·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁵	2,36·10 ⁵	-0,04	0,9996
4-aminobifenyl	4·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁵	2,59·10 ⁶	-0,35	0,9999
1-aminonaftalen	4·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁵	4,36·10 ⁶	-0,55	0,9996
2-aminonaftalen	4·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁵	3,35·10 ⁶	-0,85	0,9991

Tab. 3.4 Parametry kalibračních závislostí pro HPLC s elektrochemickou detekcí na platinové mikrocyklindrické elektrodě při potenciálu +1,0 V. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a 0,01 mol dm⁻³ fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 µl roztoku směsi, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹.

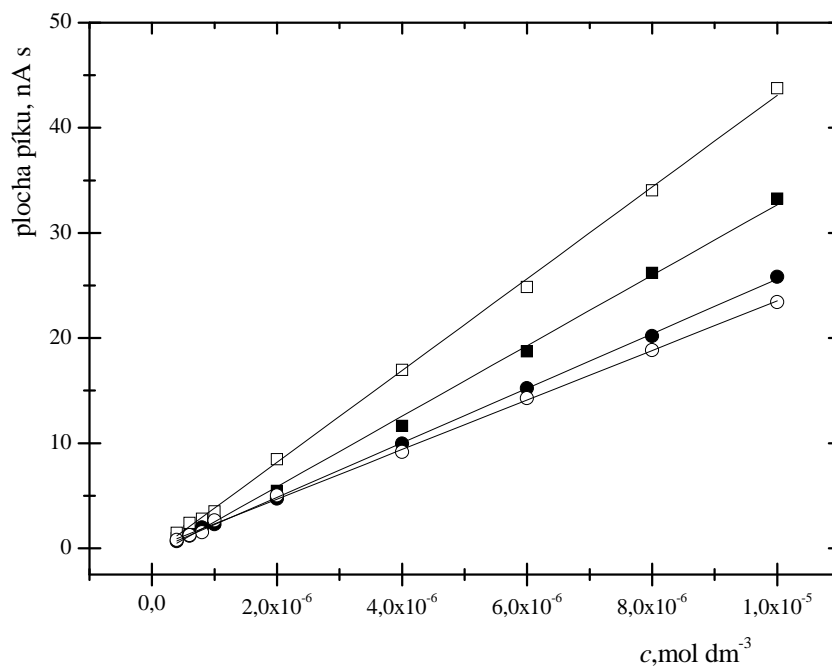
analyt	lineární dynamický rozsah, mol dm ⁻³	směrnice, nA mol ⁻¹ dm ³	úsek, nA	korelační koeficient
2-aminobifenyl	4·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁵	1,59·10 ⁵	0,00	0,9999
4-aminobifenyl	4·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁵	2,60·10 ⁵	-0,02	0,9997
1-aminonaftalen	4·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁵	5,79·10 ⁵	-0,07	0,9993
2-aminonaftalen	4·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁵	4,56·10 ⁵	-0,08	0,9997

Tab. 3.5 Meze stanovitelnosti a meze detekce 2-aminobifenylu, 4-aminobifenylu, 1-aminonaftalenu a 2-aminonaftalenu při stanovení pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí. Kolona LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a 0,01 mol dm⁻³ fosforečnanový pufr pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 µl roztoku směsi, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹, potenciál pracovní platinové mikrocyklindrické elektrody +1,0 V.

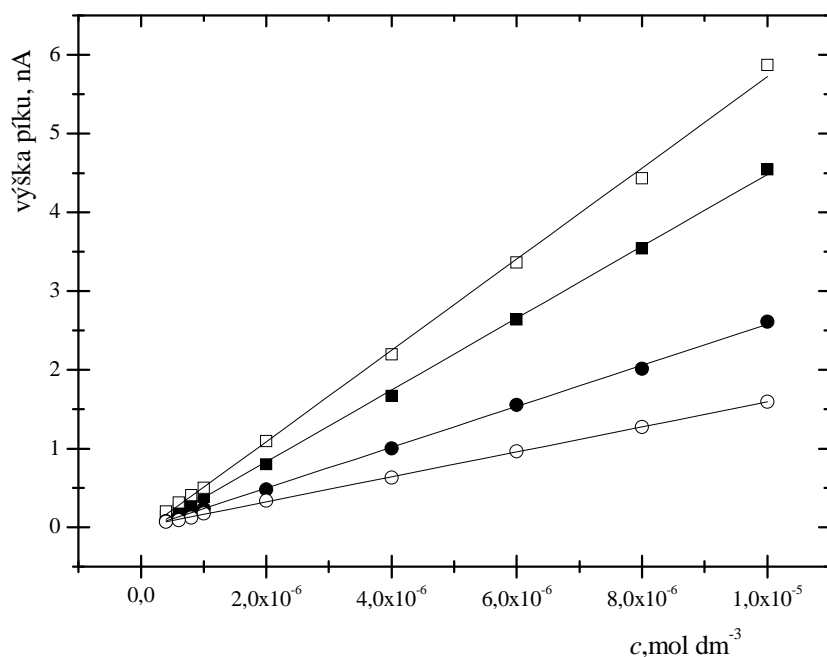
analyt	mez stanovitelnosti L _Q , mol dm ⁻³	mez detekce L _D , mol dm ⁻³
2-aminobifenyl	1,4·10 ⁻⁶	4,2·10 ⁻⁷
4-aminobifenyl	8,5·10 ⁻⁷	2,5·10 ⁻⁷
1-aminonaftalen	3,8·10 ⁻⁷	1,1·10 ⁻⁷
2-aminonaftalen	4,8·10 ⁻⁷	1,5·10 ⁻⁷



Obr. 3.15 Chromatogram směsi 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN změřený při koncentraci látek $c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm , 125 \times 4 mm, mobilní fáze acetonitril a 0,01 mol dm^{-3} fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkovaný objem 10 μl , průtoková rychlost 1,0 ml min^{-1} , potenciál vkládaný na pracovní platinovou mikrocylindrickou elektrodu +1,0 V.



Obr. 3.16 Závislost ploch píků na koncentraci 2-AB (○), 4-AB (●), 1-AN (□) a 2-AN (■). Kolona LiChrospher® 100 RP-18, 5 μm , 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a 0,01 mol dm^{-3} fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 μl roztoku směsi v mobilní fázi, průtoková rychlost 1,0 ml min^{-1} , potenciál vkládaný na pracovní platinovou mikrocyklindrickou elektrodu +1,0 V.



Obr. 3.17 Závislost výšek píků na koncentraci 2-AB (○), 4-AB (●), 1-AN (□) a 2-AN (■). Kolona LiChrospher® 100 RP-18, 5 μm , 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a 0,01 mol dm^{-3} fosforečnanový pufr pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 μl roztoku směsi v mobilní fázi, průtoková rychlost 1,0 ml min^{-1} , potenciál vkládaný na pracovní platinovou mikrocyklindrickou elektrodu +1,0 V.

3.2.4 Porovnání použitých detektorů

Pro porovnání ampérometrických detektorů s platinovou tubulární a platinovou mikrocyklindrickou elektrodou byla pro Pt tubulární detektor nově zpracována data získaná z bakalářské práce¹⁹, dále byla doměřena opakovatelnost výšky a plochy píků; pro Pt mikrocyklindrický detektor byla použita data získaná v rámci řešení této diplomové práce.

Pracovní charakteristiky detektorů byly určeny pomocí 2-AN o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Pro oba detektory byly použity stejné separační a detekční podmínky: Mobilní fáze o složení acetonitril a $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ fosforečnanový pufr pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), průtoková rychlost $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, potenciál vkládaný na pracovní platinovou elektrodu $+1,0 \text{ V}$. Vybrané charakteristiky píku 2-AN získané z deseti opakovaných nástřiků jsou shrnuty v tab. 3.6. Retenční čas 2-AN byl 3,0 min, retenční faktor 3,29. Chromatogramy směsi studovaných látek o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ každé složky v roztoku naměřené za stejných separačních a detekčních podmínek s platinovou tubulární a mikrocyklindrickou elektrodou je uveden na obr. 3.18. Z tabulky je zřejmé, že faktory ovlivňující citlivost detekce a meze detekce a stanovitelnosti jsou příznivější pro tubulární uspořádání, které vykazuje nižší šum, vyšší poměr signál/šum a vyšší proudovou hustotu než mikrocyklindrické uspořádání. Z porovnání mezi stanovitelnosti 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN v tab. 3.7 vyplývá, že hodnoty mezí stanovitelnosti jsou v případě platinové mikrocyklindrické elektrody přibližně o řád vyšší než v případě platinové tubulární elektrody.

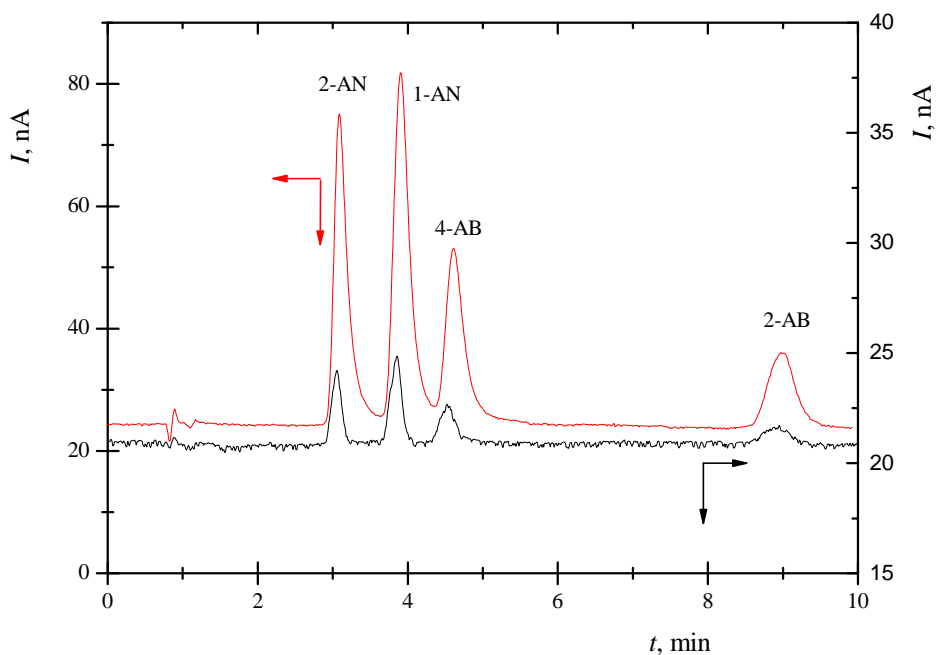
Na druhou stranu mikrocyklindrický detektor je výhodnější z hlediska účinnosti separace vzhledem k nižší šířce píku vedoucí k vyššímu počtu teoretických pater a nižší asymetrii píku. Ta se blíží žádané hodnotě pro ideální chromatografické separace 1.0 – 1.25.³⁵ Vyšší účinnost separace je zřejmá z hodnoty rozlišení píku 2-AN a 1-AN.

Vyšší hodnoty RSD získané pro platinový mikrocyklindrický detektor mohou být způsobeny nepřesným ručním dávkováním vzorků do dávkovací smyčky. Lze tak usuzovat z toho, že hodnoty RSD souběžně naměřené i při UV detekci byly stejně zvýšené, což pro UV detekci není standardní.

Tab. 3.6 Porovnání parametrů ampérometrického detektoru s platinovou tubulární a mikrocyklindrickou elektrodou. Parametry určeny pomocí 2-aminonaftalenu, mobilní fáze acetonitril a 0,01 mol dm⁻³ fosforečnanový pufr pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 µl o $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹, potenciál vkládaný na pracovní elektrodu +1,0 V.

analyt	Pt tubulární elektroda	Pt mikrocyklindrická elektroda
šířka píku [min]	0,236±0,005 ^a	0,162±0,025 ^a
počet teoretických pater N	840±43 ^a	2622±521 ^a
asymetrie píku	2,73±0,10 ^a	1,26±0,24 ^a
RSD ^b výšky píku [%]	2,56	5,92
RSD ^b plochy píku [%]	1,96	4,01
plocha elektrody [mm ²]	0,6	0,16
proudová hustota [nA mm ⁻²]	96,2	23,1
šum [pA]	97±15 ^a	328±54 ^a
poměr signál/šum S/N	595	11
rozlišení R 2-AN a 1-AN	1,84±0,06 ^a	2,94±0,32 ^a

^a směrodatná odchylka, ^b relativní směrodatná odchylka



Obr. 3.18 Chromatogramy směsi 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN změřené při koncentraci látek $c = 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ pro platinovou tubulární (červeně) a mikrocyklindrickou (černě) elektrodu. Kolona LiChrospher® 100 RP-18, $5 \mu\text{m}$, $125 \times 4 \text{ mm}$, mobilní fáze acetonitril a $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkovaný objem $10 \mu\text{l}$, průtoková rychlost $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, potenciál vkládaný na pracovní elektrodu +1,0 V.

Tab. 3.7 Porovnání mezí stanovitelnosti 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN při stanovení pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí. Kolona LiChrospher® 100 RP-18, $5 \mu\text{m}$, $125 \times 4 \text{ mm}$, mobilní fáze acetonitril a $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ fosforečnanový pufr pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno $10 \mu\text{l}$ roztoku směsi, průtoková rychlost $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, potenciál pracovní elektrody +1,0 V.

analyt	mezí stanovitelnosti $L_Q, \text{ mol dm}^{-3}$	
	Pt tubulární elektroda	Pt mikrocyklindrická elektroda
2-aminobifenyl	$8,9 \cdot 10^{-8}$	$1,4 \cdot 10^{-6}$
4-aminobifenyl	$5,4 \cdot 10^{-8}$	$8,5 \cdot 10^{-7}$
1-aminonaftalen	$2,6 \cdot 10^{-8}$	$3,8 \cdot 10^{-7}$
2-aminonaftalen	$3,0 \cdot 10^{-8}$	$4,8 \cdot 10^{-7}$

3.3 Extrakce na tuhé fázi

Optimalizovaná HPLC-ED metoda vyvinutá v bakalářské práci¹⁹ byla použita ke stanovení 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN v moči s využitím předběžné separace a prekoncentrace studovaných analytů pomocí metody extrakce na tuhé fázi.

3.2.1 Optimalizace extrakčních podmínek

Ke stanovení studovaných látek v moči s využitím metody extrakce na tuhé fázi bylo nutné nalézt optimální extrakční podmínky. K detekci v HPLC-ED byla vzhledem k vyšší citlivosti a nižším dosaženým mezím stanovitelnosti použita platinová tubulární elektroda. Důležitou roli hraje výběr tuhé fáze a eluční činidlo.

Vzhledem k charakteru látek byly na doporučení výrobce zvoleny extrakční kolonky LiChrolut[®] EN 200 mg/3 ml obsahující jako sorbent kopolymer ethylvinylbenzenu a divinylbenzenu. Tyto extrakční kolonky jsou vhodné pro stanovení širokého spektra analytů, např. herbicidů, pesticidů, uhlovodíků a potravinářských barviv v typických matricích – moč, plasma, environmentální matrice (pitná, odpadní voda, půda), potravinářské a drogistické produkty apod.⁴⁸

Při volbě elučního činidla se vycházelo z bakalářské práce Lucie Maixnerové⁵⁸, která se zabývala stanovením 2-aminobifenyly, 3-aminobifenyly (3-AB) a 4-aminobifenyly v pitné a říční vodě s využitím extrakce na tuhé fázi pomocí HPLC-ED s BDD elektrodou. V práci byla testována řada elučních činidel: Směs methanolu, acetonitrilu a acetonu v poměru 50:50:1 (V/V/V), směs acetonitrilu a 0,01 mol dm⁻³ fosforečnanového pufru o pH 1,5 v poměru 50:50 (V/V) a samotný diethylether. Nejlépe se z uvedených elučních činidel Maixnerové osvědčil diethylether, který poskytl nejvyšší výtěžek: Při eluci 10,0 ml diethyletheru bylo dosaženo výtěžku (reprodukovatelnosti) 69,0 % (RSD 5,8 %), 71,3 % (RSD 9,7 %) a 63,9 % (RSD 18,2 %) pro 2-AB, 3-AB a 4-AB.^{58, 59, 60}

Postup eluce látek zakoncentrovaných na extrakčních kolonkách v práci Maixnerové byl následující: Látky byly eluovány 10,0 ml diethyletheru, který byl následně odpařen odfoukáním dusíkem, k odparku byl poté přidán 1,0 ml mobilní fáze obsahující směs methanolu, acetonitrilu a 0,01 mol dm⁻³ octanového pufru o pH 5,0 v poměru 30:30:40 (V/V/V) a 20 µl připraveného roztoku bylo dávkováno do systému HPLC.

Pro zjednodušení extrakčního postupu, tj. vynechání odpařovacího kroku, byl v této diplomové práci jako eluent vyzkoušen acetonitril kvůli snadné rozpustnosti studovaných látek v tomto rozpouštědle. Příprava vzorků, aktivace extrakčních kolonek a dávkování vzorku bylo prováděno podle postupu uvedeného v pododdíle 2.4.3.

Celkový objem acetonitrilu potřebný k vymytí studovaných látek byl určen následujícím způsobem: 100 ml vzorku moči obsahující 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN o počáteční koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ mol dm^{-3} bylo po zakoncentrování analytů na kolonce eluováno postupně čtyřikrát 2,0 ml acetonitrilu. Každá ze čtyř frakcí byla poté samostatně analyzována a z vyhodnocených výšek pík bylo stanoveno procentuální zastoupení analytů v jednotlivých frakcích a celkový objem potřebný k vymytí látek z extrakční kolonky. Z výsledků je zřejmé, že k vymytí látek jsou dostačující 4,0 ml eluentu, kdy je eluováno 83,4 % 2-AB, 86,5 % 4-AB, 89,7 % 1-AN a 90,1 % 2-AN. Další zvyšování elučního objemu by vymylo pouze malé množství látek na úkor prekoncentračního faktoru. Ten má pro objem 4,0 ml acetonitrilu a pro teoretický 100% výtěžek hodnotu 25, tzn. že vzorek je 25krát prekoncentrován.

Reprodukovatelnost výtěžku extrakce vyjádřená pomocí relativní směrodatné odchylky byla stanovena pomocí analýzy tří modelových vzorků moči obsahující studované analyty o koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ mol dm^{-3} , výsledky jsou shrnuty v tabulce 3.8. Pro všechny analyty bylo dosaženo vysokých výtěžků v rozmezí 80 % – 88 % s reprodukovatelností do 2 %, což jsou v porovnání s metodou Maixnerové^{Chyba! Záložka není definována.} minimálně o 15 % vyšší výtěžky s výrazně lepší reprodukovatelností.

Tab. 3.8 Výtěžky extrakce a jejich reprodukovatelnost (vyjádřená pomocí relativní směrodatné odchylky) 2-aminobifenyly, 4-aminobifenyly, 1-aminonaftalenu a 2-aminonaftalenu ze 100,0 ml modelového vzorku moči, počáteční koncentrace analytů $1 \cdot 10^{-6}$ mol dm^{-3} . Eluce analytů pomocí 4,0 ml acetonitrilu. Vyhodnoceno pomocí HPLC-ED s pracovní platinovou tubulární elektrodou. Chromatografické podmínky viz obr. 3.11.

analyt	výtěžek [%]	RSD [%]
2-aminobifenyl	87,19	2,02
4-aminobifenyl	86,51	1,67
1-aminonaftalen	82,05	1,17
2-aminonaftalen	80,79	1,12

3.2.2 Kalibrační závislosti

Po optimalizaci extrakčních podmínek byly naměřeny kalibrační závislosti 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN pro stanovení v moči po předběžné separaci a prekoncentraci látek pomocí extrakce na tuhé fázi.

3.2.2.1 Platinová tubulární elektroda jako pracovní elektroda

Kalibrační závislosti studovaných látek v moči byly pro platinovou tubulární elektrodu proměřeny v koncentračním rozmezí od $2,5 \cdot 10^{-9}$ mol dm⁻³ do $1 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³.

Naměřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Parametry závislostí získané vyhodnocením příslušných ploch a výšek píků z naměřených chromatogramů jsou uvedeny v tab. 3.9 a 3.10. Dosažené meze stanovitelnosti L_Q a meze detekce L_D pro šum o velikosti 0,028 nA, jsou uvedeny v tab. 3.11. Chromatogramy 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN o koncentraci $2 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³ každé složky v roztoku je uveden na obr. 3.19. Kalibrační přímky vyhodnocené z ploch a dále z výšek píků v příslušném koncentračním rozmezí jsou na obr. 3.20 a 3.21.

Kalibrační závislosti jsou lineární v celé měřené oblasti koncentrací. Korelační koeficienty se pohybují v intervalu 0,9990 až 0,9999 pro vyhodnocení z výšek píků, pro vyhodnocení z ploch bylo dosaženo horší korelace. Nejnižší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u 1-AN, tj. $1,8 \cdot 10^{-9}$ mol dm⁻³, naopak nejvyšší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u 2-AN, tj. $5,7 \cdot 10^{-9}$ mol dm⁻³.

Tab. 3.9 Parametry kalibračních závislostí pro HPLC-ED stanovení 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN při SPE ze 100 ml modelového vzorku moči s elucí 4 ml acetonitrilu. Detekce na platinové tubulární elektrodě při potenciálu +1,0 V. Vyhodnoceno z ploch píků. Chromatografické podmínky viz obr. 3.11.

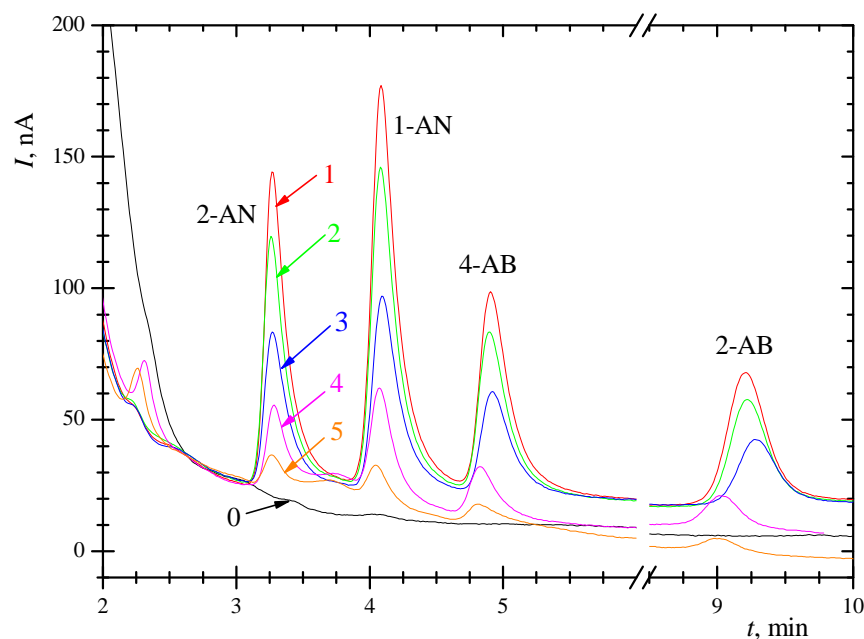
analyt	lineární dynamický rozsah, mol dm ⁻³	směrnice, nA s mol ⁻¹ dm ³	úsek, nA s	korelační koeficient
2-aminobifenyl	2,5·10 ⁻⁹ – 1·10 ⁻⁶	1,07·10 ⁹	-11,43	0,9994
4-aminobifenyl	2,5·10 ⁻⁹ – 1·10 ⁻⁶	1,32·10 ⁹	-11,43	0,9978
1-aminonaftalen	2,5·10 ⁻⁹ – 1·10 ⁻⁶	2,24·10 ⁹	-35,63	0,9990
2-aminonaftalen	2,5·10 ⁻⁹ – 1·10 ⁻⁶	1,47·10 ⁹	-11,53	0,9985

Tab. 3.10 Parametry kalibračních závislostí pro HPLC-ED stanovení 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN při SPE ze 100 ml modelového vzorku moči s elucí 4 ml acetonitrilu. Detekce na platinové tubulární elektrodě při potenciálu +1,0 V. Vyhodnoceno z výšek píků. Chromatografické podmínky viz obr. 3.11.

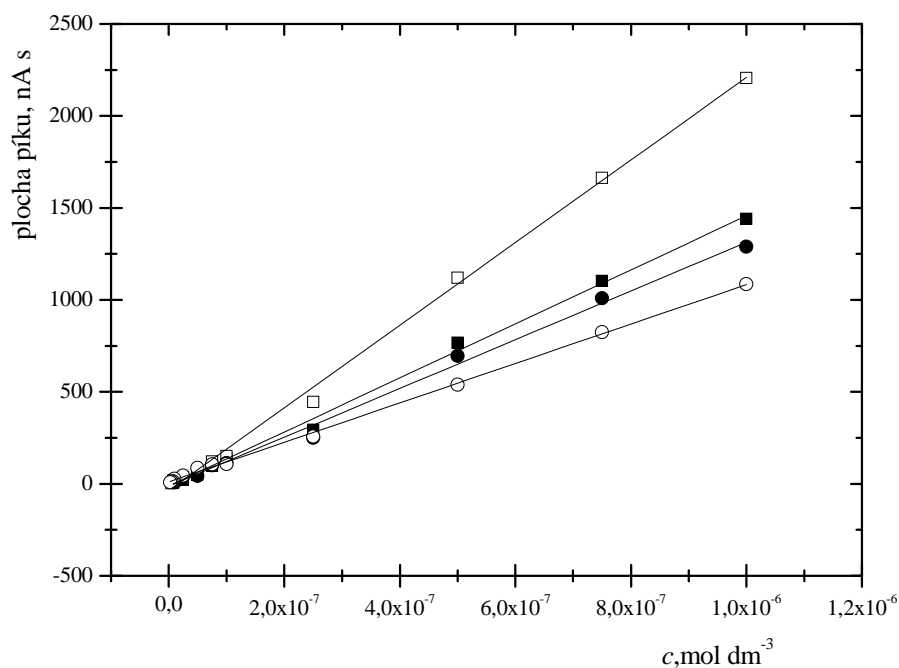
analyt	lineární dynamický rozsah, mol dm ⁻³	směrnice, nA mol ⁻¹ dm ³	úsek, nA	korelační koeficient
2-aminobifenyl	2,5·10 ⁻⁹ – 1·10 ⁻⁶	4,94·10 ⁷	0,62	0,9997
4-aminobifenyl	2,5·10 ⁻⁹ – 1·10 ⁻⁶	7,72·10 ⁷	-0,14	0,9990
1-aminonaftalen	2,5·10 ⁻⁹ – 1·10 ⁻⁶	1,53·10 ⁸	-0,80	0,9999
2-aminonaftalen	2,5·10 ⁻⁹ – 1·10 ⁻⁶	1,18·10 ⁸	-0,28	0,9995

Tab. 3.11 Meze stanovitelnosti a meze detekce pro HPLC-ED stanovení 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN při SPE ze 100 ml modelového vzorku moči s elucí 4 ml acetonitrilu. Detekce na platinové tubulární elektrodě při potenciálu +1,0 V. Chromatografické podmínky viz obr. 3.11.

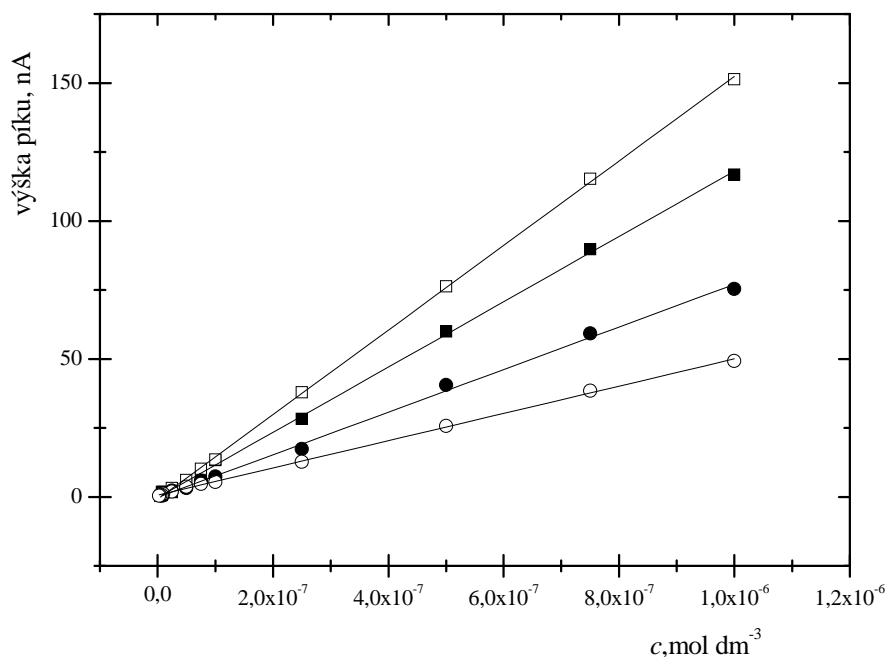
analyt	mez stanovitelnosti L_Q , mol dm ⁻³	mez detekce L_D , mol dm ⁻³
2-aminobifenyl	5,7·10 ⁻⁹	1,7·10 ⁻⁹
4-aminobifenyl	3,6·10 ⁻⁹	1,1·10 ⁻⁹
1-aminonaftalen	1,8·10 ⁻⁹	5,5·10 ⁻¹⁰
2-aminonaftalen	2,4·10 ⁻⁹	7,1·10 ⁻¹⁰



Obr. 3.19 Chromatogramy směsi 2-AN, 1-AN, 4-AB a 2-AB změřené při koncentraci látek 0 mol dm^{-3} (křivka 0), $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (křivka 1), $8 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ (křivka 2), $6 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ (křivka 3), $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ (křivka 4) a $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ (křivka 5) při SPE ze 100 ml modelového vzorku moči s elucí 4 ml acetonitrilu. Potenciál vkládaný na pracovní platinovou tubulární elektrodu +1,0 V. Chromatografické podmínky viz obr. 3.11.



Obr. 3.20 Závislost ploch píků na koncentraci pro HPLC-ED stanovení 2-AB (\circ), 4-AB (\bullet), 1-AN (\square) a 2-AN (\blacksquare) při SPE ze 100 ml modelového vzorku moči s elucí 4 ml acetonitrilu. Detekce na platinové tubulární elektrodě při potenciálu +1,0 V. Chromatografické podmínky viz obr. 3.11.



Obr. 3.21 Závislost výšek píků na koncentraci pro HPLC-ED stanovení 2-AB (○), 4-AB (●), 1-AN (□) a 2-AN (■) při SPE ze 100 ml modelového vzorku moči s elucí 4 ml acetonitrilu. Detekce na platinové tubulární elektrodě při potenciálu +1,0 V. Chromatografické podmínky viz obr. 3.11.

3.2.2.2 Platinová mikrocyklindrická elektroda jako pracovní elektroda

Kalibrační závislosti studovaných látek v moči byly pro platinovou mikrocyklindrickou elektrodu proměřeny v koncentračním rozmezí od $1 \cdot 10^{-8}$ mol dm^{-3} do $1 \cdot 10^{-6}$ mol dm^{-3} .

Naměřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Parametry závislostí získané vyhodnocením příslušných ploch a výšek píků z naměřených chromatogramů jsou uvedeny v tab. 3.12 a 3.13. Dosažené meze stanovitelnosti L_Q a meze detekce L_D pro šum o velikosti 0,022 nA, jsou uvedeny v tab. 3.14. Chromatogramy 2-AN, 1-AN, 4-AB a 2-AB o koncentraci $2 \cdot 10^{-7}$ až $1 \cdot 10^{-6}$ mol dm^{-3} každé složky v roztoku je uveden na obr. 3.22. Kalibrační přímky vyhodnocené z ploch a dále z výšek píků v příslušném koncentračním rozmezí jsou na obr. 3.23 a 3.24.

Kalibrační závislosti jsou lineární v celé měřené oblasti koncentrací. Korelační koeficienty se pohybují v intervalu 0,9990 až 0,9999 pro vyhodnocení z výšek píků. Nejnížší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u 1-aminonaftalenu, tj. $2,2 \cdot 10^{-8}$ mol dm^{-3} , naopak nejvyšší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u 2-aminobifenyly, tj. $7,5 \cdot 10^{-8}$ mol dm^{-3} .

V souladu s předchozí charakterizací tubulárního a mikrocyklindrického detektoru bylo v tomto případě dosaženo o řád horších detekčních limitů. Lze předpokládat, že mikrocyklindrický detektor by vzhledem k vyšší účinnosti separace našel uplatnění spíše v případě detekce hůře separovaných či vyššího počtu analytů.

Tab. 3.12 Parametry kalibračních závislostí pro HPLC-ED stanovení 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN při SPE ze 100 ml modelového vzorku moči s elucí 4 ml acetonitrilu. Detekce na platinové mikrocyklindrické elektrodě při potenciálu +1,0 V. Vyhodnoceno z ploch píků. Chromatografické podmínky viz obr. 3.11.

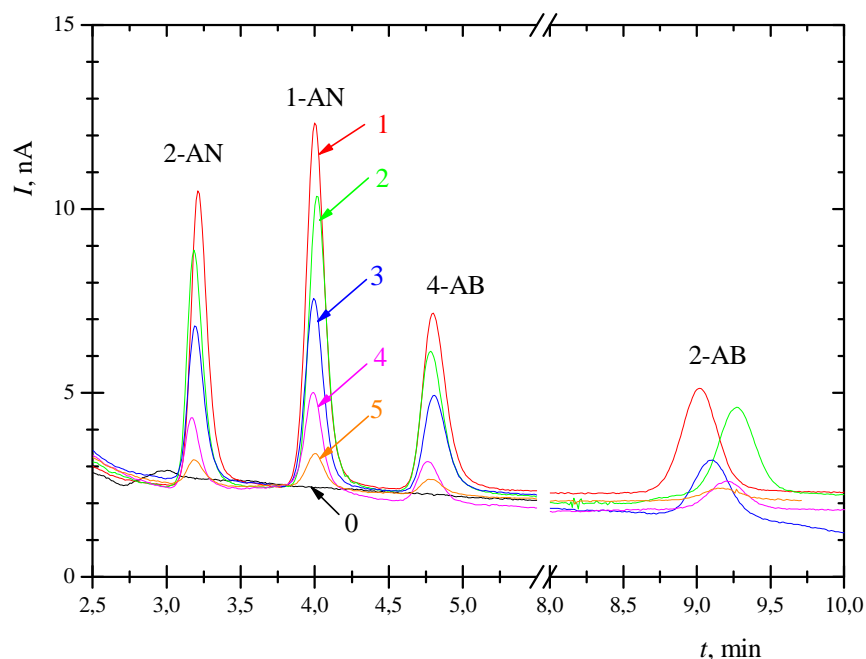
analyt	lineární dynamický rozsah, mol dm ⁻³	směrnice, nA s mol ⁻¹ dm ³	úsek, nA s	korelační koeficient
2-aminobifenyl	1·10 ⁻⁸ – 1·10 ⁻⁶	5,34·10 ⁷	1,38	0,9985
4-aminobifenyl	1·10 ⁻⁸ – 1·10 ⁻⁶	5,90·10 ⁷	-0,52	0,9989
1-aminonaftalen	1·10 ⁻⁸ – 1·10 ⁻⁶	9,36·10 ⁷	-0,22	0,9997
2-aminonaftalen	1·10 ⁻⁸ – 1·10 ⁻⁶	6,91·10 ⁷	-0,72	0,9995

Tab. 3.13 Parametry kalibračních závislostí pro HPLC-ED stanovení 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN při SPE ze 100 ml modelového vzorku moči s elucí 4 ml acetonitrilu. Detekce na platinové mikrocyklindrické elektrodě při potenciálu +1,0 V. Vyhodnoceno z výšek píků. Chromatografické podmínky viz obr. 3.11.

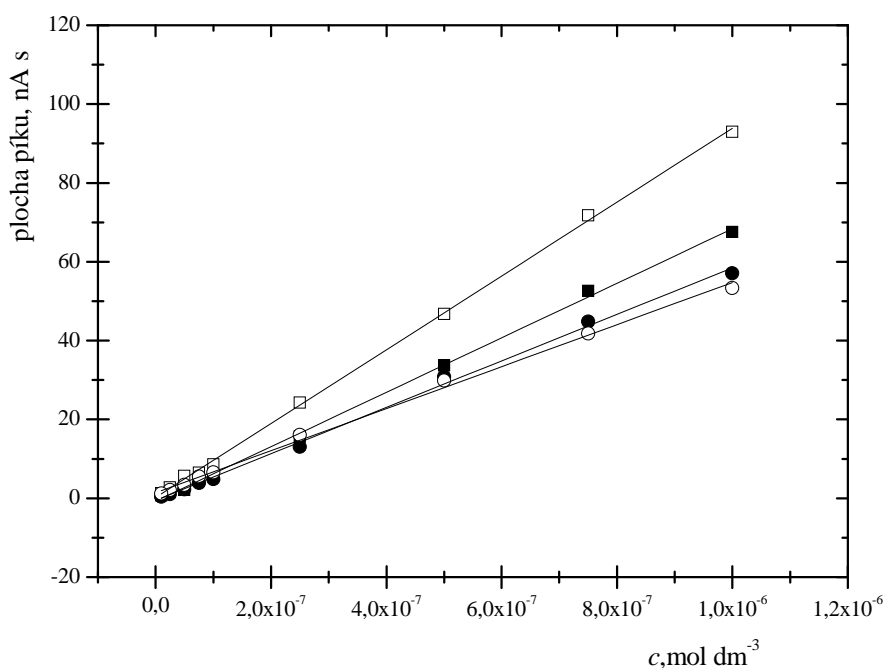
analyt	lineární dynamický rozsah, mol dm ⁻³	směrnice, nA mol ⁻¹ dm ³	úsek, nA	korelační koeficient
2-aminobifenyl	1·10 ⁻⁸ – 1·10 ⁻⁶	2,92·10 ⁶	0,05	0,9991
4-aminobifenyl	1·10 ⁻⁸ – 1·10 ⁻⁶	4,96·10 ⁶	-0,03	0,9983
1-aminonaftalen	1·10 ⁻⁸ – 1·10 ⁻⁶	1,01·10 ⁷	0,02	0,9995
2-aminonaftalen	1·10 ⁻⁸ – 1·10 ⁻⁶	8,35·10 ⁶	-0,09	0,9991

Tab. 3.14 Meze stanovitelnosti a meze detekce pro HPLC-ED stanovení 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN při SPE ze 100 ml modelového vzorku moči s elucí 4 ml acetonitrilu. Detekce na platinové mikrocyklindrické elektrodě při potenciálu +1,0 V Chromatografické podmínky viz obr. 3.11.

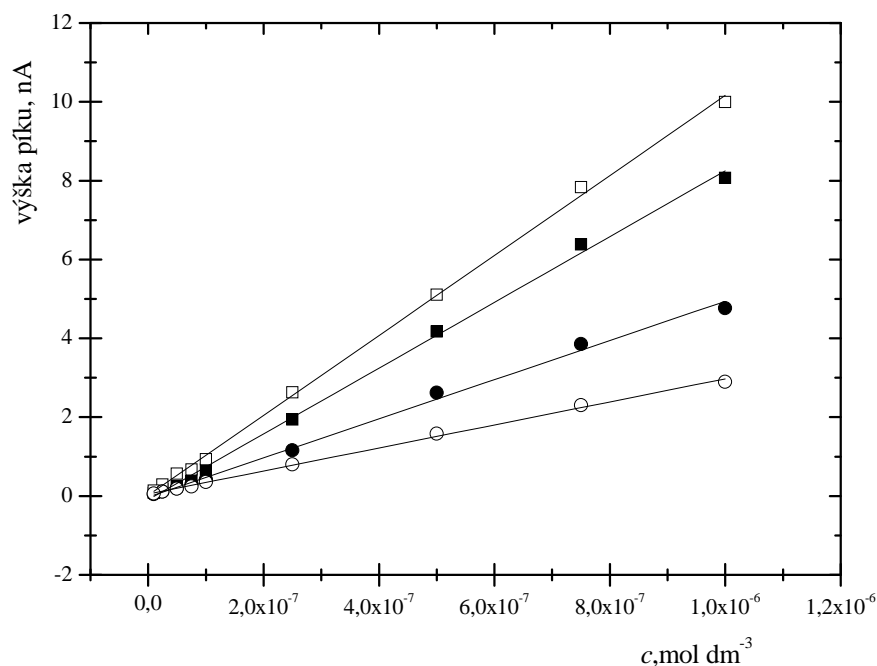
analyt	mez stanovitelnosti L _Q , mol dm ⁻³	mez detekce L _D , mol dm ⁻³
2-aminobifenyl	7,5·10 ⁻⁸	2,3·10 ⁻⁸
4-aminobifenyl	4,4·10 ⁻⁸	1,3·10 ⁻⁸
1-aminonaftalen	2,2·10 ⁻⁸	6,5·10 ⁻⁹
2-aminonaftalen	2,6·10 ⁻⁸	7,9·10 ⁻⁹



Obr. 3.22 Chromatogramy směsi 2-AN, 1-AN, 4-AB a 2-AB změřené při koncentraci látek 0 mol dm^{-3} (křivka 0), $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (křivka 1), $8 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ (křivka 2), $6 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ (křivka 3), $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ (křivka 4) a $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ (křivka 5) při SPE ze 100 ml modelového vzorku moči s elucí 4 ml acetonitrilu. Potenciál vkládaný na pracovní platinovou mikrocyklindrickou elektrodu $+1,0 \text{ V}$. Chromatografické podmínky viz obr. 3.11.



Obr. 3.23 Závislost ploch píků na koncentraci pro HPLC-ED stanovení 2-AB (\circ), 4-AB (\bullet), 1-AN (\square) a 2-AN (\blacksquare) při SPE ze 100 ml modelového vzorku moči s elucí 4 ml acetonitrilu. Detekce na platinové mikrocyklindrické elektrodě při potenciálu $+1,0 \text{ V}$. Chromatografické podmínky viz obr. 3.11.

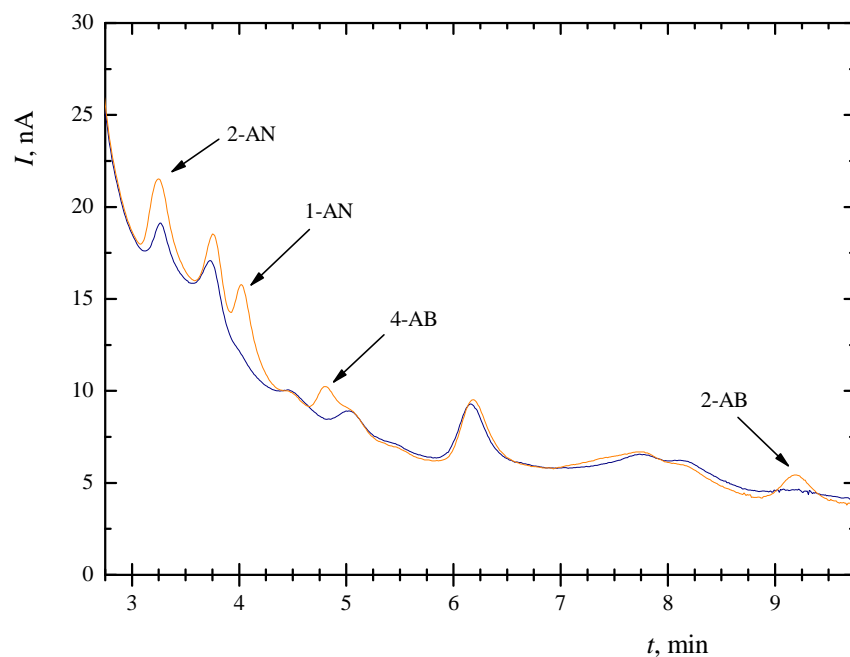


Obr. 3.24 Závislost výšek píků na koncentraci pro HPLC-ED stanovení 2-AB (○), 4-AB (●), 1-AN (□) a 2-AN (■) při SPE ze 100 ml modelového vzorku moči s elucí 4 ml acetonitrilu. Detekce na platinové mikrocylindrické elektrodě při potenciálu +1,0 V. Chromatografické podmínky viz obr. 3.11.

3.2.3 Reálný vzorek moči

Vyvinutá metoda extrakce na tuhé fázi byla dále využita pro stanovení 2-aminobifenylu, 4-aminobifenylu, 1-aminonaftalenu a 2-aminonaftalenu v moči kuřáka (cca 40 cigaret denně). Podmínky pro měření byly stejné jako v pododdíle 3.2.2.

Ve vzorku moči byl nalezen 2-AN srovnáním retenčního času píku a kvantifikován pomocí metody standardního přídatku. Chromatogramy vzorků moči kuřáka bez standardního přídatku a se standardním přídatkem $9,5 \mu\text{l}$ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ studovaných analytů je znázorněn na obr. 3.22. Koncentrace 2-AN ve vzorku byla vypočítána z výšek píků. Vypočítaná hodnota koncentrace 2-aminonaftalenu ve vzorku moči kuřáka činí $1,72 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$.



Obr. 3.22 Chromatogramy vzorků moči kuřáka po SPE ze 100 ml moči a eluci 4 ml acetonitrilu bez standardního přídatku (modře) a se standardním přídatkem (žlutě) 9,5 μl o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ studovaných analytů 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN. Chromatografické podmínky viz obr. 3.11, potenciál vkládaný na pracovní platinovou tubulární elektrodu +1,0 V.

4. Závěr

Bylo prostudováno elektrochemické chování 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN na stacionární platinové diskové elektrodě metodou cyklické voltametrie a diferenční pulsní voltametrie. Byl sledován vliv pH na signály analytů a pasivaci elektrodového povrchu. Celkově lze konstatovat, že voltametrické metody neposkytly pro stacionární diskovou platinovou elektrodu pro vodná prostředí příliš spolehlivé výsledky.

Platinová mikrocyklindrická elektroda byla použita jako pracovní elektroda ampérometrického detektoru. Byla prostudována závislost její odezvy na vloženém potenciálu. Měření probíhalo za optimálních podmínek separace. Pro detekci byl použit detekční potenciál $E_{\text{det}} + 1,0 \text{ V}$ vkládaný na pracovní elektrodu. Dále byla proměřena závislost odezvy detektoru na průtokové rychlosti mobilní fáze. Jako optimální byla vybrána průtoková rychlost 1 ml min^{-1} . Za těchto podmínek byly změřeny kalibrační závislosti a stanoveny meze stanovitelnosti jednotlivých látek, které činí $1,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ pro 2-AB, $8,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ pro 4-AB, $3,8 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ pro 1-AN a $4,8 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ pro 2-AN.

Při porovnání parametrů ampérometrického detektoru s platinovou tubulární a s platinovou mikrocyklindrickou elektrodou v HPLC bylo zjištěno, že faktory ovlivňující citlivost detekce a meze detekce a stanovitelnosti jsou příznivější pro tubulární uspořádání, na druhé straně mikrocyklindrické uspořádání je výhodnější z hlediska faktorů ovlivňujících účinnost separace.

Byla navržena metoda pro stanovení studovaných látek v moči s využitím předběžné separace a prekoncentrace studovaných analytů pomocí extrakce na tuhé fázi. Pro SPE byly vybrány kolonky LiChrolut® EN 200 mg/3 ml obsahující jako sorbent kopolymer ethylvinylbenzenu a divinylbenzenu. Jako eluční činidlo byl vybrán acetonitril. Pro eluční objem 4,0 ml acetonitrilu má prekoncentrační faktor hodnotu 25.

Vyvinutá metoda extrakce na tuhé fázi byla použita pro analýzu reálného vzorku moči kuřáka. Ve vzorku moči byl nalezen 2-AN srovnáním retenčního času píku a metodou standardního přídávku byla určena jeho koncentrace, která činí $1,72 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$.

5. Literatura

- 1 IARC *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, Vol. 1 – Some Inorganic Substances, Chlorinated Hydrocarbons, Aromatic Amines, *N*-Nitroso Compounds, and Natural Products. IARC, Lyon (1972).
- 2 Masson, H.A.; Ioannides, C.; Gorrod, J.W.; Gibson, G.G.: The role of highly purified cytochrome P-450 isozymes in the activation of 4-aminobiphenyl to mutagenic products in the Ames test. *Carcinogenesis* **4**, 1583 (1983).
- 3 Pai, V.; Bloomfield S.F.; Gorrod, J.W.: Mutagenicity of *N*-hydroxylamines and *N*-hydroxycarbamates towards strains of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research* **151**, 201 (1985). *CAN* **103**:155599
- 4 Chung, K.T.; Adris, P.: Growth inhibition of intestinal bacteria and mutagenicity of 2-, 3-, 4-aminobiphenyls, benzidine, and biphenyl. *Toxicology in Vitro* **17**, 145 (2003).
- 5 IARC *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, Vol. 4 – Some Aromatic Amines, Hydrazine and Related Substances, *N*-Nitroso Compounds and Miscellaneous Alkylating Agents. IARC, Lyon (1974).
- 6 Cheung, Y.; Lewis, D.F.V.; Ridd, T.I.; Gray, T.J.B.; Ioannides, C.: Diaminonaphthalenes and related aminocompounds: Mutagenicity, CYP1A induction and interaction with Ah receptor. *Toxicology* **118**, 115 (1997).
- 7 IARC *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, Vol. 4, Supplement 7. IARC, Lyon (1987).
- 8 Weiss, T.; Angerer J.: Simultaneous determination of various aromatic amines and metabolites of aromatic nitro compounds in urine for low level exposure using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography B* **778**, 179 (2002).
- 9 Brede C., Skjevraak I., Herikstad H.: Determination of primary aromatic amines in water food simulant using solid-phase analytical derivatization followed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of chromatography A* **983**, 35 (2003).
- 10 Lancaster, F.E.; Lawrence, J.F.: Determination of total nonsulfonated aromatic amines in soft drinks and hard candies by reduction and derivatization followed by high performance liquid chromatography. *Food Additives and Contaminants* **9**, 171 (1992).

-
- 11 Blanco M. H., Quintana M. C., Hernandez P., Vicente J., Hernandez L.: Isomeric transformation of 4-aminobiphenyl by UV radiation and its influence on the determination by flow injection analysis with amperometric and spectrophotometric detection. *Analytical Letters* **28**, 2683 (1995).
- 12 Turesky, R.J.; Freeman, J.P.; Holland, R.D.; Nestorick, D.M.; Miller, D.W.; Ratnasinghe, D.L.; Kadlubar, F.F.: Identification of aminobiphenyl derivatives in commercial hair dyes. *Chemical Research in Toxicology* **16**, 1162 (2003).
- 13 Hatch, F.T.; Knize, M.G.; Moore, D.H.; Felton, J.S.: Quantitative correlation of mutagenic and carcinogenic potencies for heterocyclic amines from cooked foods and additional aromatic amines. *Mutation Research* **271**, 269 (1992).
- 14 Johnson, D.E.; Cornish, H.H.: Metabolic conversion of 1- and 2-nitronaphthalene to 1- and 2-naphthylamine in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **46**, 549 (1978).
- 15 Moreira, J.C.; Barek, J.: Analysis of carcinogenic nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons - a review. *Quimica Nova* **18**, 362 (1995).
- 16 Jäger, J.: Detection and characterization of nitro derivatives of some polycyclic aromatic hydrocarbons by fluorescence quenching after thin-layer chromatography: application to air pollution analysis. *Journal of Chromatography* **152**, 575 (1978).
- 17 Rosenkranz, H.S.: Direct-acting mutagens in diesel exhausts: magnitude of the problem. *Mutation Research* **101**, 1 (1982). CAN **96**:156696
- 18 Stabbert, R.; Schäfer, K.H.; Biefel, C.; Rustemeier, K.: Analysis of aromatic amines in cigarette smoke. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17**, 2125 (2003).
- 19 Zavázalová, J.: Využití ampérometrické detekce v HPLC stanovení oxidovatelných derivátů polycyklických aromatických uhlovodíků. Bakalářská práce, PřF UK, Praha (2009).
- 20 Matsuzawa, S.; Garrigues, P.; Budzinski, H.; Bellocq, J.; Shimizu, Y.: Applicability of low temperature high-resolution fluorescence spectroscopy to the analysis of nitro and amino polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytica Chimica Acta* **312**, 165 (1995).
- 21 Barek, J.; Berka, A.; Müller, M.; Zima, J.: Analysis of chemical carcinogens. Part II. Determination of 4-nitrobiphenyl and 4-aminobiphenyl by controlled-potential coulometry, differential pulse polarography and differential pulse voltammetry. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **50**, 2853 (1985).

-
- 22 Barek, J.; Jandová, K.; Pecková, K.; Zima, J.: Voltammetric determination of aminobiphenyls at a boron-doped nanocrystalline diamond film electrode. *Talanta* **74**, 421 (2007).
- 23 Garrigós, M.C.; Reche, F.; Marín, M.L.; Jiménez, A.: Determination of aromatic amines formed from azo colorants in toy products. *Journal of Chromatography A* **976**, 309 (2002).
- 24 Otagawa, T.; Stetter, J.R.; Zaromb, S.: Portable liquid chromatograph for analysis of primary aromatic amines in coal-derived materials. *Journal of Chromatography* **360**, 252 (1986).
- 25 Zima, J.; Vaingátová, S.; Barek, J.; Břicháč, J.: HPLC monitoring of biphenyl derivatives with UV and electrochemical detection modes. *Chemia Analityczna* **48**, 805 (2003).
- 26 Lancaster, F. E.; Lawrence, J. F.: Determination of total non-sulfonated aromatic-amines in tartrazine, sunset yellow fcf and allura red by reduction and derivatization followed by high-performance liquid-chromatography. *Food Additives and Contaminants* **8**, 249 (1991).
- 27 Garrigós, M.C.; Reche, F.; Pernías, K.; Sánchez, A.; Jiménez, A.: Determination of some aromatic amines in finger-paints for children's use by supercritical fluid extraction combined with gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **819**, 259 (1998).
- 28 Zhou, Q. X.; Jiang, G. B.; Liu, J. F.; Cai, Y. Q.: Combination of microporous membrane liquid-liquid extraction and capillary electrophoresis for the analysis of aromatic amines in water samples. *Analytica Chimica Acta* **509**, 55 (2004).
- 29 Asthana, A.; Bose, D.; Durgbanshi, A.; Sanghi, S.K.; Kok, W.Th.: Determination of aromatic amines in water samples by capillary electrophoresis with electrochemical and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* **895**, 39 (2004).
- 30 Less, M.; Schmidt, T.C.; Low, E. von; Stork, G.: Gas chromatographic determination of aromatic amines in water samples after solid-phase extraction and derivatization with iodine, II. Enrichment. *Journal of Chromatography A* **810**, 173 (1998).
- 31 Schmidt, T.C.; Less, M.; Haas, R.; Low, E. von; Steinbach, K. ; Stork, G.: Gas chromatographic determination of aromatic amines in water samples after solid-phase extraction and derivatization with iodine. I. Derivatization. *Journal of Chromatography A* **810**, 161 (1998).

-
- 32 Chiang, T. A.; Wu, P. F.; Ying, L. S.; Wang, L. F.; Ko, Y. C.: Mutagenicity and Aromatic Amine Content of Fumes from Heated Cooking Oils Produced in Taiwan, *Food and Chemical Toxicology* **37**, 125 (1999).
- 33 Singh, V.; Gupta, M.; Jain, A.; Verma, K. K.: Determination of aromatic primary amines at $\mu\text{g l}^{-1}$ level in environmental waters by gas chromatography–mass spectrometry involving *N*-allyl-*N'*-arylthiourea formation and their on-line pyrolysis to aryl isothiocyanates. *Journal of Chromatography A* **1010**, 243 (2003).
- 34 Bhaskar, M.; Aruna, P.; Jeevan, R. J. G.; Radhakrishnan, G.: Cyclodextrin-polyurethane polymer as solid phase extraction material for the analysis of carcinogenic aromatic amines. *Analytica Chimica Acta* **509**, 39 (2004).
- 35 Shin, D. C.; Tryk, D. A.; Fujishima, A.; Muck, A.; Chen, G.; Wang, J.: Microchip capillary electrophoresis with a boron-doped diamond electrochemical detector for analysis of aromatic amines. *Electrophoresis* **25**, 3017 (2004).
- 36 Fogg, A. G.; Bsebsu, N. K.; Abdulla, M. A.: Indirect flow injection voltammetric determination of aromatic amines by monitoring at a glassy carbon electrode the excess of nitrite remaining after their diazotisation. *Analyst* **107**, 1462 (1982).
- 37 Fogg, A. G.; Ali, M. S.; Abdulla, M. A.: On-line bromimetric determination of phenol, aniline, aspirin and isoniazid using flow injection voltammetry. *Analyst* **108**, 840 (1983).
- 38 Concialini, V.; Chiavari, G.; Vitali, P.: Electrochemical detection in high-performance liquid chromatographic analysis of aromatic amines. *Journal of Chromatography* **258**, 244 (1983).
- 39 Varney, M. S.; Preston, M. R.: Measurement of trace aromatic amines in seawater using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography* **348**, 265 (1985).
- 40 Štulík, K.; Pacáková, V.: Elektroanalytická měření v proudících kapalinách. SNTL, Praha 1989.
- 41 Cvačka, J.; Opekar, F.; Barek, J.; Zima, J.: An amperometric detector with a platinum tubular electrode for high performance liquid chromatography. *Electroanalysis* **12**, 39 (2000).
- 42 Pecková, K.; Mocko, V.; Opekar, F.; Swain, G.M.; Zima, J.; Barek, J.: Miniaturizované ampérometrické detektory pro HPLC a kapilární zónovou elektroforézu. *Chemické Listy* **100**, 124 (2006).

-
- 43 <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>, staženo 12.5.2011.
- 44 Mocko, V.: A contribution to the determination of naphthalene and its amino, hydroxy and nitro derivatives using HPLC and CZE. Disertační práce, PřF UK, Praha (2004).
- 45 Shelke, M.; Sanghi, S. K.; Asthana, A.; Lamba, S.; Sharma, M.: Fast separation and sensitive detection of carcinogenic aromatic amines by reversed-phase-liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A* **1089**, 52 (2005).
- 46 Garrigós, M.C.; Reche, F.; Pernías., K.; Sánchez, A.; Jiménez, A.: Determination of some in finger paints for children's use by supercritical fluid extraction combined with gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **819**, 259-266 (1998).
- 47 Cvačka, J.: Příspěvek ke stanovení nitroderivátů a aminoderivátů naftalenu a bifenyly kapalinovou chromatografií. Disertační práce, PřF UK, Praha (2001).
- 48 *ChromBook 2008/2009, Chromatography at Merck – Experience Drives Innovation*, p. 25. Merck, Darmstadt (2008).
- 49 Mitadera, M.; Spataru, N.; Fujishima, A.: Electrochemical oxidation of aniline at boron-doped diamond electrodes. *Journal of Applied Electrochemistry* **34**, 249 (2004).
- 50 Adams, R. N.: *Electrochemistry at Solid Electrodes*, Marcel Dekker, New York 1969.
- 51 Dinh, H. N.; Vanysek, P.; Birss, V. J.: The Effect of Film Thickness and Growth Method on Polyaniline Film Properties. *Journal of The Electrochemical Society* **146**, 3324 (1999).
- 52 Ferancová, A.; Korgová, E.; Labuda, J.; Zima, J.; Barek, J.: Cyclodextrin modified carbon paste based electrodes as sensors for the determination of carcinogenic polycyclic aromatic amines. *Electroanalysis* **14**, 1668 (2002).
- 53 Peckova, K.; Musilova, J.; Barek, J.: Boron-Doped Diamond Film Electrodes – New Tool for Voltammetric Determination of Organic Substances. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **39**, 148-172 (2009).
- 54 Guay, J.; Dao, L. H.: J.: Formation of poly(4-phenylaniline) by electropolymerization of 4-aminobiphenyl or diphenylamine. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **274**, 135-142 (1989).
55. Denchev, Z.; Nikolov, N.: Flow-injection analysis with a small cylindrical wire type electrode. *Central European Journal of Chemistry* **2**, 480-490 (2004)

-
- 56 Cvacka, J.; Swain, G. M.; Barek, J.; Zima, J.: Stanovení aminonaftalenů a aminobifenylů kapalinovou chromatografií s amperometrickou detekcí na diamantové filmové elektrodě. *Chemické Listy* **96**, 33 (2002).
- 57 Zima J., Dejmková H., Barek J.: HPLC determination of naphthalene amino derivatives using electrochemical detection at carbon paste electrodes. *Electroanalysis* **19**, 185-190 (2007).
- 58 Maixnerová, L.: HPLC separace aminoderivátů bifenyly s elektrochemickou detekcí. Bakalářská práce, PřF UK, Praha 2008
- 59 Peckova, K.; Jandova, K.; Maixnerova, L.; Swain, G. M.; Barek, J.: Amperometric Determination of Aminobiphenyls Using HPLC-ED with Boron-Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis* **21**, 316 (2009).
- 60 Maixnerova, L.; Peckova, K.; Barek, J.; Klimova, H.: Stanovení aminobifenylů v pitné vodě a v říční vodě HPLC s elektrochemickou detekcí pomocí borem dopované diamantové filmové elektrody. *Chem. Listy* **104**, 191 (2010).