

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

VYUŽITÍ AMPÉROMETRICKÉ DETEKCE V HPLC
STANOVENÍ OXIDOVATELNÝCH DERIVÁTŮ
POLYCYKLICKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ

Amperometric detection in HPLC determination of oxidizable
derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons

Bakalářská práce
studijního oboru Chemie v přírodních vědách

Praha 2009

Jaroslava Zavázalová

Tato bakalářská práce vznikla s finanční podporou MŠMT ČR (projekt MSM 0021620857 a LC 06035).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Karolíny Peckové, Ph.D. a konzultantky Mgr. Hany Dejmkové a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne 4. září 2009.

.....
Jaroslava Zavázalová

Velmi ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Karolině Peckové, Ph.D. a své konzultantce Mgr. Hance 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.

Dále bych poděkovala své rodině za podporu a vytvoření podmínek pro moje studium. Díky patří i mému příteli Bc. Jiřímu Bártovi (nejen) za obrovskou psychickou podporu, kterou mi každý den poskytoval. Mé díky si zaslouží také Bc. Lucka Ducháčková za poskytnutí prostoru a klidu ve své hlučné laboratoři.

Předmětová hesla:

analytická chemie

elektroanalytická chemie

separační metody

Klíčová hesla:

2-aminobifenylyl

4-aminobifenylyl

1-aminonaftalen

2-aminonaftalen

ampérometrie

elektrochemická detekce

platinový tubulární detektor

vysokoučinná kapalinová chromatografie

Obsah

Seznam použitých zkratk	6
1. Úvod	7
1.1 Cíl práce	7
1.2 Biologické účinky, vznik a výskyt derivátů bifenyly a naftalenu	8
1.3 Metody stanovení derivátů bifenyly a naftalenu	10
1.4 Tubulární ampérometrický detektor	12
2. Experimentální část	14
2.1 Reagencie	14
2.2 Přehled studovaných látek	15
2.3 Aparatura	16
2.4 Použité vzorce	17
2.5 Pracovní postupy	18
2.5.1 Optimalizace separace	18
2.5.2 Elektrochemická detekce	18
2.5.3 Kalibrační závislosti	19
3. Výsledky a diskuze	20
3.1 Optimalizace separace	20
3.1.1 Vliv pH	20
3.1.2 Vliv koncentrace acetonitrilu	23
3.2 Optimalizace elektrochemické detekce	26
3.3 Kalibrační závislosti	28
3.3.1 Spektrofotometrická detekce	28
3.3.2 Elektrochemická detekce	32
4. Závěr	36
5. Literatura	37

Seznam použitých zkratk

2-AB	2-aminobifenyl
4-AB	4-aminobifenyl
1-AN	1-aminonaftalen
2-AN	2-aminonaftalen
A	absorbance
AU, mAU	jednotky absorbance
BDDFE	bórem dopovaná diamantová filmová elektroda
<i>c</i>	molární koncentrace
C.A.S.	Chemical Abstract Services
DAD	diode array detektor (detektor s diodovým polem)
<i>E</i>	potenciál
ED	elektrochemická detekce
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>I</i>	proud
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
<i>k</i>	retenční faktor
L_D	mez detekce
L_Q	mez stanovitelnosti
M_r	relativní molární hmotnost
p.a.	pro analýzu
$R_{1,2}$	rozlišení píků
<i>t</i>	čas
t_r	retenční čas
t_M	mrtvý čas
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra
<i>w</i>	šířka píku při základně

1. Úvod

1.1 Cíl práce

Tato bakalářská práce byla vypracována v rámci širšího projektu věnovaného metodám stanovení nitro- a aminoderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků, který probíhá v UNESCO laboratoři elektrochemie životního prostředí. Práce se zabývá HPLC separací 2-aminobifenyly, 4-aminobifenyly, 1-aminonaftalenu a 2-aminonaftalenu a jejich ampérometrickou detekcí na platinové tubulární elektrodě.

Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou v životním prostředí rozšířené díky průmyslovému a technickému rozvoji. Bylo identifikováno více než 500 různých polycyklických aromatických uhlovodíků. Vzhledem k prokázané souvislosti mezi profesionální expozicí a zvýšeným výskytem rakoviny u těchto látek¹, je nutné sledovat jejich výskyt v pracovním a životním prostředí člověka.

Cílem této bakalářské práce byla optimalizace separace směsi 2-aminobifenyly, 4-aminobifenyly, 1-aminonaftalenu a 2-aminonaftalenu na koloně s reverzní fází. Dále se tato práce zabývala optimalizací podmínek pro elektrochemickou detekci studovaných látek na platinové tubulární elektrodě a porovnáním s UV detekcí.

1.2 Biologické účinky, vznik a výskyt derivátů bifenyly a naftalenu

Polycyklickým aromatickým uhlovodíkům jsou přisuzovány karcinogenní, mutagenní a teratogenní účinky. Studium karcinogenity vybraných zástupců polycyklických aromatických uhlovodíků a jejich derivátů a vývojem metod pro jejich likvidaci se zabývá Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) se sídlem v Lyonu².

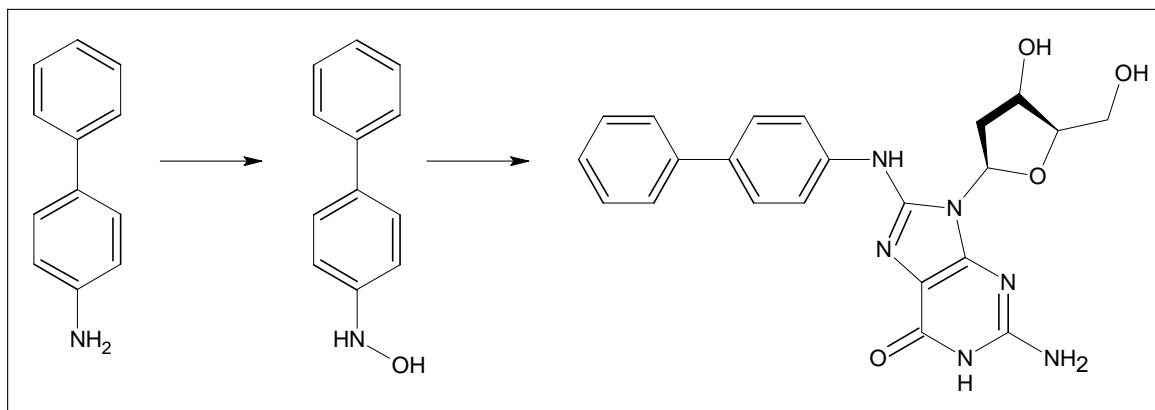
U 2-aminobifenyly mutagenita prokázána nebyla³ a IARC se jím nezabývala. 4-aminobifenyl byl v roce 1972 na základě průkazných epidemiologických studií a testů na zvířatech zařazen mezi prokázané karcinogeny (dle IARC skupina 1, látky prokazatelně karcinogenní pro člověka)⁴. Kromě prokázané karcinogenity je 4-aminobifenyl také vysoce mutagenní^{5,6}. U 1-aminonaftalenu byly prokázány slabé mutagenní účinky⁷ a IARC byl zařazen do skupiny 3 (není možno klasifikovat jako karcinogenní pro člověka)⁸. 2-aminonaftalen je prokázaný karcinogen (skupina 1)⁹.

Aminoderiváty bifenyly jsou toxické při požití, vdechování a styku s kůží. Hrozí u nich nebezpečí kumulativních účinků, mohou vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí¹⁰. Ke zvýšenému vystavení jejich účinků přispívá kouření cigaret a permanentní používání barev na vlasy^{11,12}. Aminoderiváty bifenyly současně představují metabolity dalších genotoxických polutantů – nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků¹³ a tudíž mohou sloužit jako indikátory míry expozice těmto nebezpečným látkám např. v pracovním prostředí¹⁴.

4-aminobifenyl způsobuje rakovinu močového měchýře, pravděpodobně i ledvin a močových cest obecně. Od 50. let 20. století se nadále průmyslově nevyrábí. Do životního prostředí se dostává především v cigaretovém kouři⁴, uvolňuje se spalováním fosilních paliv¹⁵ a může vznikat deaminací benzidinu z azobarviv účinkem střevní mikroflóry¹⁶. Stopy 4-aminobifenyly a 2-aminobifenyly byly nalezeny v difenylaminu, který se používal jako pesticid např. na jablka a hrušky^{17,18}.

V organismu probíhají složité biotransformační procesy vedoucí k detoxifikaci a vyloučení aminobifenyly z organismu, případně jejich acetylovaných forem. Může však dojít i k metabolické aktivaci, při které je oxidována aminoskupina za vzniku *N*-hydroxyarylamínů¹⁹. Tyto reakce probíhají enzymaticky za účasti jaterního cytochromu P-450 (*N*-hydroxylace) a acetyltransferasy²⁰. Metabolizované formy vedou k vytvoření nestabilního nitreniového iontu, ochotného reagovat s nukleofilními centry molekul DNA

za tvorby aduktů²¹. V případě metabolizace 4-aminobifenyly 80 % z těchto *in vivo* vznikajících aduktů činí *N*-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-4-AB²². Schéma celého procesu je uvedeno na obr. 1.1.



Obr. 1.1 Vznik aduktu 4-AB-DNA.

Aminoderiváty naftalenů jsou toxické při vdechování, styku s kůží a při požití, hrozí nebezpečím kumulativních účinků¹.

2-aminonaftalen způsobuje rakovinu močového měchýře⁸. Studované aminoderiváty naftalenu se do životního a pracovního prostředí dostávají nedokonalým spalováním a pyrolýzou fosilních paliv a dalších organických materiálů²³. Mohou se vyskytovat v prostředí díky průmyslové výrobě barviv, buď prostřednictvím finálních výrobků nebo z odpadu při výrobě²⁴. Použití 2-aminonaftalenu při výrobě barviv je pro jeho vysokou nebezpečnost již omezeno. 2-aminonaftalen vzniká také při tepelné úpravě potravin²⁵. 1- a 2-aminonaftalen mohou sloužit jako ukazatele míry expozice nitroderivátům naftalenu, které se vyskytují ve znečištěném ovzduší^{26,27} a tabákovém dýmu²⁸, a které se na aminoderiváty naftalenu metabolizují²⁹. U nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků dochází k redukci jaterními nitroreduktasami za vzniku sloučenin indukujících tvorbu methemoglobinu, např. nitrosoderivátů nebo *N*-hydroxylaminů. Ty jsou dále metabolizovány až na odpovídající aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků, které jsou vylučovány močí ve volné formě či po acetylaci³⁰.

1.3 Metody stanovení derivátů bifenyly a naftalenu

Polycyklické aromatické uhlovodíky se sledují nejen v environmentálních matricích, jako jsou např. vzorky půdy, vzduchu a odpadních vod, ale i v biologických matricích, např. v tělních tekutinách.

Ke stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků a jejich derivátů se používá řada instrumentálních metod, např. spektrometrické a elektrochemické, nad kterými však převládají metody separační, především chromatografické³⁰.

Nejvýznamnější spektrometrickou metodou používanou k analýze aminobifenyly a aminonaftalenů je spektrofotometrie, přičemž nejvíce prací je věnováno 1-aminonaftalenu. Výhodou spektrofotometrického stanovení je jednoduchost, snadná dostupnost instrumentace i poměrně nízká cena analýzy³¹. Spektrofotometrická detekce je nejvyžívanějším druhem detekce při HPLC stanovení studovaných derivátů. Ostatní spektrometrické metody jsou k analýze aminobifenyly a aminonaftalenů používány méně často, např. fluorescenční spektroskopie je využívána pro svou vysokou citlivost³².

Aminoderiváty bifenyly a naftalenu lze snadno elektrochemicky oxidovat, a proto připadají v úvahu i elektrochemické metody. Z těchto metod lze vyzdvihnout voltametrické metody stanovení aminoderivátů bifenyly a naftalenu s využitím elektrody ze skelného uhlíku^{33,34}, uhlíkové pastové elektrody modifikované α -, β - nebo γ -cyklodextrinem a uhlíkové tištěné elektrody³⁵, nebo bórem dopované diamantové filmové elektrody³⁶.

Chromatografické metody jsou často používány vzhledem k jejich mimořádné selektivitě, citlivosti a vhodnosti pro sériové analýzy. K jejich nevýhodám patří vysoká pořizovací a provozní cena spojená s velkou spotřebou těkavých a poměrně drahých organických rozpouštědel. Mezi nejpoužívanější chromatografické metody patří tenkovrstvá chromatografie³⁷, plynová chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. K detekci studovaných látek v plynové chromatografii je možné použít např. hmotnostní detektor^{20,38,39}, plamenově-ionizační detektor⁴⁰ nebo i detektor elektronového záchytu⁴¹. Přehled vybraných prací zabývajících se stanovením aminoderivátů bifenyly a naftalenu metodou HPLC je uveden v tab. 1.1.

Tab. 1.1 Přehled vybraných prací zabývajících se stanovením aminoderivátů bifenyly a naftalenu metodou HPLC.

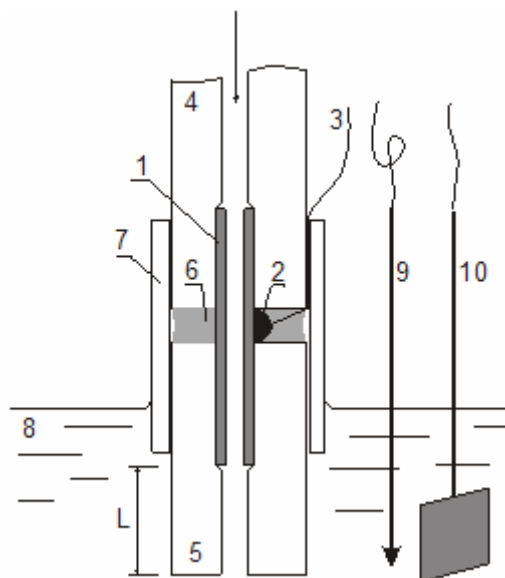
analyt	detekce	mez detekce L_D , mol dm ⁻³	citace
4-AB, 2-AN	UV	–	42
2-AB, 4-AB, 2-AN	ED: GCE	–	43
2-AB, 4-AB, 1-AN, 2-AN	ED: GCE	2-AB: $1,6 \cdot 10^{-7}$ 4-AB: $5,0 \cdot 10^{-8}$ 1-AN: $3,4 \cdot 10^{-8}$ 2-AN: $3,8 \cdot 10^{-8}$	44
4-AB, 1-AN, 2-AN	ED: elektroda z uhlíkových vláken	4-AB: $9,8 \cdot 10^{-9}$ 1-AN: $1,5 \cdot 10^{-8}$ 2-AN: $9,4 \cdot 10^{-8}$	45
4-AB, 1-AN, 2-AN	ED: GCE	–	46
2-AB, 1-AN	ED: BDDFE GCE	1-AN: $1,3 \cdot 10^{-7}$ 2-AB: $1,2 \cdot 10^{-7}$ 1-AN: $6,4 \cdot 10^{-7}$ 2-AB: $8,2 \cdot 10^{-7}$	47
4-AB, 2-AN	UV	–	48
4-AB, 2-AN	DAD	–	49
2-AB, 4-AB	ED: GCE	$6,0 \cdot 10^{-9}$	18
2-AB, 4-AB	ED: platinová tubulární elektroda	2-AB: $2,4 \cdot 10^{-8}$ 4-AB: $2,7 \cdot 10^{-8}$	50
2-AB, 4-AB	ED: BDDFE	2-AB: $2,0 \cdot 10^{-7}$ 4-AB: $5,1 \cdot 10^{-7}$	51
1-AN, 2-AN	VIS	–	52
1-AN, 2-AN	ED: uhlíková pastová elektroda	1-AN: $1,0 \cdot 10^{-7}$ 2-AN: $3,6 \cdot 10^{-8}$	53
1-AN, 2-AN	UV	–	54
1-AN, 2-AN	ED: platinová mikrocylindrická elektroda	1-AN: $1,1 \cdot 10^{-7}$ 2-AN: $7,8 \cdot 10^{-8}$	55

1.4 Tubulární ampérometrický detektor

Je poměrně obtížné zkonstruovat ampérometrický detektor tak, aby splňoval chromatografické podmínky (tj. objem detekční cely by měl být co nejmenší, tak aby nepřispíval k rozmývání píků v detektoru) i elektrochemické podmínky (tj. jednotlivé elektrody by měly být umístěny tak, aby vzniklo homogenní elektrické pole a potenciál pracovní elektrody byl konstantní a co nejlépe definovaný)⁵⁶. Jejich přípravou v různém uspořádání se zabývalo několik autorů.

Štulík a kol. popsal ampérometrický detektor s tubulární platinovou elektrodou, která je tvořena platinovým plechem s vrtaným otvorem⁵⁷. Blaedel a kol. měřil pomocí tubulární elektrody tvořené platinovou nebo zlatou trubičkou (vnitřní průměr 1,4 mm) vliv koncentrace analytu, pH, iontové síly, vloženého potenciálu a čištění na limitní proud tubulárního detektoru⁵⁸. Tubulární ampérometrický detektor použil ke stanovení stopových množství fenolů Armentrout a kol., kde teflonové tělo použitého detektoru obsahovalo grafitovou kompozitní tubulární elektrodu⁵⁹. Li a kol. použil v kapilární kapalinové chromatografii tubulární elektrodu, která byla vytvořena chemickou depozicí platiny na vnitřní stěně křemenné kapiláry⁶⁰.

Konstrukce detektoru, který byl používán v této práci, byla vyvinuta Cvačkou a při přípravě byl použit následující postup. Platinová trubička byla pomocí skalpelu uříznuta tak, aby její délka činila 15,0 mm. Konce platinové trubičky byly zabroušeny metalografickým papírem a přibližně v jedné třetině trubičky byl na povrch připájen tenký měděný drátek (kontakt). Pomocí horkovzdušné pistole byly na oba konce trubičky nasazeny teflonové kapiláry (na delší stranu kapilára o délce 83 mm, na kratší stranu o délce 16 mm). Na konec s delší teflonovou kapilárou byl nasazen průchozí šroub a teflonová ferule pro připojení ke kapalinovému chromatografu. Prostor mezi teflonovými kapilárami byl vyplněn epoxidovou pryskyřicí. Přes část platinové trubičky s vyvedeným kontaktem byla přetažena teplem se stahující izolace a pomocí horkovzdušné pistole utěsněna tak, aby nedocházelo k nežádoucímu kontaktu s roztokem⁶¹. Pracovní elektroda byla spolu s referentní a pomocnou elektrodou ponořena v přepadové nádobce s mobilní fází. Elektrody byly připojeny v tříelektrodovém zapojení k potenciostatu ADLC2. Schéma uspořádání elektrod je znázorněno na obr. 2.1³¹.



Obr. 2.1 Schéma elektrochemického tubulárního detektoru: 1 – platinová trubička, 2 – cínová pájka, 3 – kontaktní drátek k platinové trubičce, 4 a 5 – teflonová kapilára (vnitřní průměr 180 μm) tvořící výtok z kolony, 6 – epoxidová pryskyřice, 7 – stahující izolace, 8 – roztok elektrolytu v nádobce s přepadem, 9 – referentní elektroda, 10 – pomocná elektroda, L – teflonový stínící rukávek.

Přes jednoduchost konstrukce pracovní elektrody je detekce spolehlivá, vysoce citlivá a reprodukovatelná. Přes velké fyzické rozměry je její efektivní objem malý, protože část elektrody, na které skutečně probíhá elektrochemická reakce, je pouze malou částí celé elektrody. Efektivní objem lze ovlivňovat délkou teflonového stínícího rukávku. Při nulové délce rukávku dochází ke stínění vnitřních stěn elektrody samotnou platinovou elektrodou pokrytou teflonem tak, že pouze její 1/10 je schopna elektrochemické detekce. Prodlužováním teflonového rukávku dochází k efektivnějšímu stínění a tím více klesá efektivní plocha (objem i délka) detektoru. Efektivní objem detektoru s 11mm teflonovým stínícím rukávkem tak dosahuje pouze 1/100 jeho geometrického objemu. Tubulární detektory, ať už s teflonovým stínícím rukávkem nebo bez něj, mají dostatečně nízký efektivní objem pro detekci v klasické i kapilární HPLC³¹.

2. Experimentální část

2.1 Reagencie

Studované látky:

2-aminobifenyl (97%, Sigma-Aldrich)

4-aminobifenyl (97%, Sigma-Aldrich)

1-aminonaftalen (98%, Aldrich)

2-aminonaftalen (95%, Sigma-Aldrich)

Ostatní chemikálie:

- acetonitril (LiChrosolv[®] gradient grade, Merck, Německo)
- methanol (čistota p.a., Merck, Německo)
- hydrogenfosforečnan sodný (Lachema, Brno, Česká republika)
- kyselina fosforečná (85%, čistota p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- kyselina sírová (96%, Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- hexakynoželeznatan draselný (Lachema, Brno, Česká republika)
- deionizovaná voda (Millipore Q-plus System, Millipore, USA)

2.2 Přehled studovaných látek

2-aminobifenyl

C.A.S. Name: 2-Aminobiphenyl

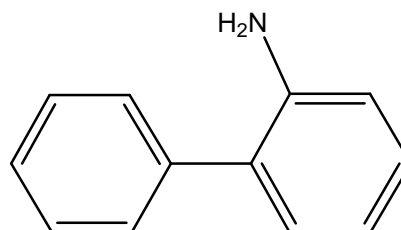
C.A.S. Registry Number: 90-41-5

$C_{12}H_{11}N$

$M_r = 169,23$

zkratka: 2-AB

$pK_A = 3,82$ (22 °C)



4-aminobifenyl

C.A.S. Name: 4-Aminobiphenyl

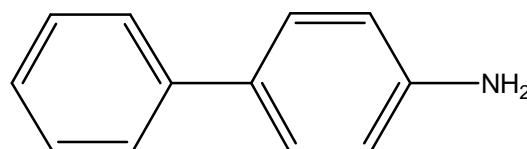
C.A.S. Registry Number: 92-67-1

$C_{12}H_{11}N$

$M_r = 169,23$

zkratka: 4-AB

$pK_A = 4,22$ (29 °C)



1-aminonaftalen

C.A.S. Name: 1-Naphthalenamine

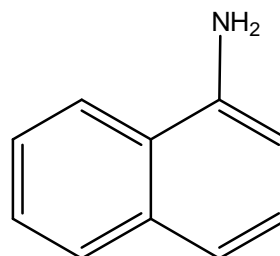
C.A.S. Registry Number: 134-32-7

$C_{10}H_9N$

$M_r = 143,19$

zkratka: 1-AN

$pK_A = 3,92$ (25 °C)



2-aminonaftalen

C.A.S. Name: 2-Naphthalenamine

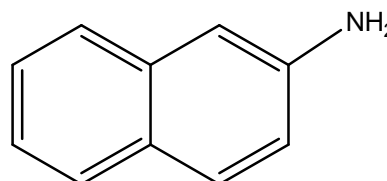
C.A.S. Registry Number: 91-59-8

$C_{10}H_9N$

$M_r = 143,19$

zkratka: 2-AN

$pK_A = 4,15$ (25 °C)



2.3 Aparatura

Chromatografická sestava byla tvořena:

- vysokotlakou pumpou HPP 5001 (Laboratorní přístroje, Praha, Česká republika)
- dávkovačem se smyčkou o velikosti 10 μ l (Laboratorní přístroje, Praha, Česká republika), smyčka byla plněna injekční stříkačkou
- kolonou LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μ m, 125×4 mm, No. 329757 (Merck, Německo)
- předkolonkou LiChroCART[®] PAH 4-4 (Merck, Německo)
- UV/VIS detektorem LCD 2083 (ECOM, Praha, Česká republika)
- potenciostatem ADLC2 (Laboratorní přístroje, Praha, Česká republika)
- softwarem CSW 32 Chromatography station (DataApex, Praha, Česká republika) pracujícím v prostředí Windows 98 (Microsoft, USA).

Vzduch z mobilní fáze byl odstraňován v ultrazvukové lázni 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.

Používanými elektrodami byly:

- pracovní: platinová tubulární elektroda⁶¹
- referentní: argentchloridová elektroda (KCl o $c = 3,0 \text{ mol dm}^{-3}$, ETP CZ-R00408, Eco-Trend Plus, Praha, Česká republika)
- pomocná: platinová elektroda (Eco-Trend Plus, Praha, Česká republika).

Na začátku každého pracovního dne byl detektor propláchnut methanolem a následně deionizovanou vodou. Poté do něj byla nastříknuta široká zóna vodného roztoku kyseliny sírové o koncentraci $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ a pracovní elektroda byla deseti až dvanácti cykly střídavě polarizována při $-0,3 \text{ V}$ a $+1,4 \text{ V}$ vždy po dobu 10 s. Stejný postup byl používán i pro čištění detektoru při případných obtížích³¹. Na konci vlastního měření byl detektor opět propláchnut methanolem a následně deionizovanou vodou.

2.4 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

2.5 Pracovní postupy

2.5.1 Optimalizace separace

Zásobní roztoky 2-aminobifenyly, 4-aminobifenyly, 1-aminonaftalenu a 2-amino-naftalenu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ byly připraveny rozpuštěním přesně odváženého množství látky v acetonitrilu. Roztoky o nižších koncentracích byly získány přesným ředěním zásobních roztoků mobilní fází.

Separace analytů byla prováděna na koloně LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm , 125 \times 4 mm, která nebyla termostatována. Mrtvý čas byl stanoven pomocí vodného roztoku $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. UV detekce probíhala při vlnové délce 290 nm³¹. Měřeny byly roztoky jednotlivých látek o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ a roztok směsi těchto látek o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ každé složky v roztoku.

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 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 ml min^{-1} .

2.5.2 Elektrochemická detekce

Elektrochemický detektor byl sériově zapojen za UV detektor. Pracoval v tříelektrodovém zapojení s pracovní platinovou tubulární elektrodou, referentní argentschloridovou elektrodou a pomocnou platinovou elektrodou. Všechny tři elektrody byly ponořeny v přepadové nádobce s mobilní fází.

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

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

2.5.3 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 či trojnásobku absolutní hodnoty šumu.

3. Výsledky a diskuze

3.1 Optimalizace separace

Pro úspěšnou separaci studovaných látek je nutné najít vhodné separační podmínky. V HPLC má kromě volby kolony největší význam složení mobilní fáze.

S ohledem na povahu studovaných látek byla vybrána kolona se stacionární fází z oktadecylu chemicky vázaném na silikagelu. Bylo tedy pracováno metodou chromatografie na reverzních fázích.

Významný vliv na separaci má polarita mobilní fáze, kterou lze regulovat pomocí koncentrace organického modifikátoru. Nejčastěji používanými organickými modifikátory v reverzní chromatografii derivátů polyaromatických uhlovodíků jsou methanol a acetonitril. V této práci byl jako organická složka používán acetonitril.

V případě studovaných analytů má velký vliv na retenci také pH mobilní fáze, jelikož v kyselém prostředí dochází k protonizaci aminoskupiny a tím k slabší retenci na koloně.

3.1.1 Vliv pH

Prvním krokem při optimalizaci separace 2-aminobifenyly, 4-aminobifenyly, 1-aminonaftalenu a 2-aminonaftalenu byla optimalizace pH mobilní fáze. Proměřovány byly hodnoty pH 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 a 7,0. Měření bylo prováděno v mobilní fázi o složení acetonitril a fosforečnanový pufr daného pH v poměru 50:50 (V/V).

V každé mobilní fázi byly změřeny chromatogramy studovaných látek a jejich směsi. Koncentrace látek byla $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} , dávkovaný objem byl 10 μl . K detekci nebyl použit elektrochemický detektor, pouze UV/VIS detektor při vlnové délce 290 nm.

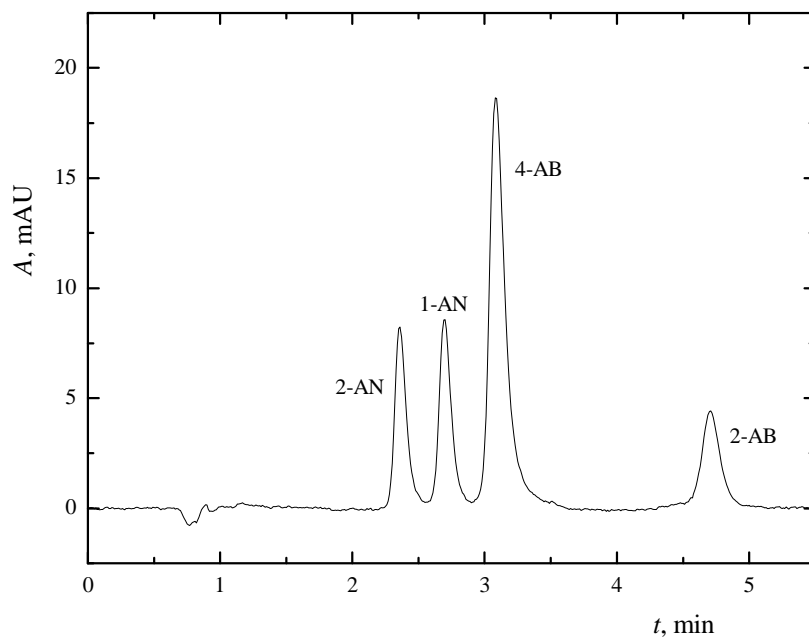
Mrtvý čas kolony 0,70 min byl určen nástřikem roztoku $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} detekovaného při vlnové délce 290 nm.

Retenční časy a kapacitní faktory při jednotlivých pH mobilní fáze jsou shrnuty v tab. 3.1, na obr. 3.2 je znázorněna závislost retenčních časů všech studovaných látek na hodnotě pH mobilní fáze. V mobilních fázích o pH 4,0; 5,0; 6,0 a 7,0 nedošlo k rozdělení aminonaftalenů, 2-aminobifenyl a 4-aminobifenyl byly ze směsi odděleny. V mobilních fázích o pH 2,0 a 3,0 již byly rozděleny všechny čtyři látky, ale rozlišení

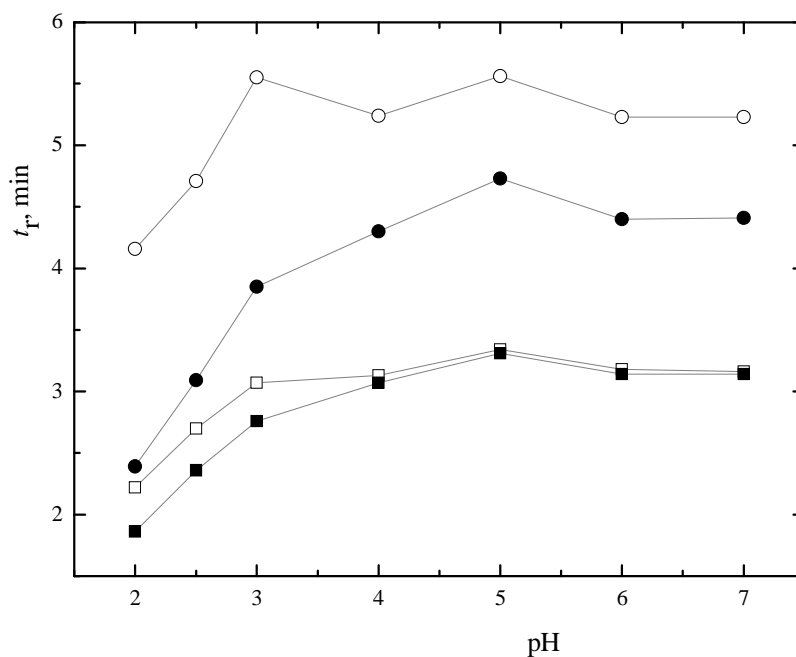
nebylo dostatečné. Proto byla separace testována ještě v mobilní fázi o pH 2,5, při kterém bylo rozložení píků nejlepší. Při pH menším než 4,0 vzhledem k hodnotám pK_A (viz oddíl 2.2) dochází k postupující protonizaci a tím ke snížení retence. Hodnota pH 2,5 tudíž byla zvolena jako optimální pro další měření, chromatogram změřený při optimálním pH je ukázán na obr. 3.1.

Tab. 3.1 Vliv pH mobilní fáze na retenční charakteristiky 2-aminobifenyly, 4-aminobifenyly, 1-aminonaftalenu a 2-aminonaftalenu. Kolona LiChrospher® 100 RP-18, 5 μ m, 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr v poměru 50:50 (V/V), dávkováno 10 μ l roztoku směsi v mobilní fázi o $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³, UV detekce při 290 nm, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹.

analyt	2-AB		4-AB		1-AN		2-AN	
	t_r , min	$\log k$	t_r , min	$\log k$	t_r , min	$\log k$	t_r , min	$\log k$
2,0	4,16	0,69	2,39	0,38	2,22	0,34	1,86	0,22
2,5	4,71	0,76	3,09	0,53	2,70	0,46	2,36	0,38
3,0	5,55	0,56	3,85	0,65	3,07	0,53	2,76	0,47
4,0	5,24	0,81	4,30	0,71	3,13	0,54	3,07	0,53
5,0	5,56	0,84	4,73	0,76	3,34	0,58	3,31	0,57
6,0	5,23	0,81	4,40	0,72	3,18	0,55	3,14	0,54
7,0	5,23	0,83	4,41	0,38	3,16	0,34	3,14	0,22



Obr. 3.1 Chromatogram směsi 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN změřený při použití optimálního pH mobilní fáze. Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm , 125 \times 4 mm, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 50:50 (V/V), dávkováno 10 μl roztoku směsi v mobilní fázi o $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} , UV detekce při 290 nm, průtoková rychlost 1,0 ml min^{-1} .



Obr. 3.2 Závislost retenčních časů 2-AB (○), 4-AB (●), 1-AN (□) a 2-AN (■) na pH mobilní fáze. Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm , 125 \times 4 mm, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr v poměru 50:50 (V/V), dávkováno 10 μl roztoku směsi v mobilní fázi o $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} , UV detekce při 290 nm, průtoková rychlost 1,0 ml min^{-1} .

3.1.2 Vliv koncentrace acetonitrilu

Druhým krokem při optimalizaci separace daných látek bylo určení optimálního obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Zvyšováním obsahu acetonitrilu v mobilní fázi se snižují retenční časy, naopak snižováním obsahu acetonitrilu v mobilní fázi se retenční časy zvyšují.

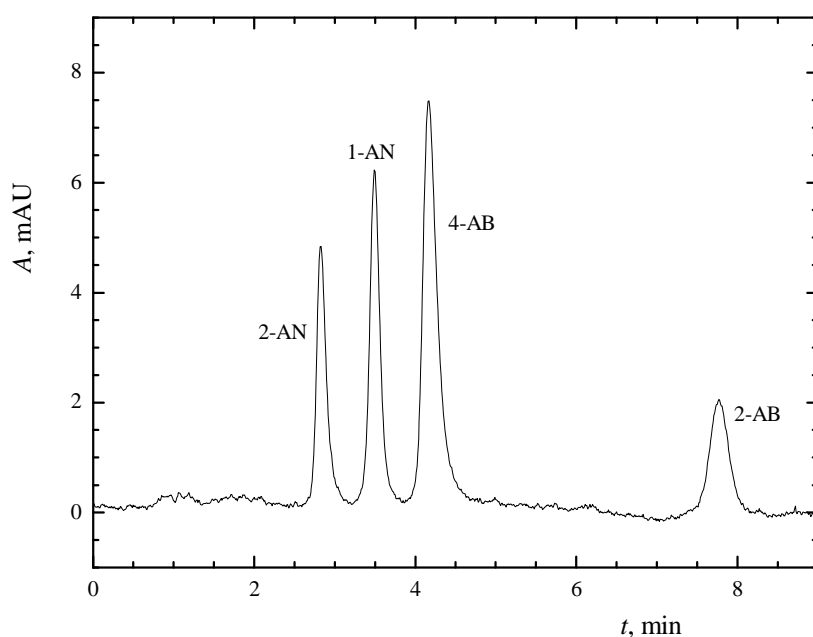
Poměrné zastoupení acetonitrilu bylo postupně snižováno. Měření bylo prováděno v mobilních fázích složených z acetonitrilu a fosforečnanového pufru o pH 2,5 v poměru 60:40, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65 a 30:70 (V/V). Ostatní podmínky byly stejné jako v pododdíle 3.1.1.

Získané retenční časy a kapacitní faktory pro studované analyty jsou shrnuty v tab. 3.2. Závislost retenčních časů na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi je graficky znázorněna na obr. 3.4, závislost rozlišení dvojic studovaných látek na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi je uvedena na obr. 3.5.

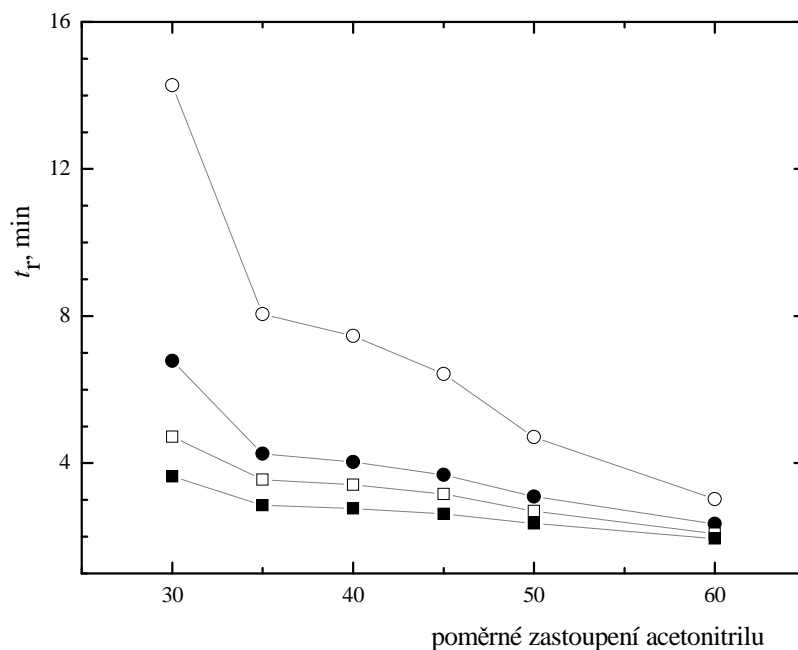
V prostředí mobilní fáze složené z acetonitrilu a fosforečnanového pufru v poměru 60:40 (V/V) nedochází k úplné separaci 2-aminonaftalenu a 1-aminonaftalenu. V prostředí mobilní fáze složené z acetonitrilu a fosforečnanového pufru v poměru 50:50 (V/V) se separace látek zlepšila, k dokonalému oddělení však nedošlo. V prostředí s nízkým poměrným zastoupením acetonitrilu v mobilní fázi byly všechny látky odděleny, tato mobilní fáze však pro další měření nebyla použita z důvodu příliš dlouhé doby trvání analýzy. Nejlepšího kompromisu mezi rozlišením separovaných látek a dobou trvání analýzy bylo dosaženo v mobilní fázi složené z acetonitrilu a fosforečnanového pufru v poměru 40:60 (V/V). Tato hodnota proto byla zvolena jako optimální a byla při ní prováděna všechna další měření, chromatogram změřený za optimálních podmínek je ukázán na obr. 3.3.

Tab. 3.2 Vliv obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na retenční charakteristiky 2-amino-bifenyly, 4-aminobifenyly, 1-aminonaftalenu a 2-aminonaftalenu. Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm , 125 \times 4 mm, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 2,5 v příslušném poměru, dávkováno 10 μl roztoku směsi v mobilní fázi o $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} , UV detekce při 290 nm, průtoková rychlost 1,0 ml min^{-1} .

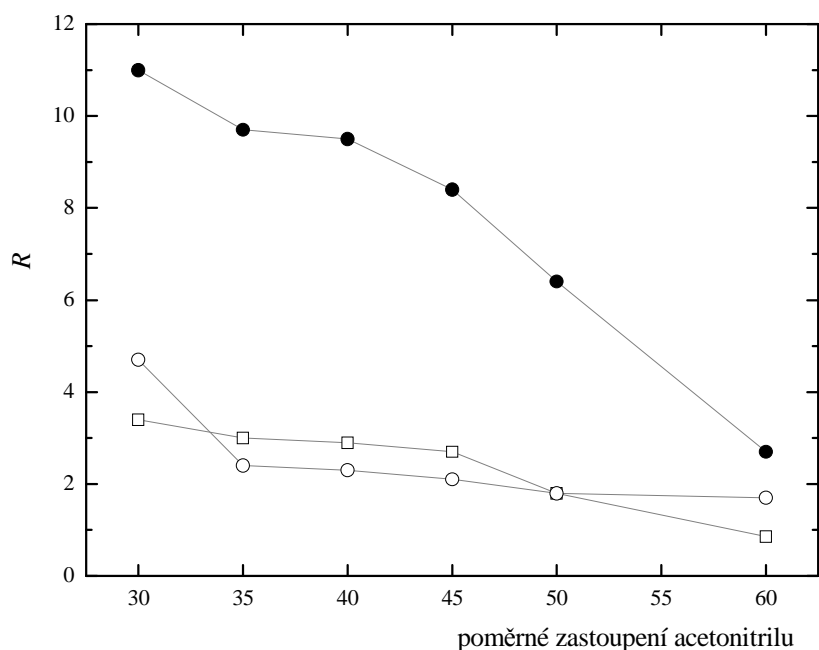
analyt	2-AB		4-AB		1-AN		2-AN	
acetonitril:fosf.								
pufr (V/V)	t_r , min	$\log k$	t_r , min	$\log k$	t_r , min	$\log k$	t_r , min	$\log k$
30:70	14,28	1,29	6,78	0,94	4,72	0,76	3,64	0,62
35:65	8,05	1,02	4,26	0,71	3,55	0,61	2,85	0,49
40:60	7,46	0,98	4,03	0,68	3,41	0,59	2,77	0,47
45:55	6,42	0,91	3,68	0,63	3,16	0,55	2,62	0,44
50:50	4,71	0,76	3,09	0,53	2,70	0,46	2,36	0,38
60:40	3,02	0,52	2,35	0,37	2,08	0,29	1,95	0,25



Obr. 3.3 Chromatogram směsi 2-AB, 4-AB, 1-AB a 2-AB změřený za optimálního poměru acetonitrilu a fosforečnanového pufru. Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm , 125 \times 4 mm, mobilní fáze acetonitril a 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} , UV detekce při 290 nm, průtoková rychlost 1,0 ml min^{-1} .



Obr. 3.4 Závislost retenčních časů 2-AB (\circ), 4-AB (\bullet), 1-AN (\square) a 2-AN (\blacksquare) na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μ m, 125 \times 4 mm, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 2,5 v příslušném poměru, dávkováno 10 μ l roztoku směsi v mobilní fázi o $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³, UV detekce při 290 nm, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹.



Obr. 3.5 Závislost rozlišení dvojic studovaných látek 2-AN a 1-AN (\square), 1-AN a 4-AB (\circ), 4-AB a 2-AB (\bullet) na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μ m, 125 \times 4 mm, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 2,5 v příslušném poměru, dávkováno 10 μ l roztoku směsi v mobilní fázi o $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³, UV detekce při 290 nm, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹.

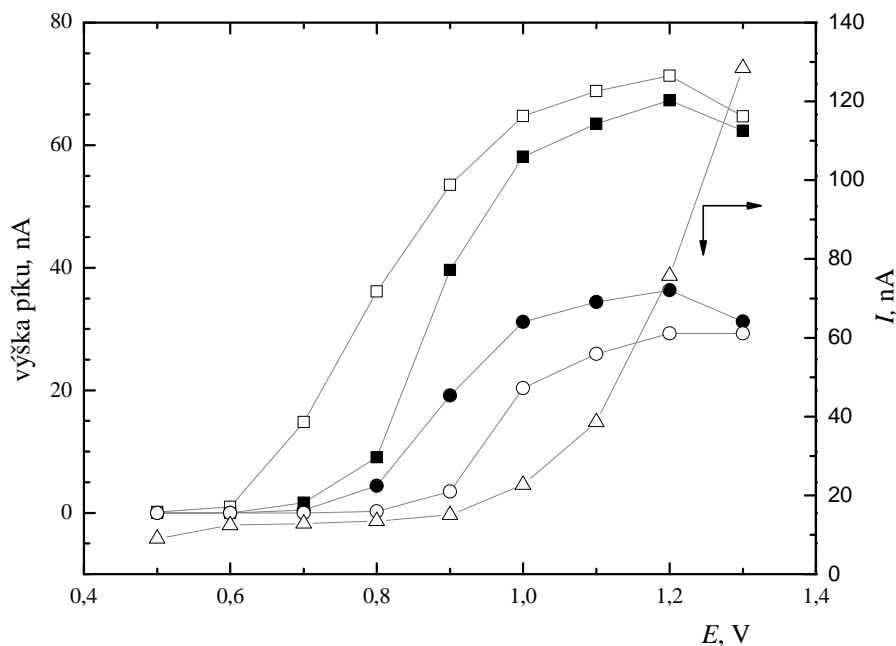
3.2 Optimalizace elektrochemické detekce

Po optimalizaci separace bylo nutné optimalizovat elektrochemické detekční podmínky, v tomto případě závislost odezvy na potenciálu pracovní elektrody. Optimální potenciál byl získán na základě proměření hydrodynamických voltamogramů jednotlivých látek, tedy závislosti výšky píku na potenciálu E vkládaném na elektrodu.

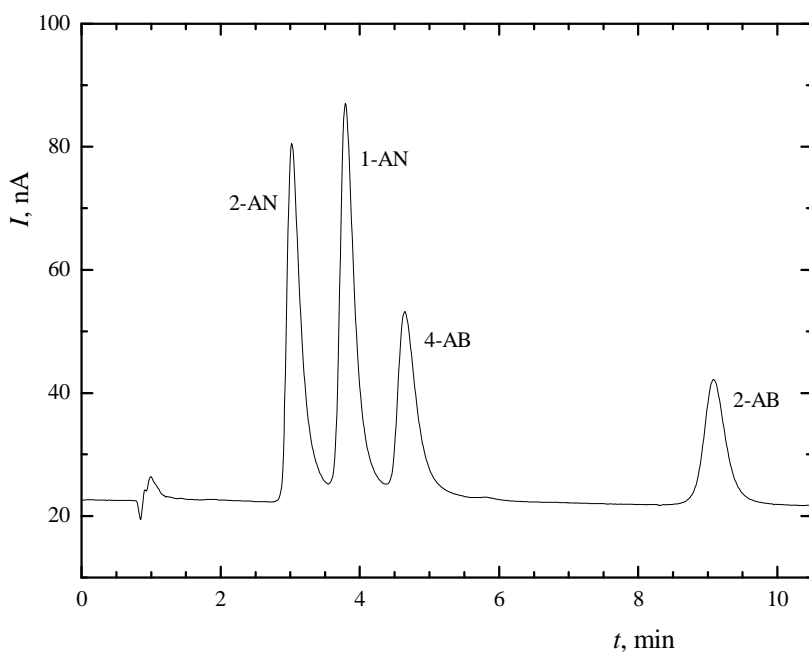
Hydrodynamické voltamogramy 2-aminobifenyly, 4-aminobifenyly, 1-aminonaftalenu a 2-aminonaftalenu byly měřeny při optimálních podmínkách separace. Proměřovány byly hodnoty vkládaného potenciálů E v rozsahu + 0,5 V až + 1,3 V.

Získané hydrodynamické voltamogramy pro jednotlivé látky a naměřený proud pozadí jsou ukázány na obr. 3.6. Jako optimální byl zvolen potenciál + 1,0 V. Chromatogram změřený za optimálních podmínek je ukázán na obr. 3.7. Při vložení kladnějších potenciálů E již nedochází k výraznému nárůstu výšky píků studovaných analytů, a navíc měření negativně ovlivňuje vzrůstající proud pozadí. Na velikost šumu nemá vzrůstající potenciál výrazný vliv.

Rozlišení píků při elektrochemické detekci je horší než při spektrofotometrické detekci. Nejmenší rozlišení v případě elektrochemické detekce dosahuje hodnoty 1,6 pro dvojici 1-aminonaftalen a 4-aminobifenyly, v případě spektrofotometrické detekce mají tytéž dva analyty rozlišení 2,3. Pokles rozlišení píků je způsoben jednak typem detektoru, jednak sériovým zapojením elektrochemického detektoru za spektrofotometrický a s tím souvisejícím rozmytím ve spojovacích kapilárách.



Obr. 3.6 Hydrodynamické voltamogramy 2-AB (○), 4-AB (●), 1-AN (□), 2-AN (■) a proud pozadí (△). Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm, 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a 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. 3.7 Chromatogram směsi 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN změřený za optimálního potenciálu na pracovní elektrodě. Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm, 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a 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.

3.3 Kalibrační závislosti

Nalezené optimální podmínky separace a detekce byly využity pro změření kalibračních závislostí 2-aminobifenyly, 4-aminobifenyly, 1-aminonaftalenu a 2-amino-naftalenu.

Shrnutí optimálních podmínek pro měření: kolona LiChrospher® 100 RP-18, 5 μm , 125 \times 4 mm, mobilní fáze ve složení acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹. Dávkováno bylo 10 μl směsi studovaných látek o příslušné koncentraci každé složky v roztoku.

3.3.1 Spektrofotometrická detekce

Spektrofotometrická detekce probíhala při 290 nm. Proměřeny byly kalibrační závislosti studovaných látek 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 , které byly stanoveny jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna desetinásobku či trojnásobku absolutní hodnoty šumu, jsou uvedeny v tab. 3.5. Velikost absolutního šumu byla 0,06 mAU. Chromatogram směsi studovaných látek o koncentraci $2 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³ každé složky v roztoku je uveden na obr. 3.8. Kalibrační přímky vyhodnocené z ploch a dále z výšek píků v příslušném koncentračním rozmezí jsou na obr. 3.9 a 3.10.

Kalibrační závislosti jsou lineární v celé měřené oblasti koncentrací. Korelační koeficienty se pohybují v intervalu 0,9961 až 0,9998. Nejnižší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u 4-aminobifenyly, tj. $8,6 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³, naopak nejvyšší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u 2-aminobifenyly, tj. $3,1 \cdot 10^{-6}$ mol dm⁻³.

Tab. 3.3 Parametry kalibračních závislostí pro HPLC se spektrofotometrickou detekcí. Vyhodnoceno z ploch píků. Kolona LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 µl roztoku směsi, UV detekce při 290 nm, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹.

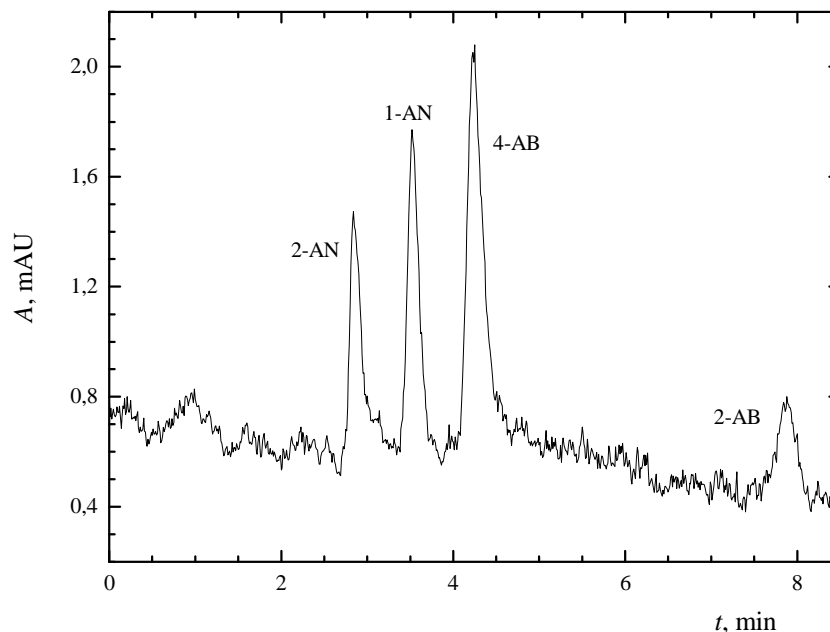
analyt	lineární dynamický rozsah, mol dm ⁻³	směrnice, mAU s mol ⁻¹ dm ³	úsek, mAU s	korelační koeficient
2-aminobifenyl	1·10 ⁻⁶ – 1·10 ⁻⁵	4,11·10 ⁶	-0,7	0,9983
4-aminobifenyl	4·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁵	1,16·10 ⁶	-1,4	0,9984
1-aminonaftalen	4·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁵	6,22·10 ⁷	-0,1	0,9996
2-aminonaftalen	4·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁵	4,49·10 ⁶	0,4	0,9985

Tab. 3.4 Parametry kalibračních závislostí pro HPLC se spektrofotometrickou detekcí. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 µl roztoku směsi, UV detekce při 290 nm, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹.

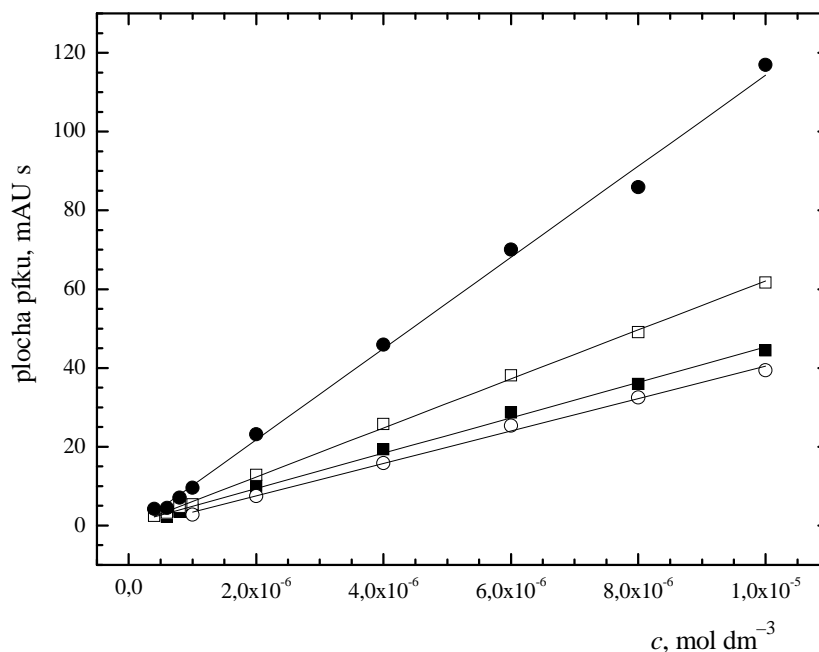
analyt	lineární dynamický rozsah, mol dm ⁻³	směrnice, mAU mol ⁻¹ dm ³	úsek, mAU	korelační koeficient
2-aminobifenyl	1·10 ⁻⁶ – 1·10 ⁻⁵	1,97·10 ⁵	0,05	0,9961
4-aminobifenyl	4·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁵	7,15·10 ⁵	0,02	0,9981
1-aminonaftalen	4·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁵	6,11·10 ⁵	-0,03	0,9998
2-aminonaftalen	4·10 ⁻⁷ – 1·10 ⁻⁵	4,76·10 ⁵	-0,01	0,9998

Tab. 3.5 Meze stanovitelnosti 2-aminobifenyly, 4-aminobifenyly, 1-aminonaftalenu a 2-aminonaftalenu při stanovení pomocí HPLC se spektrofotometrickou detekcí. Kolona LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 µl roztoku směsi, UV detekce při 290 nm, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹.

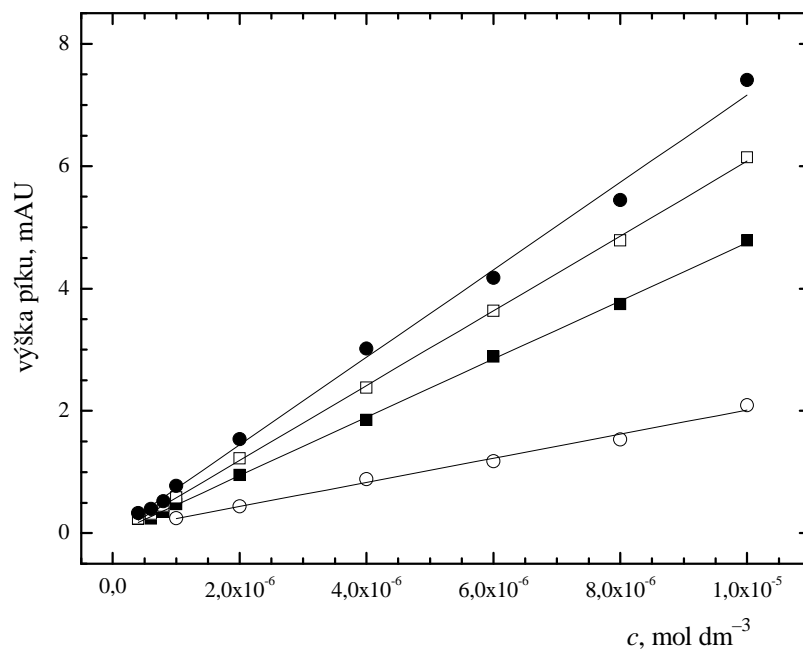
analyt	mez stanovitelnosti L_Q , mol dm ⁻³	mez detekce L_D , mol dm ⁻³
2-aminobifenyl	3,1·10 ⁻⁶	9,3·10 ⁻⁷
4-aminobifenyl	8,5·10 ⁻⁷	2,6·10 ⁻⁷
1-aminonaftalen	1,0·10 ⁻⁶	3,0·10 ⁻⁷
2-aminonaftalen	1,3·10 ⁻⁶	3,9·10 ⁻⁷



Obr. 3.8 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 fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 μl roztoku směsi v mobilní fázi o $c = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, UV detekce při 290 nm, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹.



Obr. 3.9 Závislost ploch píků na koncentraci 2-AB (○), 4-AB (●), 1-AN (□) a 2-AN (■). Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm , 125 \times 4 mm, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 μl roztoku směsi v mobilní fázi, UV detekce při 290 nm, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹.



Obr. 3.10 Závislost výšek píků na koncentraci 2-AB (○), 4-AB (●), 1-AN (□) a 2-AN (■). Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μ m, 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 μ l roztoku směsi v mobilní fázi, UV detekce při 290 nm, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹.

3.3.2 Elektrochemická detekce

Současně se spektrofotometrickou detekcí byly změřeny také kalibrační závislosti za použití elektrochemické detekce. Elektrochemická detekce probíhala při potenciálu +1,0 V vkládaném na pracovní elektrodu. Proměřeny byly kalibrační závislosti studovaných látek v koncentračním rozmezí od $8 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ do $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

Naměřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Parametry závislostí získané vyhodnocením příslušných ploch a výšek píků z naměřených chromatogramů jsou uvedeny v tab. 3.6 a 3.7. Dosažené meze stanovitelnosti L_Q a meze detekce L_D pro šum o velikosti 0,016 nA jsou uvedeny v tab. 3.8. Chromatogram směsi studovaných látek o koncentraci $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ každé složky v roztoku je uveden na obr. 3.11. Kalibrační přímky vyhodnocené z ploch a dále z výšek píků v příslušném koncentračním rozmezí jsou na obr. 3.12 a 3.13.

Odezva detektoru vyhodnocená v závislosti na koncentraci analytů je lineární až do koncentrace $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Při vyšších koncentracích analytů (od $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) dochází patrně k pasivaci pracovní elektrody, a tím k zakřivování kalibračních závislostí⁶². Korelační koeficienty se pohybují v intervalu 0,9979 až 0,9998. Nejnižší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u 1-aminonaftalenu, tj. $2,6 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$, naopak nejvyšší meze stanovitelnosti bylo dosaženo u 2-aminobifenyly, tj. $8,9 \cdot 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$. Dle předpokladů, elektrochemický detektor je na studované látky citlivější než detektor spektrofotometrický.

Tab. 3.6 Parametry kalibračních závislostí pro HPLC s ampérometrickou detekcí na platinové tubulární elektrodě při potenciálu + 1,0 V. Vyhodnoceno z ploch píků. Kolona LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 µl roztoku směsi, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹.

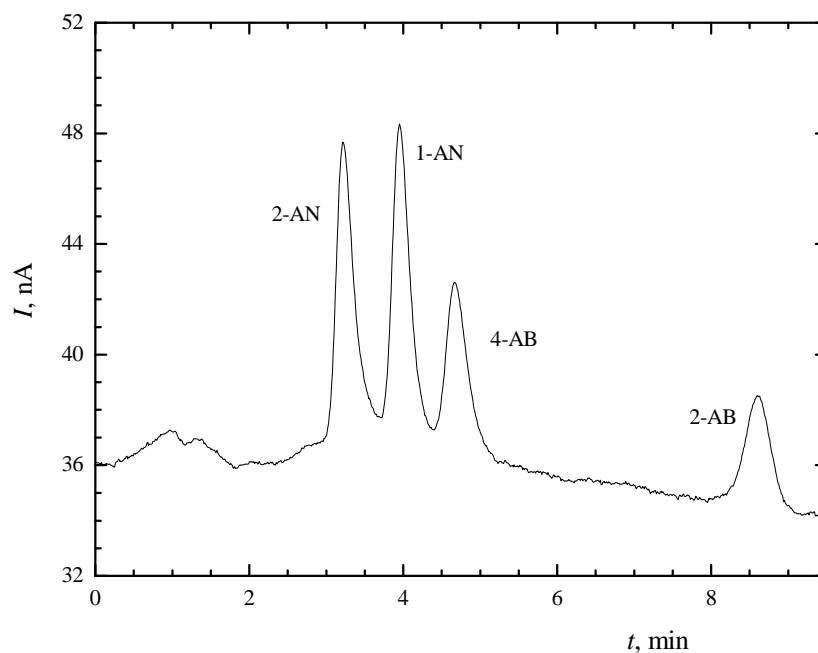
analyt	lineární dynamický rozsah, mol dm ⁻³	směrnice, nA s mol ⁻¹ dm ³	úsek, nA s	korelační koeficient
2-aminobifenyl	1·10 ⁻⁷ – 8·10 ⁻⁶	4,36·10 ⁷	7	0,9992
4-aminobifenyl	8·10 ⁻⁸ – 8·10 ⁻⁶	7,07·10 ⁷	3	0,9979
1-aminonaftalen	8·10 ⁻⁸ – 8·10 ⁻⁶	1,05·10 ⁸	- 5	0,9996
2-aminonaftalen	8·10 ⁻⁸ – 8·10 ⁻⁶	8,24·10 ⁷	- 1	0,9998

Tab. 3.7 Parametry kalibračních závislostí pro HPLC s ampérometrickou detekcí na platinové tubulární elektrodě při potenciálu + 1,0 V. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 µl roztoku směsi, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹.

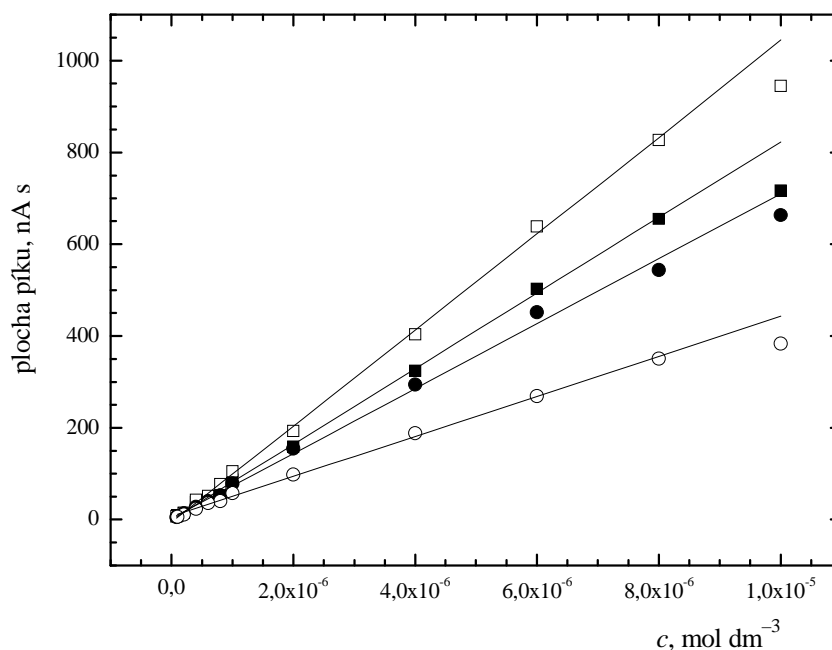
analyt	koncentrační rozmezí, mol dm ⁻³	směrnice, nA mol ⁻¹ dm ³	úsek, nA	korelační koeficient
2-aminobifenyl	1·10 ⁻⁷ – 8·10 ⁻⁶	1,85·10 ⁶	0,3	0,9988
4-aminobifenyl	8·10 ⁻⁸ – 8·10 ⁻⁶	3,04·10 ⁶	0,1	0,9996
1-aminonaftalen	8·10 ⁻⁸ – 8·10 ⁻⁶	6,32·10 ⁶	- 0,4	0,9996
2-aminonaftalen	8·10 ⁻⁸ – 8·10 ⁻⁶	5,41·10 ⁶	- 0,1	0,9998

Tab. 3.8 Meze stanovitelnosti 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 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 tubulární elektrody + 1,0 V.

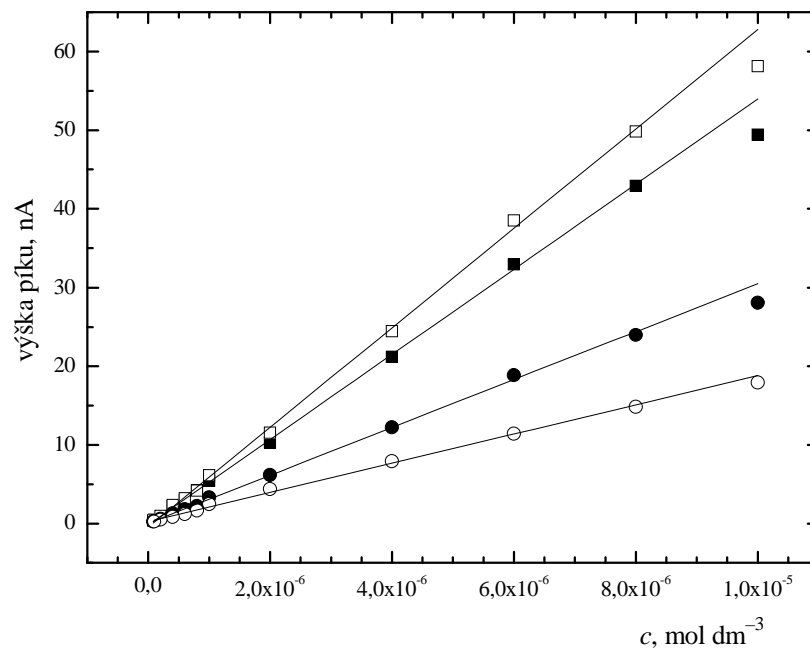
analyt	mez stanovitelnosti L _Q , mol dm ⁻³	mez detekce L _D , mol dm ⁻³
2-aminobifenyl	8,9·10 ⁻⁸	2,7·10 ⁻⁸
4-aminobifenyl	5,4·10 ⁻⁸	1,6·10 ⁻⁸
1-aminonaftalen	2,6·10 ⁻⁸	7,8·10 ⁻⁹
2-aminonaftalen	3,0·10 ⁻⁸	9,1·10 ⁻⁹



Obr. 3.11 Chromatogram směsi 2-AB, 4-AB, 1-AN a 2-AN změřený při koncentraci látek $c = 4 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm , 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 μl roztoku směsi v mobilní fázi o $c = 4 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, průtoková rychlost 1,0 ml min^{-1} , potenciál vkládaný na pracovní elektrodu + 1,0 V.



Obr. 3.12 Závislost ploch píků na koncentraci 2-AB (\circ), 4-AB (\bullet), 1-AN (\square) a 2-AN (\blacksquare). Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm , 125×4 mm, mobilní fáze acetonitril a 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 elektrodu + 1,0 V.



Obr. 3.13 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 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 elektrodu + 1,0 V.

4. Závěr

Bylo prostudováno chromatografické chování 2-aminobifenyly, 4-aminobifenyly, 1-aminonaftalenu a 2-aminonaftalenu v reverzním chromatografickém systému s chemicky vázaným oktadecylem. Dále byly proměřeny závislosti retenčních charakteristik všech studovaných látek na pH mobilní fáze a na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi.

Byly nalezeny optimální podmínky HPLC separace pro směs 2-aminobifenyly, 4-aminobifenyly, 1-aminonaftalenu a 2-aminonaftalenu s použitím spektrofotometrické detekce: mobilní fáze tvořená acetonitrilem a fosforečnanovým pufrům o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), detekce při 290 nm. Za těchto podmínek byly změřeny kalibrační závislosti a stanoveny meze stanovitelnosti jednotlivých látek, viz tab. 4.1.

Platinová tubulární elektroda byla použita jako pracovní elektroda ampérometrického detektoru. Byla prostudována závislost její odezvy na vloženém potenciálu. Měření probíhalo za optimálních podmínek separace. Jako optimální byl pro detekci použit potenciál + 1,0 V vkládaný na pracovní elektrodu. Za těchto podmínek byly změřeny kalibrační závislosti a stanoveny meze stanovitelnosti jednotlivých látek, viz tab. 4.1. Ve srovnání se spektrofotometrickým detektorem jsou meze stanovitelnosti získané pomocí elektrochemického detektoru přibližně o řád nižší.

Tab 4.1 Přehled dosažených mezí detekce 2-aminobifenyly, 4-aminobifenyly, 1-aminonaftalenu a 2-aminonaftalenu s použitím spektrofotometrické a elektrochemické detekce. Kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μm , 125 \times 4 mm, mobilní fáze acetonitril a fosforečnanový pufr o pH 2,5 v poměru 40:60 (V/V), dávkováno 10 μl roztoku směsi, průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹, UV detekce při 290 nm, elektrochemická detekce při potenciálu pracovní platinové tubulární elektrody + 1,0 V.

analyt	mez stanovitelnosti L_Q , mol dm ⁻³	
	spektrofotometrická detekce	elektrochemická detekce
2-aminobifenyl	$3,1 \cdot 10^{-6}$	$8,9 \cdot 10^{-8}$
4-aminobifenyl	$8,5 \cdot 10^{-7}$	$5,4 \cdot 10^{-8}$
1-aminonaftalen	$1,0 \cdot 10^{-6}$	$2,6 \cdot 10^{-8}$
2-aminonaftalen	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$3,0 \cdot 10^{-8}$

5. Literatura

1. Barek, J.; Mejstřík, V.; Švagrová, I.; Zima, J.: Měření expozice polycyklických aromatických uhlovodíků na základě monitorování jejich metabolitů v tělních tekutinách. *Chemické Listy* **88**, 341 (1994).
2. Anonymous: *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, Vol. 3 – Certain Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heterocyclic Compounds. IARC, Lyon (1973).
3. 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).
4. Anonymous: *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).
5. 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).
6. 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
7. 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).
8. Anonymous: *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, Vol. 4, Supplement 7. IARC, Lyon (1987).
9. Anonymous: *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).
10. Anonymous: Material safety data sheets, Sigma-Aldrich (2006).

11. Gan, J.; Skipper, P.L.; Gago-Dominguez, M.; Arakawa, K.; Ross, R.K.; Yu, M.C.; Tannenbaum, S.R.: Alkylaniline-hemoglobin adducts and risk of non-smoking-related bladder cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **96**, 1425 (2004).
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. O'Neill, I.K.; Fishbein, L.: An IARC manual series aimed at assisting cancer epidemiology and prevention. "Environmental carcinogens: Selected methods of analysis". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **26**, 229 (1986). CAN **105**:185668
14. Moreira, J.C.; Barek, J.: Analysis of carcinogenic nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons - a review. *Quimica Nova* **18**, 362 (1995).
15. Steineck, G.; Plato, N.; Norell, S.E.; Hogstedt, C.: Urothelial cancer and some industry-related chemicals: An evaluation of the epidemiologic literature. *American Journal of Industrial Medicine* **17**, 371 (1990). PubMed ID 2407118
16. Cerniglia, C.E.; Zhuo, Z.; Manning, B.W.; Federle, T.W.; Heflich, R.H.: Mutagenic activation of the benzidine-based dye direct black by human intestinal microflora. *Mutation Research* **175**, 11 (1986). CAN **105**:166666
17. Olek, M.: Determination of diphenylamine residues in apples, and 4-aminobiphenyl residues in diphenylamine, by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. *Journal of Chromatography* **447**, 421 (1988).
18. Iglesias, S.L.; Desimone, M.F.; Copello, G.J.; Bertinatto, J.A.; Giorgieri, S.A.; Diaz, L.E.: Analysis of diphenylamine and impurities using monolithic column with electrochemical detection. *Journal of Analytical Chemistry* **61**, 588 (2006).
19. Stiborová, M.: Škodlivé aromatické sloučeniny. *Vesmír* **81**, 683 (2002).
20. Airoidi, L.; Orsi, F.; Magagnotti, C.; Coda, R.; Randone, D.; Casetta, G.; Peluso, M.; Hautefeuille, A.; Malaveille, C.; Vineis, P.: Determinants of 4-aminobiphenyl-DNA adducts in bladder cancer biopsies. *Carcinogenesis* **23**, 861 (2002).
21. Stiborová, M.: Aromatické nitrosloúčeniny: Kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka. *Chemické listy* **96**, 784 (2002).
22. Feng, Z.; Hu, W.; Rom, W.N.; Beland, F.A.; Tang, M.: 4-aminobiphenyl is a major etiological agent of human bladder cancer: evidence from its DNA binding spectrum in human *p53* gene. *Carcinogenesis* **23**, 1721 (2002).

23. May, W.E.; Wise, S.A.: Liquid Chromatographic Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Air Particulate Extracts. *Analytical Chemistry* **56**, 225 (1984).
24. 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).
25. 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).
26. 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).
27. Rosenkranz, H.S.: Direct-acting mutagens in diesel exhausts: magnitude of the problem. *Mutation Research* **101**, 1 (1982). CAN **96**:156696
28. Salomaa, S.; Tuominen, J.; Skytta, E.: Genotoxicity and PAC analysis particulate and vapour phases of environmental tobacco smoke. *Mutation Research* **204**, 173 (1988).
29. 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).
30. Barek, J.; Cvačka J.; Moreira, J.C.; Zima, J.: Metody stanovení genotoxických nitroderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků. *Chemické Listy* **90**, 805 (1996).
31. Cvačka, J.: Příspěvek ke stanovení nitroderivátů a aminoderivátů naftalenu a bifenyly kapalinovou chromatografií. Disertační práce, PřF UK, Praha (2001).
32. 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).
33. 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).
34. Valentová, D.: Sledování destrukce 2-aminobifenyly, 3-aminobifenyly a 4-aminobifenyly. Bakalářská práce, PřF UK, Praha (2000).

35. 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).
36. Barek, J.; Jandová, K.; Pecková, K.; Zima, J.: Voltammetric determination of aminobiphenyls at a boron-doped nanocrystalline diamond film electrode. *Talanta* **74**, 421 (2007).
37. Yasuda, K.: Thin-layer chromatography of aromatic amines on cadmium acetate impregnated silica gel thin layers. *Journal of Chromatography* **72**, 413 (1972).
38. Smith, C.J.; Dooly, G.L.; Moldoveanu, S.C.: New technique using solid-phase extraction for the analysis of aromatic amines in mainstream cigarette smoke. *Journal of Chromatography A* **991**, 99 (2003).
39. Stabbert, R.; Schäfer, K.H.; Biefel, C.; Rustemeier, K.: Analysis of aromatic amines in cigarette smoke. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17**, 2125 (2003).
40. 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).
41. Schmidt, T.C.; Haas, R.; von Löw, E.; Steinbach, K.: Derivatization of aromatic amines with bromine for improved gas chromatographic determination. *Chromatographia* **48**, 436 (1998).
42. 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).
43. Felice, L.J.; Schirmer, R.E.; Springer, D.L.; Veverka, C.V.: Determination of polycyclic aromatic amines in skin by liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography* **354**, 442 (1986).
44. 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).
45. Barek, J.; Pacáková, V.; Štulík, K.; Zima, J.: Monitoring of aromatic amines by HPLC with electrochemical detection. Comparison of methods for destruction of carcinogenic aromatic amines in laboratory wastes. *Talanta* **32**, 279 (1985).

46. Concialini, V.; Chiavari, G.; Vitali, P.: Electrochemical detection in high-performance liquid chromatographic analysis of aromatic amines. *Journal of Chromatography* **258**, 244 (1983).
47. Cvačka, J.; Swain, G.M.; Barek, J.; Zima, J.: Stanovení aminonaftalenů a aminobifenyľů kapalinovou chromatografií s ampérometrickou detekcí na diamantové elektrodě. *Chemické listy* **96**, 33 (2002).
48. Tomaselli, M.; Cozzolino, A.; Calemme, I.: Qualitative and quantitative determination of benzidine and other aromatic amines [in leather] *Cuoio, Pelli, Materie Concianti* **68**, 185 (1992). CAN **118**:41144
49. Winkeler, H.D.: Determination of carcinogenic aromatic amines by HPLC/DAD analysis. *GIT Spezial Chromatographie* **16**, 6 (1996). CAN **125**:60807
50. Zima, J.; Vaingátová, S.; Barek, J.; Břicháč, J.: HPLC monitoring of biphenyl derivatives with UV and electrochemical detection modes. *Chemia Analytyczna* **48**, 805 (2003).
51. Pecková, K.; Jandová, K.; Maixnerová, L.; Swain, G.M.; Barek, J.: Amperometric determination of aminobiphenyls using HPLC-ED with boron-doped diamond electrode. *Electroanalysis* **21**, 316 (2009).
52. 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).
53. Zima, J.; Dejmková, H.; Barek, J.: HPLC determination of naphthalene amino derivatives using electrochemical detection at carbon paste electrodes. *Electroanalysis* **19**, 185 (2007).
54. Quaiserová, V.; Zima, J.; Barek, J.: HPLC separace genotoxických derivátů naftalenu. *Chemické Listy* **94**, 1014 (2000).
55. 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).
56. Štulík, K.; Pacáková, V.: Elektroanalytická měření v proudících kapalinách. SNTL, Praha 1989.
57. Štulík, K.; Hora, V.: Continuous voltammetric measurements with solid electrodes. Part I. A flow-through cell with tubular electrodes employing pulse polarization of the electrode system. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **70**, 253 (1976).

58. Blaedel, W.J.; Iverson, D.G.: Study of the steady-state current at tubular electrodes in the micromolar concentration region. *Analytical Chemistry* **49**, 1563 (1977).
59. Armentrout, D.N.; McLean, J.D.; Long M.W.: Trace determination of phenolic compounds in water by reversed phase liquid chromatography with electrochemical detection using a carbon-polyethylene tubular anode. *Analytical Chemistry* **51**, 1039 (1979).
60. Li, T.; Coufal, P.; Opekar, F.; Štulík, K.; Wang, E.: An amperometric detector with a tubular electrode deposited on the capillary for capillary liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **360**, 53 (1998).
61. 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).
62. Vaingátová, S.: Chromatografické a voltametrické stanovení derivátů bifenyly. Diplomová práce, PŘF UK, Praha (2002).