

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Jan Dřík

AMPÉROMETRICKÁ DETEKCE AMINODERIVÁT
BIFENYLU A NAFTALENU NA SÍTOTISKOVÝCH
UHLÍKOVÝCH ELEKTRODÁCH

Amperometric detection of aminoderivatives of biphenyl and
naphthalene at screen printed carbon electrodes

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Karolina Pecková, Ph.D.

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného akademického titulu.

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

V Praze dne 13. května 2012

Bc. Jan Dídík

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM 0021620857. Z tohoto výzkumného záměru byla také spolufinancována a dále finančně podpořena Univerzitou Karlovou v Praze (projekt UNCE 2012/44), Grantovou agenturou České republiky (projekt P206/12/G151) a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze (projekt GAUK 92010).

Rád bych vyjádřil poděkování vedoucí své diplomové práce RNDr. Karolin Peckové, Ph.D. za řadu užitečných rad, připomínek a důvěru v mou samostatnost v průběhu vypracování této práce a jejího usměrňování, konzultantům Mgr. Haně Dejmkové a RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za pomoc s řadou teoretických i praktických potíží, které se v průběhu práce vyskytly, Mgr. Aleši Daňhelovi, Ph.D. za technickou výpomoc při zhotovování průtokové cely, kolektivu studentů v laboratoři 113 a všem ostatním, kteří mi jakkoliv v průběhu této diplomové práce pomohli. Moje poděkování patří také mým rodičům a všem ostatním, kteří mi během studia podporovali.

Abstrakt

Citlivé a selektivní metody stanovení aminoderivát polycyklických aromatických uhlovodík, z nichž některé jsou podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer, IARC) za azeny do skupiny 1 – látky karcinogenní pro člověka, nabývají na významu, protože sada z nich se používá při výrobě široce používaných azobarviv.

Tato práce se zabývá možnostmi detekce 2-aminobifenyly (2-AB), 4-aminobifenyly (4-AB), 1-aminonaftalenu (1-AN) a 2-aminonaftalenu (2-AN) na nemodifikovaných uhlíkových sítotiskových elektrodách (SPCE). Ty byly testovány jako pracovní elektroda pro ampérometrický detektor pro opakované použití v proudových metodách vysokouinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC) a proudové injekční analýzy (FIA). Stabilita elektrod a dostatečná opakovatelnost odezvy byly prokázány až do 70% obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Metodou FIA bylo dosaženo mezí detekce 4-AB $0,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ve vodném prostředí $0,01 \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosforenanového pufru pH 3,0 a $1,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v prostředí acetonitril:0,01 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosforenanový pufr pH 3,0 (40:60, V/V). Metodou RP-HPLC se podařilo s aminobifenyl a aminonaftalenem i použití gradientového módu separovat vase pod 11 minut. Meze detekce sledovaných látek byly: $2,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro 2-AN; $2,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro 1-AN; $3,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro 4-AB a $3,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 2-AB.

Abstract

According to International Agency for Research on Cancer (IARC), some specific isomers of amino derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons (APAHs) are classified as carcinogenic to humans (Group 1). Several APAHs are employed in the manufacturing of widely-used azodyes, therefore, sensitive and selective analytical methods for their determinations are still needed.

This study aims at the possibilities of detection of 2-aminobiphenyl (2-AB), 4-aminobiphenyl (4-AB), 1-aminonaphthalene (1-AN) and 2-aminonaphthalene (2-AN) using bare screen-printed carbon electrodes (SPCE). These were employed as working electrodes in amperometric detection flow cell for repeated use in liquid flow methods – reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and flow injection analysis. Sufficient stability and repeatability was obtained for mobile phases containing the maximum of 70% of acetonitrile. Limits of detection for 4-AB given by FIA in the aqueous solution of $0,01\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ phosphate buffer pH 3,0; or in the solution of acetonitrile and $0,01\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ phosphate buffer pH 3,0 (40:60) (V/V) were $1,0\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ and $2,0\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, respectively. Using RP-HPLC in gradient mode, the mixture of aminobiphenyls and aminonaphthalenes was successfully separated below 11 minutes. Limits of detection for individual analytes were: $2,2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ for 2-AN; $2,1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ for 1-AN; $3,5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ for 4-AB and $3,3\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ for 2-AB.

Podmínková hesla

Analytická chemie

Elektrochemie

Průtokové metody

Aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků

Klíčová slova

Aminobifenyly

Aminonaftaleny

Ampérometrická detekce

Průtoková injekční analýza

Vysokou tlakovou kapalinovou chromatografii s reverzní fází

Sítotiskové uhlíkové elektrody

Objective words

Analytical chemistry

Electrochemistry

Liquid flow methods

Amino derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons

Key words

Aminobiphenyls

Aminonaphthalenes

Amperometric detection

Flow injection analysis

Reverse phase - high performance liquid chromatography

Screen-printed carbon electrode

Obsah

1	Úvod	10
1.1	Cíl práce.....	10
1.2	Aminoderiváty bifenyly a naftalenu	12
1.3	Vybrané chemické a fyzikální vlastnosti studovaných látek.....	14
1.4	Metody stanovení aminoderivát bifenyly a naftalenu	15
1.5	Sítotiskové uhlíkové elektrody	17
1.6	Použití nemodifikovaných sítotiskových uhlíkových elektrod při stanovení organických sloučenin	20
2	Experimentální část	24
2.1	Reagencie.....	24
2.2	Aparatura	24
2.3	Použité vzorce.....	25
2.4	Pracovní postupy	26
2.4.1	Aktivace elektrody.....	26
2.4.2	Separace směsi.....	26
2.4.3	Zpracování experimentálních dat	26
3	Výsledky a diskuze	28
3.1	Stanovení 4-aminobifenyly na tiskových uhlíkových elektrodách v proudové injekční analýze	28
3.1.1	Vlastnosti SPCE v proudě a optimalizace podmínek pro stanovení 4-aminobifenyly	28
3.1.2	Kalibrační závislosti 4-aminobifenyly	32
3.2	Separace a detekce směsi aminonaftalen a aminobifenyl vysokouinnou kapalinovou chromatografií.....	35
3.2.1	Izokratická eluce směsi aminonaftalen a aminobifenyl s UV detekcí	35
3.2.2	Elektrochemická detekce na SPCE v režimu izokratické eluce	41
3.2.3	Elektrochemická detekce na SPCE v režimu gradientové eluce	43
3.2.4	Kalibrační závislosti směsi aminobifenyl a aminonaftalen	48
4	Závěr.....	50
5	Literatura	52

Seznam použitých zkratek

2-AB	2-aminobifenyl
4-AB	4-aminobifenyl
1-AN	1-aminonaftalen
2-AN	2-aminonaftalen
1 1 1	separační faktor, stupeň disociace
AdSV	adsorpční rozpouštěcí voltametrie
APAH	aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků
BAT	hodnota biologické tolerance (biological tolerance value)
CV	cyklická voltametrie
DPV	diferenční pulsní voltametrie
E_{acc}	akumulační potenciál (V)
E_{det}	detekční potenciál (V)
ESI	ionizace elektrosprejem
FDA	Food and Drug Administration
FIA	průtoková injekční analýza
GC-ECD	plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu
HPLC-AD	vysokouinná kapalinová chromatografie s ampérometrickou detekcí
HPLC-ED	vysokouinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
HPLC-FD	vysokouinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
I_p, I_{poz}, I_s	proud píku, proud pozadí, proud šumu (nA)
k	retenční poměr
K_{ow}	rozdělovací koeficient oktanol-voda
1 1 1	vlnová délka (nm)
L_D, L_Q	mez detekce, mez stanovitelnosti
LDR	lineární dynamický rozsah
LLE	extrakce kapalina-kapalina
LS-AdSV	adsorpční rozpouštěcí voltametrie s lineárním nárůstem potenciálu
MAK	The Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area
MEEKC	mikroemulzní elektrokinetická chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
M_r	relativní molekulová hmotnost
NPV	normální pulsní voltametrie
R	rozlišení
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RP-HPLC	vysokouinná kapalinová chromatografie s reverzní fází
RSD	relativní smrodátná odchylka
s	smrodátná odchylka
SHS	1-heptansulfonát sodný
SPCE	sítotisková uhlíková elektroda
SPE	extrakce na pevné fázi
SW-AdSV	„square wave“ adsorpční rozpouštěcí voltametrie

t_{acc}	akumulační doba (s)
t_R, t'_R	retenční čas, redukovaný retenční čas (min)
w	šířka píku (min)

1 Úvod

1.1 Cíl práce

Diplomová práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v UNESCO laboratorii elektrochemie životního prostředí, kde se provádí výzkum ekologicky, toxikologicky, farmaceuticky a biologicky významných organických sloučenin stanovitelných elektrochemickými metodami.

V předkládané práci je navázáno na diplomové práce Jaroslavy Zavázalové, která se zabývala stanovením 2-aminobifenyly, 4-aminobifenyly, 2-aminonaftalenu a 1-aminonaftalenu vysokouinnou kapalinovou chromatografií s ampérometrickou detekcí (HPLC-AD) na platinových elektrodách a Lucie Maixnerové, která stanovovala 2-aminobifenyly, 3-aminobifenyly a 4-aminobifenyly metodami HPLC-AD a diferenční pulsní voltametrie, kdy v obou případech sloužila jako pracovní elektroda bórem dopovaná diamantová filmová elektroda.

Sítotiskové uhlíkové elektrody (screen-printed carbon electrode, SPCE) jsou dalším typem pracovních elektrod použitelných jako součást ampérometrického detektoru pro účely stanovení aminoderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků (APAH) v této laboratorii. Protože se jedná o první práci zabývající se nasazením tohoto typu elektrod v proudových metodách v této laboratorii, bylo rozhodnuto použít nemodifikované verze těchto elektrod. Bylo pracováno s metodami proudové injekční analýzy (FIA) a vysokouinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC).

Cílem práce bylo získat základní znalosti o chování SPCE použitých pro ampérometrickou detekci v proudových metodách pomocí FIA a ověřit možnost opakovaného použití jedné elektrody v sérii měření v proudové mobilní fázi s a bez podílu organického modifikátoru s využitím 4-aminobifenyly jako modelového analytu. Dále byla vyvinuta metoda separace 4-aminonaftalenu, 2-aminonaftalenu, 2-aminobifenyly a 4-aminobifenyly, pomocí RP-HPLC, a testována stabilita a citlivost SPCE při izokratické a gradientové eluci.

Zájem o stanovení těchto látek v reálných matricích přetrvává, jak dokazuje v roce 2010 vydaná monografie od Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (International

Agency for Research on Cancer, IARC)¹, kvůli jejich prokázanému nepříznivému působení na zdraví člověka.

1.2 Aminoderiváty bifenyly a naftalenu

Aminoderiváty bifenyly a naftalenu patří do skupiny dusíkatých derivátů polycyklických aromatických uhlovodíků. Jejich význam spoívá ve dvou hlediscích. Uplatují se v průmyslové výrobě a zároveň jsou n které deriváty karcinogenní.

Jako příklady lze uvést 1-aminonaftalen a 2-aminobifenyl, které mají průmyslové využití. Používají se jako výchozí látky nebo meziprodukty výroby azo- a diazobarviv, antioxidantů, inidel, herbicidů, léků, pryskyřic a syntetických kaučuků². Na druhé straně jejich polohové izomery 2-aminonaftalen a 4-aminobifenyl jsou podle IARC zařazeny do Skupiny 1: látky karcinogenní pro člověka¹. Komerční výroba těchto izomerů a jejich používání jsou v současnosti v řadě zemí zakázány, stejně jako barviva, ze kterých by se mohly případně uvolňovat. Přesto tyto látky unikají do životního prostředí a člověk může být jejich působením vystaven. Jsou obsaženy v cigaretovém kouři³⁻⁵. 4-aminobifenyl byl nalezen ve výparech kuchyňských jedlých olejů⁶ nebo jako produkt odbourávání barviva Direct Black 38 bakteriálními kulturami⁷. 2-aminonaftalen vzniká spalováním organických látek obsahujících dusík⁸ a dokonce i v těle biotransformačními reakcemi po expozici 2-nitronaftalenu⁹. Tyto látky byly nalezeny jako nečistoty při výrobě 1-aminonaftalenu a 2-aminobifenyly, n kterých léčkových, potravinářských (např. Sunset Yellow FCF, které se v potravinách označuje jako E 110) a kosmetických barviv^{1,10}, v barvách na vlasy^{11,12} a jiných produktech¹³⁻¹⁵. Způsobují hlavně rakovinu močového měchýře, kam jsou po biotransformaci v játrech v rámci vyloučení z těla přes ledviny přenášeny, a kde se tvoří aktivní metabolit. Za ten je považován nitreniový ion, který je schopen vytvářet adukty s DNA, RNA i proteiny (např. hemoglobinem)¹, který vzniká odštěpením endogenní hydrofilní sloučeniny z konjugátu s xenobiotikem. 4-aminobifenyl i 2-aminonaftalen mohou způsobovat vznik reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou příčinou oxidativního poškození DNA a mutací^{16,17}.

Nařízení Evropské komise z roku 2002 zakazuje prodej a používání azobarviv, ze kterých by se mohly uvolňovat zakázané aromatické aminy. Azobarviva, u kterých by mohlo redukčním štěpením azoskupiny vznikat detekovatelné množství 4-aminobifenyly nebo 2-aminonaftalenu, v obou případech 30 ppm, nemohou být používána v textilních a kožených výrobcích, které přicházejí do přímého a trvalého

styku s lidskou kůží nebo ústní dutinou. 4-aminobifenyl ani jeho soli nesmí být obsaženy v jakémkoli kosmetickém přípravku. V Německu byla komise MAK (The Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area) určila hodnota biologické tolerance (BAT, biological tolerance value) 4-aminobifenylu na $10 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ($5,9\cdot 10^{-11} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) v krvi po jeho uvolnění z hemoglobinových aduktů. Americkým úřadem FDA byly povoleny následující koncentrace 4-aminobifenylu ve výrobních barvivech: FD&C Yellow No. 5 (Tartrazin, E102) 5 ppb, FD&C Yellow No. 6 (Sunset Yellow FCF, E 110) 15 ppb a D&C Red No. 33 (Azofuchsin) 275 ppb. Pro výskyt 2-aminonaftalenu nejsou žádnou z těchto organizací limity stanoveny¹.

1.3 Vybrané chemické a fyzikální vlastnosti studovaných látek

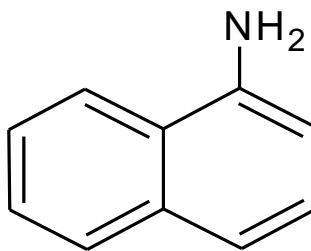
1-aminonaftalen

$C_{10}H_9N$

$M_r = 143,19$

$pK_a = 3,92$ (25°C)

$\log K_{ow} = 2,25$



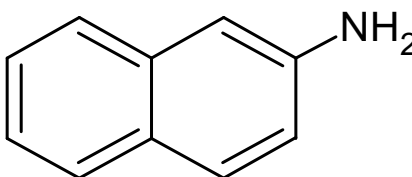
2-aminonaftalen

$C_{10}H_9N$

$M_r = 143,19$

$pK_a = 4,16$ (25°C)

$\log K_{ow} = 2,28$



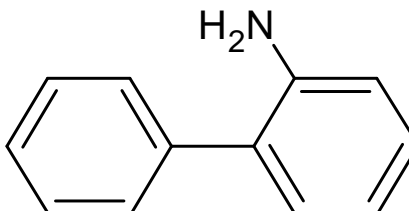
2-aminobifenyl

$C_{12}H_{11}N$

$M_r = 169,23$

$pK_a = 3,83$ (25 °C)

$\log K_{ow} = 2,84$



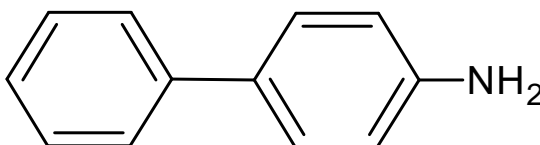
4-aminobifenyl

$C_{12}H_{11}N$

$M_r = 169,23$

$pK_a = 4,35$ (18 °C)

$\log K_{ow} = 2,76$



1.4 Metody stanovení aminoderivátů bifenyly a naftalenu

Matrice, ve kterých se aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků mohou nacházet, mají plynné, kapalné i pevné skupenství – např. vzduch, voda, mořská voda, potravinářská barviva, barvy na vlasy, textilie. Před vlastním stanovením je potřeba analyty od matrice oddělit. To je nejčastěji prováděno vícekrokovou extrakcí v etn. extrakce na pevné fázi (solid phase extraction, SPE) s reverzní fází nebo iontovou párovou extrakcí, v nichž studii i pomocí klasické extrakce kapalina-kapalina (LLE, liquid-liquid extraction) n-hexanem^{12,18} nebo chloroformem¹¹.

Stanovované látky se často vyskytují ve směsích, proto jsou separovány pomocí plynové (GC) nebo vysokou teplotou kapalinové chromatografie. V případě GC je nezbytné aminobifenyly a aminonaftaleny před vlastním stanovením derivatizovat. Z detekčních technik ve spojení s GC převládá hmotnostní spektrometrie (MS). U HPLC se uplatňují MS, UV, fluorescenční a ampérometrická detekce. UV i ampérometrická detekce jsou nedestructivní metody. Jedna využívá absorpci ultrafialové části spektra systémem konjugovaných dvojných vazeb na aromatickém jádru, druhá se uplatňuje díky elektrochemicky aktivní amino skupině navázané na aromatickém jádru, kterou je možné oxidovat.

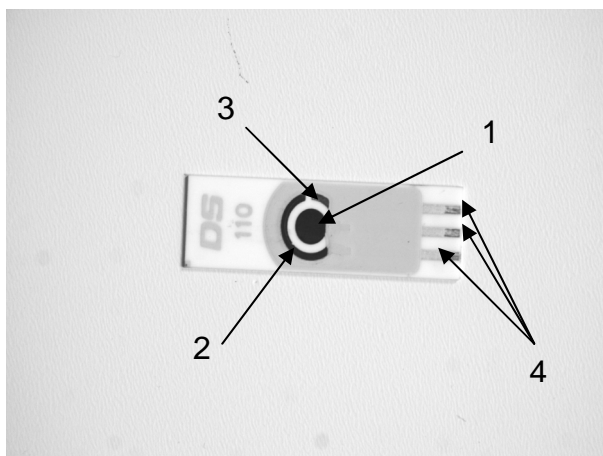
Z dostupných studií vyplývá, že spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií nebo ampérometrickou detekcí je ohledně mezí stanovitelnosti jednotlivých analytů ve vzorcích vody srovnatelné. S oběma lze dané sloučeniny stanovit na úrovni 10^{-11} mol·dm⁻³ (cit. ^{19,20}). Fluorescenční detekce se vedle MS ukázala být velmi citlivou technikou pro stanovení těchto látek ve vzduchu, kdy bylo dosaženo meze detekce 10^{-15} mol·dm⁻³ (cit. ²¹), respektive 10^{-17} mol·dm⁻³ (cit. ²²). V tab. 1 je uveden přehled prací souvisejících se stanovením aminobifenyly a aminonaftalenu, jsou udány meze detekce, metody stanovení a typy matric. Studie jsou uspořádány podle techniky použité k separaci a následně od nejnižší meze detekce k nejvyšší.

Tab. 1 P ehled metod používaných ke stanovení aminonaftalen a aminobifenyl . Jsou uvedeny matrice, metoda stanovení s typem detekce, analyt a mez detekce (L_D).

matrice	metoda	analyt	L_D (mol·dm ⁻³)	citace
vzduch	HPLC-FD	4-AB	$1,1 \cdot 10^{-15}$	21
voda	LC-ESI-MS	4-AB	$1,1 \cdot 10^{-11}$	19
		2-AN	$1,4 \cdot 10^{-11}$	
voda, barviva	μ HPLC-ED	2-AN	$8,9 \cdot 10^{-11}$	20
barvy na vlasy	HPLC-ESI-MS/MS	2-AB	$1,2 \cdot 10^{-9}$	12
		4-AB	$1,7 \cdot 10^{-9}$	
-	HPLC-ED	4-AB	$1,8 \cdot 10^{-9}$	23
		2-AB	$1,8 \cdot 10^{-9}$	
potraviná ské barvivo	HPLC-ED	2-AB	$3,4 \cdot 10^{-9}$	24
		4-AB	$4,3 \cdot 10^{-9}$	
voda	HPLC-ED	2-AB	$3,4 \cdot 10^{-9}$	25
		4-AB	$1,1 \cdot 10^{-8}$	
barviva	HPLC-UV	4-AB	$5,9 \cdot 10^{-9}$	26
		2-AN	$2,5 \cdot 10^{-8}$	
voda	HPLC-ED	2-AN	$8,8 \cdot 10^{-9}$	27
		1-AN	$1,3 \cdot 10^{-8}$	
-	HPLC-ED	2-AN	$7,8 \cdot 10^{-8}$	28
		1-AN	$1,1 \cdot 10^{-7}$	
-	HPLC-UV	2-AN	$2,8 \cdot 10^{-7}$	29
		1-AN	$2,8 \cdot 10^{-7}$	
vzduch	GC-MS/MS	4-AB	$5,9 \cdot 10^{-17}$	22
		1-AN	$7,0 \cdot 10^{-17}$	
voda	GC-ECD	2-AB	$2,6 \cdot 10^{-10}$	30
		4-AB	$6,9 \cdot 10^{-10}$	
		2-AN	$7,3 \cdot 10^{-10}$	
barvy na vlasy, henna	GC-MS/MS	2-AN	$2,8 \cdot 10^{-10}$	11
		1-AN	$2,8 \cdot 10^{-10}$	
		4-AB	$5,9 \cdot 10^{-10}$	
mo	GC-MS	4-AB	$3,0 \cdot 10^{-10}$	18
		2-AN	$5,2 \cdot 10^{-10}$	
		1-AN	$1,0 \cdot 10^{-9}$	
textilie	GC-MS	1-AN	$8,4 \cdot 10^{-9}$	31
		2-AN	$9,1 \cdot 10^{-9}$	
voda	MEEKC	4-AB	$1,5 \cdot 10^{-8}$	32

1.5 Síťotiskové uhlíkové elektrody

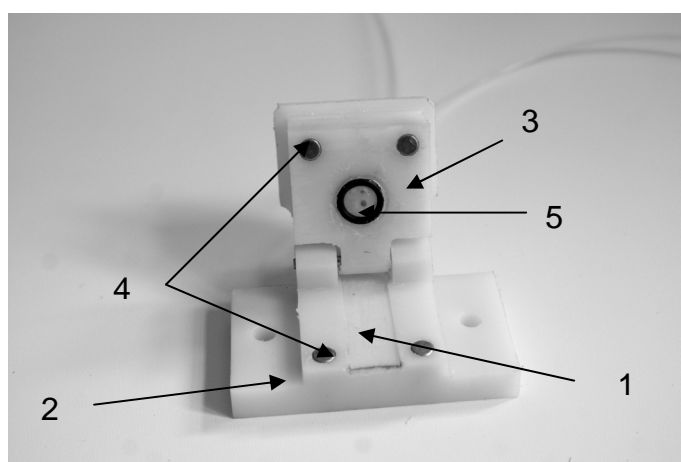
Síťotiskové uhlíkové elektrody se vyrábí ve formě malých proužků, obvykle 20 až 61 mm dlouhých, širokých do 15 mm s výškou podložky neprekraující 1 mm. Jejich komerční výrobou, která je dnes běžná, se zabývá několik firem po celém světě, například: Pine Instrument Company (Grove City, Pensylvánie, USA; <http://www.pineinst.com/echem>), BI Technologies Corporation (Fullerton, Kalifornie, USA; <http://www.bitechnologies.com>), Dropsens, (Llanere (Asturias), Španělsko; <http://www.dropsens.com>), Kanichi Research (Manchester, Velká Británie; <http://www.kanichi-research.com>), BVT Technologies (Brno, Česká republika; <http://www.bvt.cz>), Gwent Electronic Materials (Pontypool, Velká Británie; <http://www.gwent.org>), Uniscan Instruments (Buxton, Velká Británie; <http://www.uniscan.com/>), Ecobioservices & Research (Firenze, Itálie; <http://www.ebsr.it>), ALS Co. (Tokyo, Japonsko; <http://www.als-japan.com>), Zensor R&D (Dali City, Taiwan; <http://www.zensor.com.tw>). Lze je pomocí vlastního přístroje připravit i v laboratoři. SPCE se liší nejprve uspořádáním a tvarem natisknutých pracovní, pomocné a referentní elektrody (např. kruhový, obdélníkový), složením inkoustu a materiálem podložky. Mění v této práci byla prováděna na elektrodách, které jsou ukázány na obr. 1



Obr. 1 Typické uspořádání síťotiskové elektrody na keramické podložce. Grafitová pracovní (1), grafitová pomocná (2) a argentchloridová pseudoreferentní elektroda (3), textilní elektrické kontakty elektrod (4). Výrobce Dropsens (Llanere, Španělsko).

Inkousty jsou složeny z různých poměrů grafitového prášku a organického pojiva rozpuštěného v organickém rozpouštědle a tisknou se na skleněné, plastové (PVC, polyester)^{33,34} nebo keramické³⁵ podložky.

S elektrodami je možné provádět vsádková měření v běžných voltametrických celách nebo mohou být zařazeny jako měřicí jednotky ampérometrických detektorů v upravených celách pro proudková měření (FIA, HPLC)³⁶⁻³⁸. Ty jsou v současnosti dostupné také od několika výrobců, například: Dropsens, Ecobioservices & Research, Zensor R&D, BVT Technologies, nebo Uniscan Instruments. Proudková celda používaná v této práci byla navržena podle prototypu od firmy Dropsens a je zobrazena na obr. 2.



Obr. 2 Proudková detekční celda pro sítotiskové uhlíkové elektrody vyrobená ze silonu. (1) umístění elektrody, (2) základna cely, (3) sklopitelné víko, (4) magnetické svorky, (5) přítok a odtok mobilní fáze.

Výhody tisknutých uhlíkových elektrod jsou dány jejich malými rozměry, výrobní cenou, snadnou a rychlou předúpravou a značnou rozmanitostí modifikací. Rozměry elektrodové podložky umožňují jejich využití v plynosných zařízeních pro měření *in situ*. Malá plocha pracovní elektrody zajišťuje malou spotřebu vzorku. Pokud je vzorek nanesen přímo na povrch elektrody, stačí pro provedení analýzy množství 10 μ l (cit. ³⁹). Sítotiskové uhlíkové elektrody jsou považovány především za jednorázová zařízení, tj. po provedení jedné analýzy se vyhodí. Takovéto zacházení dovoluje nízká výrobní cena. Jednorázovým použitím se vyřeší problémy se zanášením elektroaktivních míst na povrchu elektrody produkty redoxních procesů a nechtěná adsorpce. Tyto problémy se často vyskytují při používání tuhých elektrodových

materiál (např.: kovy, amalgám, kompozitní materiály)⁴⁰⁻⁴³. Pasivaci elektrodového povrchu u pevných elektrod může zabránit jejich předúprava. Z některých provedených studií vyplývá, že u sítotiskových elektrod není nutné předúpravu před měřením provádět, a přesto je dosaženo spolehlivých výsledků^{34,35,44,45}. Tento časový nenáročný krok může však v jiných případech své opodstatnění. Pomocí jednoduché předúpravy bylo dosaženo významné výhody při stanovení polohových izomerů aminofenolu nebo hydrochinonu a katecholu, aniž by musela být provedena jejich předběžná separace^{46,47}. Jedním z kroků je aktivace, kterou se ovlivují elektrochemické vlastnosti elektrodového povrchu^{38,48}. Aktivaci je možné provést cyklickou voltametrií v oblasti kladných potenciálů, po níž následuje vložení kladného potenciálu, který se nachází mimo potenciálové okno elektrody. Doba, po kterou je potenciál na elektrodu vložen, se v různých studiích liší od 180 do 900 sekund^{37,38}. Tento postup lze zjednodušit na pouhou preanodizaci elektrody vložением kladného potenciálu⁴⁶⁻⁴⁸. Preanodizaci je možné dosáhnout nárůstu odezvy analytu. Její účinek spoívá ve změnách, které probíhají ve struktuře povrchu elektrody, kde mimo jiné dochází k tvorbě karboxylových a hydroxylových skupin a změně orientace grafitových částic⁴⁸. Wang a Su ve své studii popisují utvoření jak velkých pórů, tak i sítovitinek s nanometrovými rozměry a utvoření několika vrstev povrchu⁴⁶. Tyto struktury přispívají ke zvětšení elektrodového povrchu. Také se ukazuje, že preanodizovaný povrch má elektrokatalytické účinky a vede ke snadnější oxidaci sledovaných látek, což je dokázáno posunem potenciálu k méně kladným hodnotám oproti elektrodám, kde tato předúprava neprobíhá^{46,47}.

Sítotiskové uhlíkové elektrody lze snadno modifikovat velkým počtem různých látek. Modifikace se provádí z důvodů zvýšení selektivity a citlivosti ke stanovovaným látkám. Nejběžnější způsoby zahrnují pokrytí povrchu elektrody tenkou vrstvou kovového filmu, roztokem enzymu nebo DNA a imobilizaci antigenů nebo protilátek. U modifikovaných elektrod rozlišujeme i způsob navázání modifikátoru. Všechny zmíněné modifikace jsou přehledně shrnuty v těchto lánkách^{49,50}. Další možností je přimíchání modifikátoru přímo ke složkám inkoustu pracovní elektrody^{51,52}.

Při použití SPCE u proudových metod je potřeba v novat pozornost obsahu organické složky mobilní fáze, který může zodpovídat za rozpouštění izolovaných inkoustů nebo snížení meze detekce a citlivosti metody^{33,39}. U vsádkových metod

ovlivňuje obsah organické složky akumulaci analytu na povrch elektrody z roztoku pufru. Pro vodní roztoky sítotiskové uhlíkové elektrody sloužit jako jednorázové senzory, ale ukázalo se, že za určitých podmínek mohou být použity i opakovaně^{35,36}. V takovém případě je jejich povrch obnovován elektrochemickým čištění. Zanonovávali postup, kdy ponořili elektrodu mezi jednotlivými měřeními do roztoku KCl o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a vložili na ni potenciál $+1,2 \text{ V}$ po dobu 30 s. Při voltametrickém stanovení aurothiomalátu dosáhli při pěti opakovaných měřeních na jedné elektrodě hodnoty relativní směrodatné odchylky (RSD) 4,5% pro opakovatelnost výšky odezvy. Při vyhodnocení reprodukovatelnosti činila relativní směrodatná odchylka 5,9% pro tři různé elektrody³⁵. Stanovení prokainu metodou FIA poskytlo relativní směrodatnou odchylku 3,2% pro patnáct opakovaných měření na jedné elektrodě³⁶.

1.6 Použití nemodifikovaných sítotiskových uhlíkových elektrod při stanovení organických sloučenin

Nemodifikované sítotiskové uhlíkové elektrody byly využívány při studiích léků^{36,44}, klinických stanoveních^{35,48}, stanoveních ekologicky významných sloučenin^{33,45-47,53,54} a sloučenin z oblasti potravinářského³⁴ a kosmetického průmyslu³⁸. Výčet studovaných látek je podán v tab. 2 spolu s postupem předúpravy SPCE, použitými elektroanalytickými metodami, podmínkami stanovení, lineárním dynamickým rozsahem (*LDR*) a mezí detekce (*L_D*). SPCE byly testovány pro stanovení procainu³⁶ a cysteinu i tyrosinu⁴⁴ v lévech a aurothiomalátu ve vzorcích lidské moči³⁵. Byly využity pro neenzymatické, selektivní stanovení kreatininu v krvi⁴⁸. S jejich pomocí byly stanovovány linkomycin³⁷ a vitamin B₂ (cit. ³⁴) v krmivech, různých potravinách a potravinových doplncích. Jsou využitelné i jako citlivé senzory pro stanovení sloučenin, které mohou způsobovat znečištění životního prostředí, jako jsou aminofenoly⁴⁷, hydrochinon a katechol⁴⁶ a 2,6-dinitrotoluen⁴⁵.

Z tab. 2 vyplývá, že lineární dynamické rozsahy daných metod se pohybují v rozmezí dvou, tří řádů. Nejširší LDR dosahující čtyř řádů byl zjištěn u stanovení linkomycinu metodou HPLC s ampérometrickou detekcí. Ve všech případech byly zaznamenány meze detekce na úrovni mikromolárních koncentrací

a často i nižší. Nejnižší meze detekce byly řádu $10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a bylo jich dosaženo v těchto studiích^{37,46,47,53}.

Tab. 2 Použití nemodifikovaných sítotiskových uhlíkových elektrod při stanovení organických sloučenin

analyt	předúprava SPCE	elektroanalytická metoda, uspořádání, podmínky	LDR [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	L_D [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	cit.
aurothiomalát	-	Analýza léků a klinické analýzy LS-AdSV (anodická), $t_{\text{acc}} = 60$ s, $E_{\text{acc}} = -1.5$ V, $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl (pH 1,0)	1,43 – 155	0,65	35
procain	-	FIA/AD , $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octan sodný pH 6,0	9,0 – 100,0	6	36
cystein	-	Ampérometrie v míchaném roztoku, $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosforenanový pufr pH 7,0	10 – 200	-	44
tyrosin	-	SWV , $E_{\text{acc}} = +1,8$ V, $t_{\text{acc}} = 50$ s, fosforenanový pufr pH 6,7	10 – 300	-	48
kreatinin	+2,0 V po dobu 400 s ve fosforenanovém pufru pH 6,7	SWV , $E_{\text{acc}} = +1,8$ V, $t_{\text{acc}} = 50$ s, fosforenanový pufr pH 6,7	360 – 3700	8,6	48
linkomycin	CV v $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátovém pufru pH 7,0; +2,0 V po dobu 180 s	Analýza potravin HPLC/AD , acetonitril/methanol/ $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosforenanový pufr pH 6,0 (5:20:75)	0,05 – 1000	0,08	37
vitamin B2	-	DPV , octano-fosforenanový/KCl pufr pH 6,0	2,66 – 61,1	2,39	34
chlorofyl a	-	Environmentální analýzy LS-AdSV , ex-situ akumulace v $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosforenanovém pufru pH 7,0; 1% aceton, $t_{\text{acc}} = 60$ s při otevřeném proudovém obvodu, LSV v $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosforenanovém pufru pH 7,0	0,4 – 2,24	0,014	53

analyt	p edúprava SPCE	elektroanalytická metoda, uspo řádání, podmínky	<i>LDR</i> [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	<i>L_D</i> [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	cit.
2-aminofenol	CV v $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	NPV , $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfore nanový pufr pH 7,0	0,2 – 100	0,07	47
3-aminofenol	fosfore nanovém		3,0 – 200	0,16	
4-aminofenol	pufru pH 7,0		0,2 – 200	0,05	
hydrochinon	+2,0 V po dobu	SW-AdSV (anodická), $t_{\text{acc}} = 180\text{ s}$, $E_{\text{acc}} = -0,3\text{ V}$; $0,1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfore nanový pufr pH 6,0	0,1 – 50	0,05	46
katechol	900 s v $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfore nanovém pufru pH 7,0		0,1 – 70	0,05	
2,6-dinitrotoluen	-	LS-AdSV (anodická), $t_{\text{acc}} = 30\text{ s}$, $E_{\text{acc}} = -1,1\text{ V}$, $50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfore nanový pufr pH 1,8	0,88 – 752	0,88	45
kyselina thioglykolová	CV v $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfore nanovém pufru pH 7,0; +2,0 V po dobu 240 s	Ostatní HPLC/AD , acetonitril/ $0,075\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfore nanový pufr pH 3,0 (5:95) s $10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ SHS	2,2 – 220	0,46	38

2 Experimentální část

2.1 Reagencie

Byly použity tyto chemikálie: 2-aminobifenyl (97%, Sigma Aldrich), 4-aminobifenyl (97%, Sigma Aldrich), 1-aminonaftalen (98%, Sigma Aldrich), 2-aminonaftalen (95%, Sigma Aldrich), acetonitril (LiChrosolv® HPLC grade, Merck, N mecko), dodekahydrát dihydrogenfosfore nanu sodného (Lachema, Brno, eská republika), kyselina fosfore ná (85%, istota p.a., Lach-Ner, Neratovice, eská republika), hexakvanoželeznatan draselný (Lachema, Brno, eská republika), deionizovaná voda (Milipore Q-plus System, Milipore, USA).

2.2 Aparatura

Kapalinový chromatograf tvo ily tyto sou ásti: Gradientová pumpa L-7100, autosampler L-7200, spektrometrický UV/VIS detektor L-7400, ídící jednotka D-7000 (vše Merck-Hitachi, N mecko), potenciostat ADLC2 (Laboratorní p ístroje, eská republika), kolona LiChroCART® Purosphere STAR RP-18e, 125x4 mm, 5 μ m (Merck, N mecko). P es ídící jednotku byl chromatograf propojen s osobním po íta em a byl ovládán programem HSM (Merck-Hitachi, N mecko) pracujícím v opera ním systému MS Windows NT. Odvzdušn ní mobilní fáze bylo provád no ultrazvukovou lázní p ístrojem PSO 2000A Ultrasonic Power Cleaner (Powersonic, USA) a heliem 5,0 (Linde gas, eská republika). Hodnota pH fosfore nanového pufru byla stanovována na pH metru (Jenway, Velká Británie)

Ampérometrický detektor se skládal z prototypu pr tokové detek ní cely ukázané na obr. 2 vyrobené ze silonu podle originálu od firmy Dropsens a sítotiskové uhlíkové elektrody vyrobené firmou Dropsens (Llanere (Asturias), Špan lsko). Sítotisková elektroda byla tvo ena uhlíkovou pracovní elektrodou, uhlíkovou pomocnou elektrodou a pseudoreferentní argentchloridovou elektrodou viz obr. 1.

2.3 Použité vzorce

retení poměr k:

$$k = (t_r - t_M) / t_r$$

t_r – retenční čas

t_M – mrtvý čas

separační faktor

$$= k_2 / k_1$$

– separační faktor

k_2, k_1 – retenční poměry

rozlišení pík R:

$$R = 2 \cdot (t_{r,2} - t_{r,1}) / (w_1 + w_2)$$

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

w_1, w_2

stupeň disociace

$$= 1 \cdot 10^{(\text{pKa} - \text{pH})} / 1 + 1 \cdot 10^{(\text{pKa} - \text{pH})}$$

– stupeň disociace

2.4 Pracovní postupy

2.4.1 Aktivace elektrody

Každá použitá síťotisková uhlíková elektroda byla před prvním měřením aktivována ponořením do roztoku $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosforenanového pufru o pH 7,0.

Na elektrodu byl vložen kladný potenciál +1,2 V po dobu 120 sekund. Tento postup byl převzat z cit.⁵⁵. Reverzibilita procesů probíhajících na elektrodě a schopnost elektrody poskytovat odezvu byla po každé aktivaci zkoušena cyklickou voltametrií v $0,001 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ v roztoku $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl.

2.4.2 Separace směsí

Zásobní roztoky 1-aminonaftalenu, 2-aminonaftalenu, 2-aminobifenylu a 4-aminobifenylu o koncentracích $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a objemu 100 ml byly připraveny přesným navážením příslušného množství stanovovaných látek a rozpuštěním v acetonitrilu. Z těchto zásobních roztoků byly získávány roztoky o nižších koncentracích. Separace stanovovaných látek byla prováděna na neizotermovaném kolonu LiChroCART® Purosphere STAR RP-18e, 125x4 mm, 5 μm . Mrtvý čas kolony byl určen experimentálně pomocí vodního roztoku $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a mrtvou hodnotu 0,9 min. Hodnota vlnové délky UV detekce byla nastavena na 290 nm (cit. ⁵⁶). Na kolonu bylo dávkováno 20 μl vzorku⁵⁷, v němž měla každá látka koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, pokud není uvedeno jinak. Míchání acetonitrilu a fosforenanového pufru pro mobilní fázi probíhalo pomocí pumpy. Fosforenanový pufr o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven odvážením příslušného množství $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a rozpuštěním v deionizované vodě. Hodnota pH fosforenanového pufru byla upravována pomocí H_3PO_4 . Prtok mobilní fáze byl nastaven na $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Tato hodnota byla převzata z diplomové práce Lucie Maixnerové⁵⁷.

2.4.3 Zpracování experimentálních dat

Ke zpracování grafů a výpočtů uvedených v této práci byly použity programy OriginPro 8 (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA). Chybové úseky vyjadřující interval spolehlivosti byly vypočteny

jako součástí směrodatné odchylky sedmi po sobě jdoucích měření a příslušného tabelovaného koeficientu intervalu spolehlivosti pro daný počet měření ($r = 0,05$). Odhad meze detekce byl stanoven jako nejnižší vyhodnotitelná koncentrace dané látky z příslušných FIA záznamů nebo chromatogramů a odhad meze stanovitelnosti jako 3,3 násobek odhadu meze detekce. Takto odhadnuté hodnoty byly porovnávány s mezí detekce (L_D) a mezí stanovitelnosti (L_Q) stanovenými jako koncentrace analytu odpovídající podílu trojnásobku a desetinásobku absolutní hodnoty proudu šumu (I_s) a směrnice kalibrační přímky (b): $L_D = 3I_s / b$ a $L_Q = 10 I_s / b$. Hodnota proudu šumu pro FIA byla při detekčním potenciálu +0,9 V 6,0 nA, u HPLC činila při stejném potenciálu 7,4 nA. Opakovatelnost výšky proudu píku, retenčních časů a rozlišení pík v režimu gradientové eluce byly srovnány ze čtyř následných měření na jedné elektrodě.

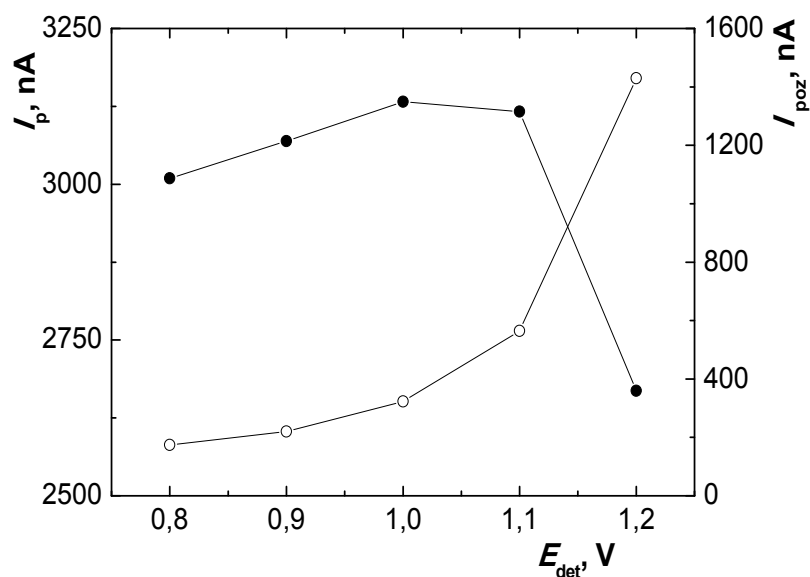
3 Výsledky a diskuze

3.1 Stanovení 4-aminobifenyly na tištných uhlíkových elektrodách v proudové injekční analýze

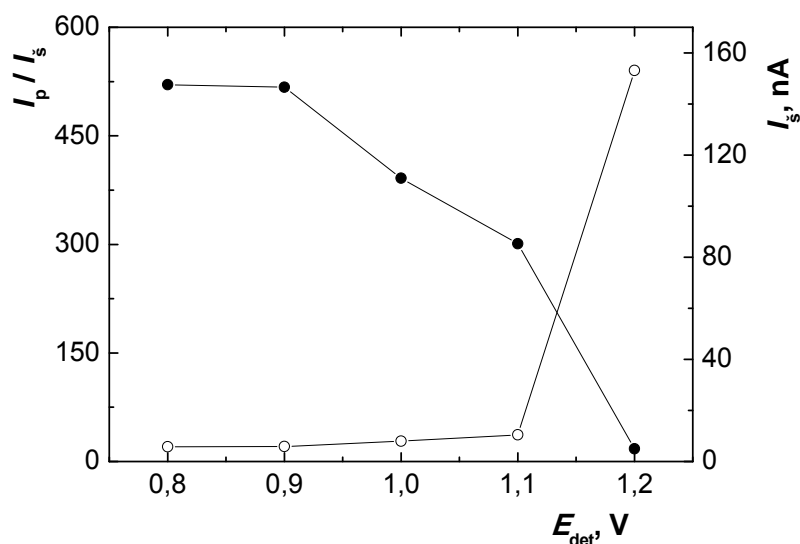
3.1.1 Vlastnosti SPCE v proudě a optimalizace podmínek pro stanovení 4-aminobifenyly

Metoda proudové injekční analýzy sloužila k získání základních poznatků o chování sítotiskové uhlíkové elektrody v proudě kapaliny. Za modelovou látku byl vybrán 4-aminobifenyly. Ve vodné mobilní fázi tvořené $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosforenanovým pufrům byly zjišťovány velikost proudů píku 4-aminobifenyly, velikost proudů pozadí a proudů šumu v závislosti na vloženém detekčním potenciálu v rozsahu od +0,8 V do +1,2 V. Nejvyšší odezva byla pro 4-aminobifenyly naměřena při potenciálu +1,0 V, jak je patrné z obr. 3. Hodnoty proudů pozadí a proudů šumu se s rostoucím potenciálem zvyšovaly.

Ze získaných dat byla spočítána hodnota podílu proudů píku a proudů šumu. Tato hodnota je podstatná z hlediska předpokládané dosažitelné meze stanovitelnosti a meze detekce. Závislost poměru proudů píku a proudů šumu na detekčním potenciálu ukazuje obr. 4. Kritická hodnota tohoto poměru klesala při potenciálech vyšších než +0,9 V; tento potenciál byl používán i v dalších experimentech. Při tomto potenciálu měl proud šumu hodnotu 6,0 nA.



Obr. 3 Závislost proudu píku (I_p) 4-AB (●) o $c = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a proudu pozadí (I_{poz}) (○) na detekčním potenciálu (E_{det}) vloženém na pracovní elektrodu. Mobilní fáze tvořená fosforem nanovým pufrům, $c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{pH} = 3,0$. Měno technikou FIA s ampérometrickou detekcí na SPCE, dávkováno $20 \mu\text{l}$, proudová rychlost $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

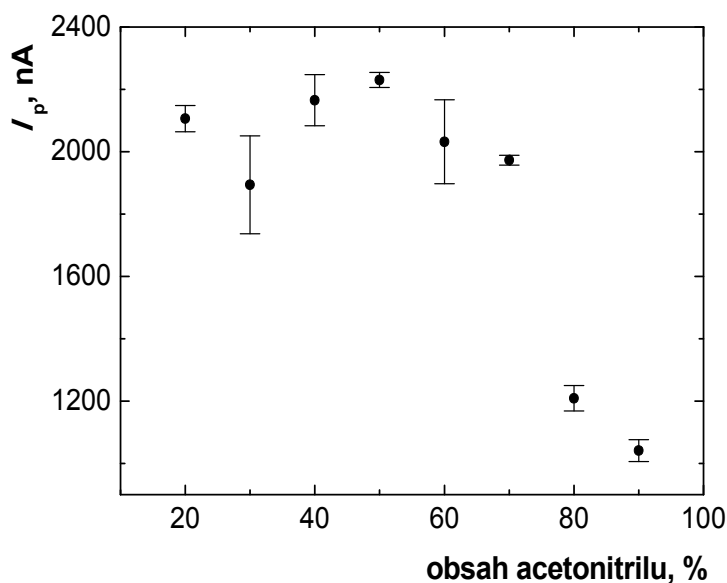


Obr. 4 Závislost poměru proudu píku a proudu šumu (I_p/I_s ; ●) 4-AB o $c = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a samotného proudu šumu (I_s) (○) na detekčním potenciálu (E_{det}) vloženém na pracovní elektrodu. Podmínky stejné jako na obr. 3.

Pro elektrochemickou detekci je nezbytné, aby mobilní fáze byla dostatečně vodivá, což je zajištěno vodným roztokem fosforenanového pufru. Vzhledem k uvažované separaci směsi aminonaftalen a aminobifenyl na reverzní fázi musela být mobilní fáze modifikována přidáním organické složky, v tomto případě acetonitrilem, aby došlo k eluci analytů v přijatelném čase. Zároveň musel být brán ohled na skutečnost, že organická složka snižuje vodivost a tím ovlivňuje velikost odezvy analytu.

Pro vodní proudková čela od firmy Dropsens byla vyrobena z polymethylmethakrylátu, který je vzhledem ke své rozpustnosti v organických rozpouštědlech nevhodný pro mobilní fáze s vysokým přidáním organického modifikátoru. Nový prototyp byl proto vyroben z materiálu odolnějšího vůči poměrně vysokému obsahu acetonitrilu, ze silonu.

Při výrobních postupech pracovní elektrody sítotiskových elektrod je používáno k vytvoření inkoustu z grafitového prášku organické pojivo rozpustné v organickém rozpouštědle. Acetonitril v mobilní fázi by mohl pojivo rozpouštět a tím omezovat počet měření provedených na elektrodě nebo by mohl mít vliv na pracovní charakteristiky elektrody. Z výše uvedených důvodů byl sledován vliv obsahu acetonitrilu v mobilní fázi v rozmezí od 20 do 90 objemových procent na velikost odezvy a stabilitu sítotiskových elektrod. Z obr. 5 je vidět, že sítotisková uhlíková elektroda vykazuje poměrně konstantní odezvu pro sedm následných měření při obsahu acetonitrilu od 20 do 70 objemových procent v mobilní fázi. Při vyšším zastoupení je odezva výrazně nižší. Opakované záznamy FIA měření, při kterých nedocházelo k statisticky významné změně odezvy, prokázaly, že na sítotiskové uhlíkové elektrodě nedochází za daných pracovních podmínek k pasivaci elektrody. Pasivace elektrody v důsledku tvorby polymerních filmů byla popsána při stanovení 2-aminobifenylu, 3-aminobifenylu a 4-aminobifenylu^{25,58} nebo anilinu⁵⁹ na bórem dopovaných diamantových elektrodách.

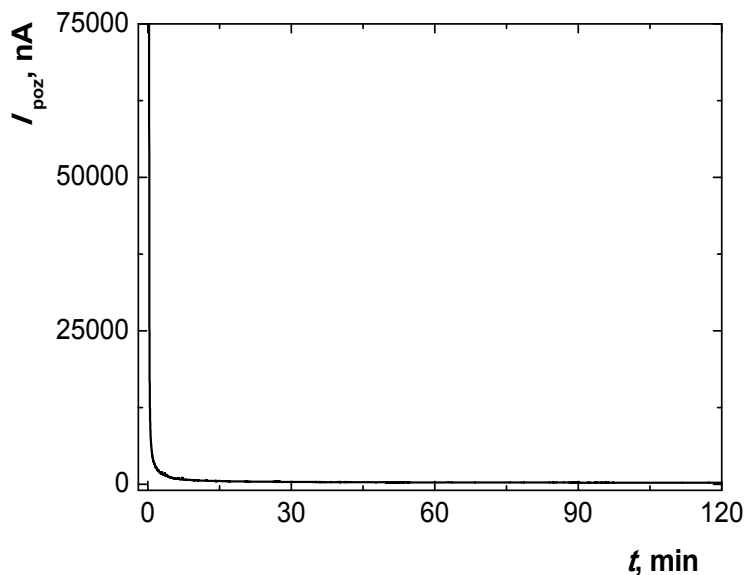


Obr. 5 Závislost výšky píku (I_p) 4-aminobifenyly ($c = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Měno technikou FIA s ampérometrickou detekcí na SPCE při $E_{\text{det}} = +0,9 \text{ V}$. Pr toková rychlost mobilní fáze $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Vodná složka pufrů tvořena $0,01\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosforem nanovým pufrům pH 3,0. Dávkováno $20 \mu\text{l}$. Chybové úseky sestaveny pro $\sigma = 0,05$ ($n = 7$).

Z obr. 5 také vyplývá, že opakovatelnost měření na elektrodě není závislá na obsahu acetonitrilu. V případě 30% a 60% zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi se hodnota relativní směrodatné odchylky ze sedmi po sobě jdoucích měření pohybuje do 10 %, v ostatních případech je nižší než 5 %. To svědčí o rozdílné kvalitě jednotlivých kusů sítotiskových uhlíkových elektrod. Veliké rozdíly byly pozorovány v poměru měření proveditelných na jedné elektrodě. Zde nebyl nalezen žádný vliv obsahu acetonitrilu. Společně pro všechny elektrody použité pro tento experiment bylo, že vydržely nejméně sedm po sobě jdoucích měření s přijatelnou opakovatelností. Nejvyšší zaznamenaný počet měření na jedné elektrodě s vysokou opakovatelností (RSD nižší než 5%) byl 26 a byl získán v mobilní fázi s 20% a 70% obsahem acetonitrilu. Nejdelší dobu vydržela elektroda, na které bylo provedeno 116 měření. Metodou FIA bylo možné provést 31 měření za hodinu.

Aby bylo zjištěno, zda je výška píku ovlivněna proudem pozadí, byla sledována rychlost ustálení proudu pozadí po vložení detekčního potenciálu $+0,9 \text{ V}$. Ten zpočátku s časem velmi rychle klesal. Po vložení detekčního potenciálu na elektrodu dosahoval

hodnoty 75 μA , v páté minutě 1,0 μA a v desáté minutě 626 nA. Po 120 minutách se jeho hodnota pohybovala okolo 230 nA. Celý průběh je vidět na obr. 6. Deset minut po vložení potenciálu na elektrodu bylo možné provést měření, aniž by proud pozadí ovlivňoval velikost odezvy 4-aminobifenyly.

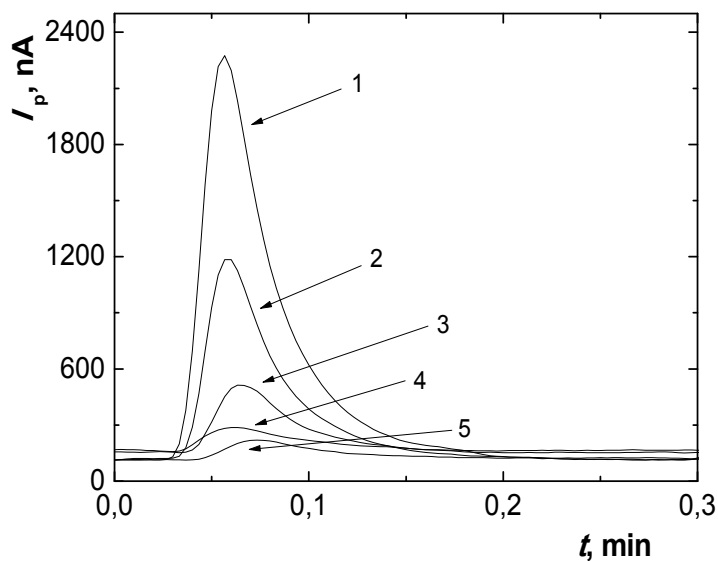


Obr. 6 Vývoj velikosti proudu pozadí (I_{poz}) v závislosti na čase. Měřeno technikou FIA s ampérometrickou detekcí na SPCE při $E_{\text{det}} = +0,9 \text{ V}$. Průtoková rychlost mobilní fáze ($0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosforenanový pufr pH 3,0) $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

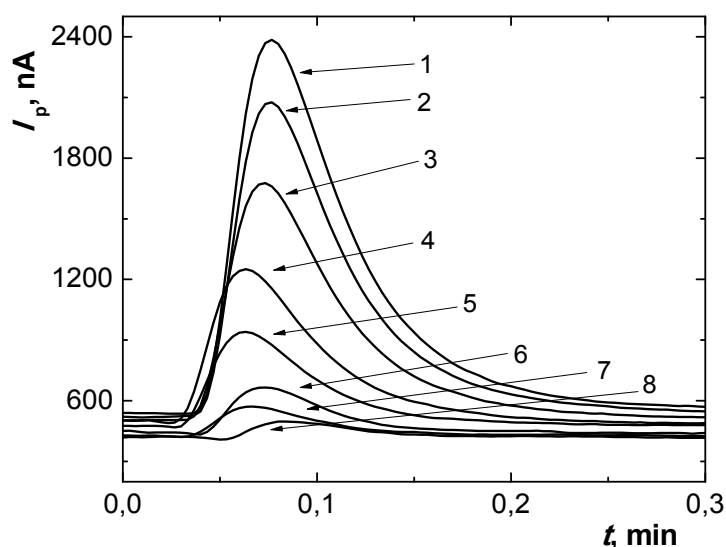
3.1.2 Kalibrační závislosti 4-aminobifenyly

Záznamy FIA z měření kalibračních závislostí 4-aminobifenyly ukazují obr. 7 a obr. 8. V případě měření představeném na obr. 7 byl jako mobilní fáze použit $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosforenanový pufr pH 3,0. Kalibrační závislost byla měřena v rozsahu koncentrací $1 - 100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Nejnižší vyhodnotitelnou koncentrací byla hodnota $1,0 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Mez detekce a mez stanovitelnosti vypočtené z regresní rovnice po dosažení trojnásobku, případně desetinásobku proudu šumu, jehož hodnota byla 6 nA, byla rovna $0,9 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, a $2,8 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Kalibrační závislost byla lineární v celém rozsahu měřených koncentrací. Měření zobrazené na obr. 8 bylo prováděno s mobilní fází ve složení acetonitril a $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosforenanový pufr pH 3,0 v poměru 40:60 objemových procent; tato mobilní fáze byla později použita pro izokratickou eluci směsí aminonaftalen a aminobifenyl v HPLC. Kalibrační závislost byla měřena v rozsahu koncentrací $1 - 100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Nejnižší vyhodnotitelná koncentrace měla hodnotu

$2,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Výpočet z regresní rovnice kalibrační přímky byla zjištěna mez detekce $1,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a mez stanovitelnosti $3,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Kalibrační závislost byla lineární v celém měřeném rozsahu. Charakteristika kalibračních přímek je shrnuta v tab. 3.



Obr. 7 Záznamy FIA z měření kalibrační závislosti 4-aminobifenyly. Koncentrace 4-AB: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (1), $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (2), $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (3), $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (4), $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (5). Mobilní fáze – fosforenanový pufr ($c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{pH} = 3,0$). Ampérometrická detekce na SPCE při $E_{\text{det}} = +0,9 \text{ V}$. Dávkováno $20 \mu\text{l}$. Dávkované vzorky obsahují 10 objemových % acetonitrilu.



Obr. 8 Záznamy FIA z měření kalibrační závislosti 4-aminobifenylu. Koncentrace 4-AB: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (1), $80 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (2), $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (3), $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (4), $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (5), $8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (6), $4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (7), $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (8). Mobilní fáze acetonitril:fosforenanový pufr ($c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{pH} = 3,0$) (40:60, V/V). Ampérometrická detekce při $E_{\text{det}} = +0,9 \text{ V}$, dávkováno $20 \mu\text{l}$.

Tab. 3 Souhrn parametrů kalibračních přímek pro 4-aminobifenyl měřených metodou FIA při detekčním potenciálu $E_{\text{det}} = +0,9 \text{ V}$ ve vodné mobilní fázi a v mobilní fázi s podílem organického modifikátoru, dávkováno $20 \mu\text{l}$ vzorku, prtoková rychlost $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

koncentrace ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	smrnice ($\text{mA}\cdot\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}$)	úsek (nA)	korelační koeficient	L_D ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	L_Q ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
1 – 100 ^a	$21,3 \pm 0,7$	$-2,8 \pm 3,5$	0,999	0,9	2,8
2 – 100 ^b	$18,0 \pm 3,2$	$78,9 \pm 16,6$	0,998	1,0	3,3

^a mobilní fáze – fosforenanový pufr, $c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{pH} 3,0$,

^b mobilní fáze – acetonitril:fosforenanový pufr, $c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{pH} 3,0$ (40:60, V/V)

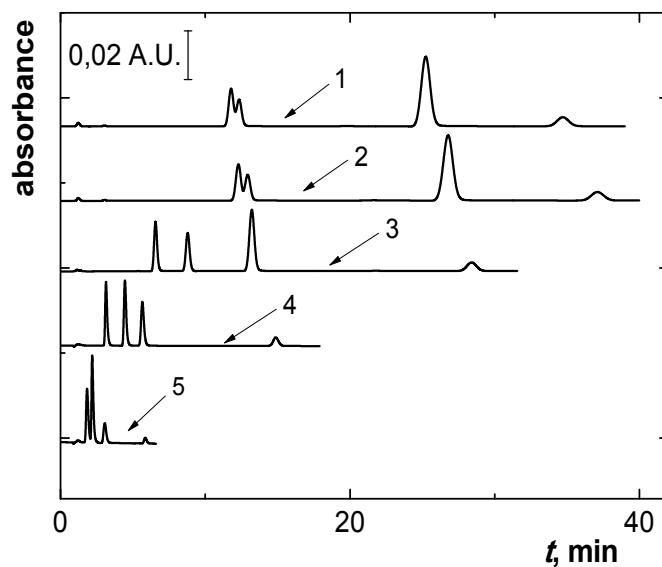
3.2 Separace a detekce směsi aminonaftalen a aminobifenyl vysokou a jinou kapalinovou chromatografií

3.2.1 Izokratická eluce směsi aminonaftalen a aminobifenyl s UV detekcí

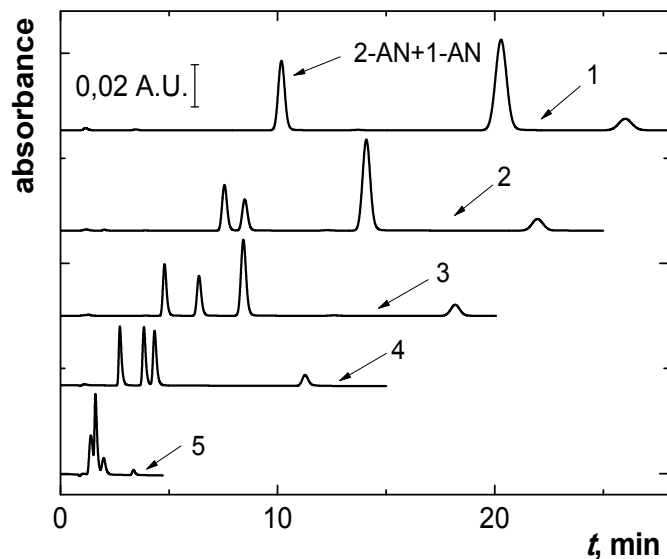
Obsah organické složky v mobilní fázi ovlivňuje retenční faktory jednotlivých látek. Principem je snížení povrchového napětí mobilní fáze. Vyšší obsah organické složky v chromatografii na reverzní fázi způsobí zkrácení retenčních časů analytů. Dalším významným faktorem je hodnota pH vodné složky mobilní fáze. Ta ovlivňuje, zda a jaké množství látky se na základě své hodnoty pK_a vyskytuje v ionizované nebo neionizované formě. Ionizovaná forma bude zadržována méně než neionizovaná forma. Tento faktor bude hrát roli při rozlišení pák jednotlivých analytů. Pro kvantitativní analýzu je výhodné, aby hodnota rozlišení mezi dvojicemi pák byla větší než 1,5.

Při hledání nejvhodnějších podmínek pro separaci směsi aminonaftalen a aminobifenyl byly využity poznatky z práce Jaroslavy Zavázalové⁶⁰. Byly testovány mobilní fáze s 30%, 35% a 40% zastoupením acetonitrilu, zbytek tvořil $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosforenanový pufr. V každé z těchto mobilních fází bylo měřeno pH fosforenanového pufru na tyto hodnoty: 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 a 5,0. Při izokratické eluci byly látky eluovány vždy v pořadí 2-aminonaftalen ($pK_a = 4,16$), 1-aminonaftalen ($pK_a = 3,92$), 4-aminobifenyl ($pK_a = 4,35$), 2-aminobifenyl ($pK_a = 3,83$). Všechny zastoupené látky ve vzorku měly koncentraci $100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Obr. 9 znázorňuje vliv pH na separaci analytů v mobilní fázi s 30% obsahem acetonitrilu. Stejná závislost je vidět na obr. 10 pro 35% obsah acetonitrilu a na obr. 11 pro 40% obsah acetonitrilu. Z porovnání jednotlivých chromatogramů na uvedených obrázcích, které se liší obsahem acetonitrilu, ale mají stejné pH fosforenanového pufru, je patrné snižování retenčních časů aminonaftalen a aminobifenyl s rostoucím obsahem acetonitrilu, což je v souladu s teorií. U všech mobilních fází je při pH 5,0 rozlišení pák 2-aminonaftalenu a 1-aminonaftalenu velmi nízké nebo dochází k jejich koeluci. Při pH 4,0 je rozlišení dostatečné pouze v mobilní fázi s 35% obsahem acetonitrilu, u ostatních nejsou píky 2-aminonaftalenu a 1-aminonaftalenu rozděleny až na základní linii. Retenční čas 2-aminobifenylu, 22 minut, je pro analýzu příliš dlouhý. Rozlišení větší než 1,5 bylo dosaženo při pH 3,0 pro všechny použité mobilní fáze. Při pH 2,5 vyhovují podmínky pro kvantitativní analýzu mobilní fáze s 30% a 35% obsahem acetonitrilu. Spodní hranicí pro použití

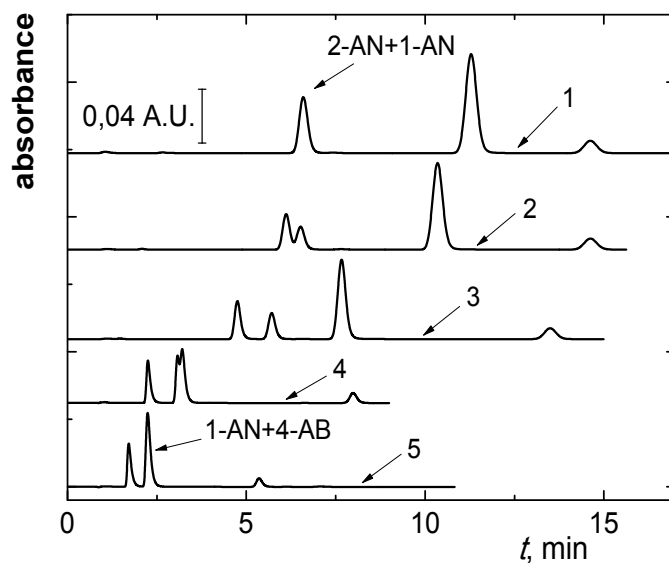
silikagelových stacionárních fází je pH 2,0. Při tomto pH je u všech mobilních fází rozlišení mezi prvním a druhým nebo druhým a třetím píkem nedostatečné. Zaznamenané píky odpovídají po adí 2-AN, 1-AN, 4-AB a 2-AB, pokud není uvedeno jinak.



Obr. 9 Chromatogramy směsí aminonaftalen a aminobifenyl, každý o $c = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ při pH vodné složky mobilní fáze 5,0 (1); 4,0 (2); 3,0 (3); 2,5 (4); 2,0 (5) v mobilní fázi acetonitril:fosforenanový pufr, $c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, v poměru 30:70 (V/V). Kolona LiChroCART® Purospher STAR100 RP-18e, $5 \mu\text{m}$, $125\times 4 \text{ mm}$, dávkováno $20 \mu\text{l}$, UV detekce při 290 nm , proudová rychlost $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Zaznamenané píky odpovídají po adí 2-AN, 1-AN, 4-AB a 2-AB, pokud není uvedeno jinak.

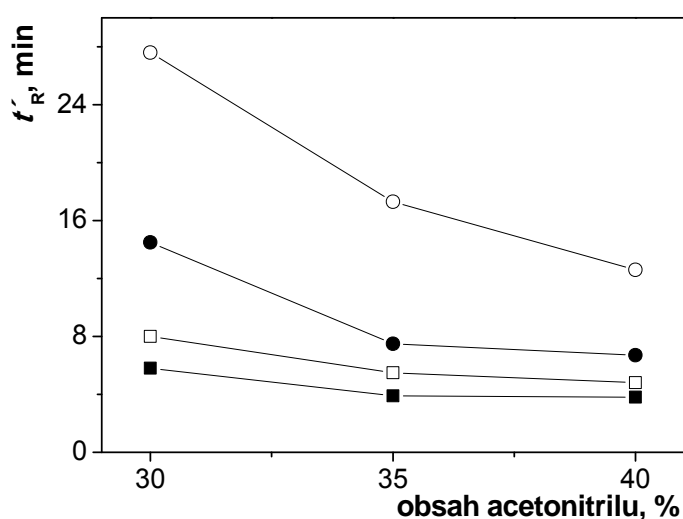


Obr. 10 Chromatogramy směsí aminonaftalen a aminobifenyl, každý o $c = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ při pH vodné složky mobilní fáze 5,0 (1); 4,0 (2); 3,0 (3); 2,5 (4); 2,0 (5) v mobilní fázi acetonitril:fosforenanový pufr, $c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, v poměru 35:65 (V/V). Zaznamenané píky odpovídají podle adí 2-AN, 1-AN, 4-AB a 2-AB, pokud není uvedeno jinak. Ostatní podmínky uvedeny u obr. 9.

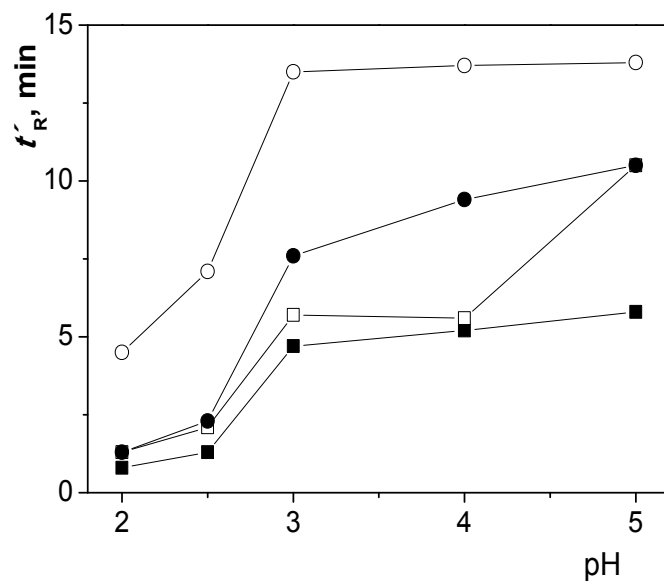


Obr. 11 Chromatogramy směsí aminonaftalen a aminobifenyl, každý o $c = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ při pH vodné složky mobilní fáze 5,0 (1); 4,0 (2); 3,0 (3); 2,5 (4); 2,0 (5) v mobilní fázi acetonitril:fosforenanový pufr, $c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, v poměru 40:60 (V/V). Ostatní podmínky uvedeny u obr. 9.

Nejrychleji a zároveň s dostatečným rozlišením všech pík probíhala separace, pokud byla k eluci použita mobilní fáze ve složení acetonitril a 0,01 mol·l⁻¹ fosforenanový pufr o pH 3,0 v poměru 40:60 (V/V). K tomu přispívá jak vysoký obsah acetonitrilu v mobilní fázi, tak skutečnost, že při pH 3,0 je u všech analytů více než 85% molekul v ionizované formě. Měření trvalo pod 15 minut, jak lze odečíst z obr. 12. Tato mobilní fáze byla vybrána pro další měření s elektrochemickým detektorem. Na obr. 12 je ukázána závislost redukovaných retenčních časů stanovovaných látek v závislosti na obsahu acetonitrilu při pH 3,0. Obr. 13 znázorňuje závislost redukovaných retenčních časů jednotlivých analytů na pH fosforenanového pufru v mobilní fázi s 40% obsahem acetonitrilu.

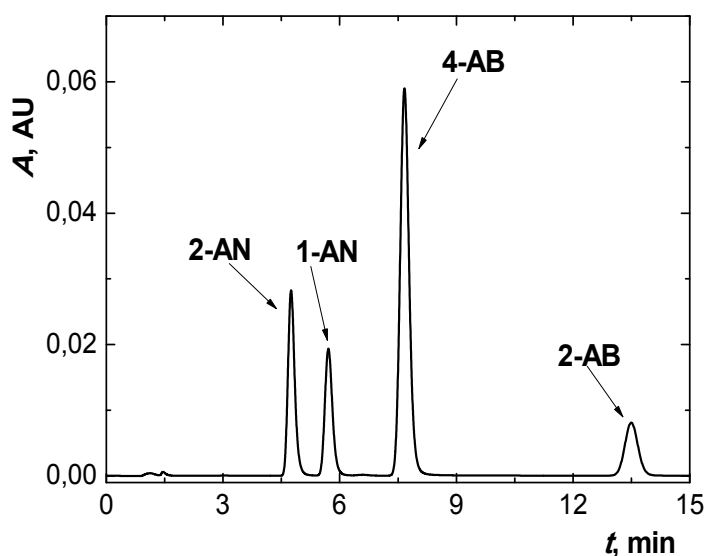


Obr. 12 Závislost redukovaných retenčních časů (t'_R) 2-AN (○), 1-AN (●), 4-AB (□) a 2-AB (■) na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Měno metodu HPLC v mobilní fázi acetonitril:fosforenanový pufr, $c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 3,0, dávkováno 20 μl , UV detekce při 290 nm, proudová rychlost 1,0 ml·min⁻¹.



Obr. 13 Závislost redukovaných reten ní as (t'_R) 2-AN (○), 1-AN (●), 4-AB (□) a 2-AB (■) na pH fosfore nanového pufru. M ěno metodou HPLC v mobilní fázi acetonitril:fosfore nanový pufr, $c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, v pom ěru 40:60 (V/V), dávkováno 20 μl , UV detekce p ě 290 nm, pr toková rychlost $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Chromatogram nejlepší dosažené separace je vid ět na obr. 14. Pro všechny sledované látky byly z chromatogramu ode teny reten ní as a ší ka píku. Pomocí t chto dvou veli in a mrtvého asu kolony byly dále spo ítány redukovaný reten ní as, reten ní pom ěr, separa ní faktor a rozlišení. Hodnoty pro jednotlivé látky shrnuje tab. 4.



Obr. 14 Chromatogram směsi aminonaftalen a aminobifenyl každý o $c = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Složení mobilní fáze – acetonitril:fosforenanový pufr, $c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{pH} = 3,0$ v poměru 40:60 (V/V). Kolona LiChroCART® Purospher STAR100 RP-18e, $5 \mu\text{m}$, $125\times 4 \text{ mm}$, dávkováno $20 \mu\text{l}$, UV detekce při $\lambda = 290 \text{ nm}$, proudová rychlost $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

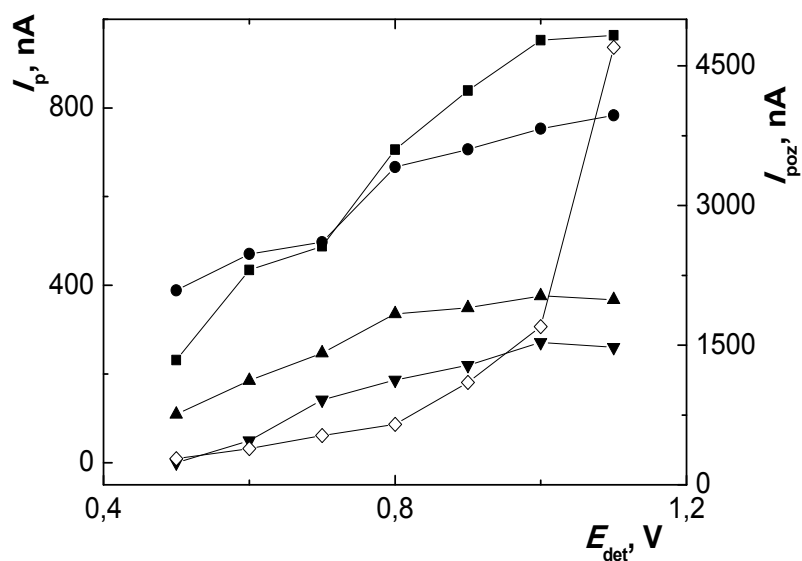
Tab. 4 Charakteristiky separace aminonaftalen a aminobifenyl pomocí HPLC: retenční čas (t_R), redukovaný retenční čas (t'_R), retenční poměr (k), separační faktor (α), šířka píku (w), rozlišení (R) pro jednotlivé analyty při separaci s mobilní fází acetonitril:fosforenanový pufr, $c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{pH} 3,0$ v poměru 40:60 (V/V). Kolona LiChroCART® Purospher STAR100 RP-18e, $5 \mu\text{m}$, $125\times 4 \text{ mm}$, dávkováno $20 \mu\text{l}$, UV detekce při 290 nm , proudová rychlost $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

analyt	2-aminonaftalen	1-aminonaftalen	4-aminobifenyl	2-aminobifenyl
t_R (min)	4,75	5,71	7,67	13,50
t'_R (min)	3,85	4,81	6,77	12,60
k	4,28	5,34	7,52	14,0
	-	1,25 ^a	1,41 ^b	1,86 ^c
w (min)	0,32	0,36	0,43	0,63
R	-	2,8 ^a	5,0 ^b	11,0 ^c

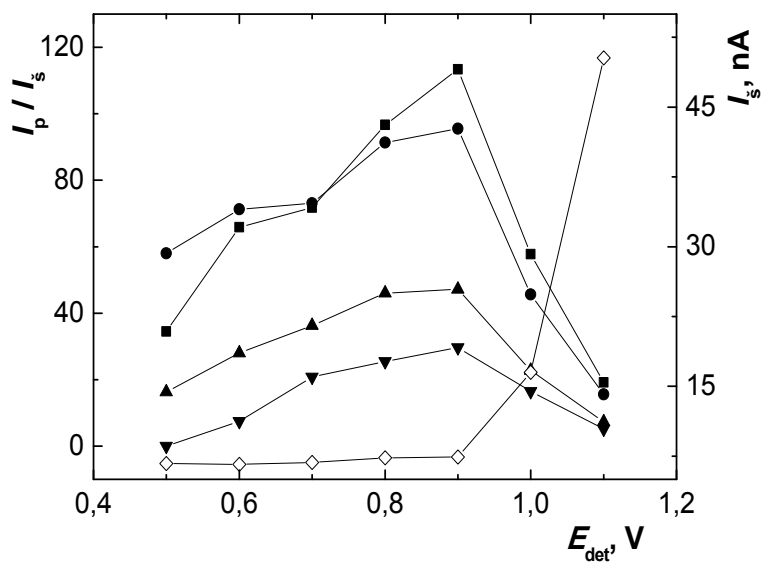
^a separační faktor, rozlišení mezi 2-AN a 1-AN, ^b separační faktor a rozlišení mezi 1-AN a 4-AB, ^c separační faktor, rozlišení mezi 4-AB a 2-AB.

3.2.2 Elektrochemická detekce na SPCE v režimu izokratické eluce

Pro elektrochemickou detekci je nezbytné, aby sloučenina obsahovala oxidovatelnou nebo redukovatelnou funkční skupinu. V případě aminonaftalen a aminobifenyl je možné oxidovat amino skupinu na aromatickém jádru. Volba vhodného detekčního potenciálu má za cíl vybrat takový detekční potenciál, který poskytne co nejvyšší odezvu sledovaných látek. Musí přitom být však zohledněna velikost proudu šumu a proudu pozadí. Velikost proudu píku 1-aminonaftalenu, 2-aminonaftalenu, 2-aminobifenylu a 4-aminobifenylu a proudu šumu byla sledována při potenciálech +0,5 až +1,1 V. Nejvyšší odezvy bylo pro 1- a 2-aminonaftalen dosaženo při potenciálu +1,0 V a pro 2- a 4-aminobifenyl při potenciálu +1,1 V. Se vkládáním vyšších potenciálů rostl proud pozadí, jeho podstatný nárůst lze zaznamenat od potenciálu +0,9 V, kde měl hodnotu 650 nA, k potenciálu +1,1 V, kdy dosáhl hodnoty 1100 nA. Naměřené hodnoty jsou zdokumentovány na obr. 15. Pro výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti je podstatným údajem poměr proudu píku a proudu šumu. Bylo zjištěno, že tento poměr nabývá nejvyšších hodnot při potenciálu +0,9 V; tato hodnota potenciálu byla následně zvolena za detekční potenciál. Dále je velmi nízký proud šumu při potenciálu +0,9 V oproti potenciálu +1,0 V. Hodnota proudu šumu vzrostla mezi těmito potenciály ze 7,4 na 16,5 nA. Závislost poměru proudu píku a proudu šumu na detekčním potenciálu a závislost velikosti proudu šumu na detekčním potenciálu jsou ukázány na obr. 16.



Obr. 15 Závislost proudu píku (I_p) 2-AN (●), 1-AN (■), 4-AB (▲) a 2-AB (◇), každý o $c = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, a proudu pozadí (I_{poz}) (○) na detekčním potenciálu (E_{det}) vloženém na pracovní elektrodu. Metodou HPLC s ampérometrickou detekcí na SPCE v mobilní fázi acetonitril:fosforenanový pufr, $c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{pH} = 3,0$ v poměru 40:60 (V/V), dávkováno $20 \mu\text{l}$, proudová rychlost $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.



Obr. 16 Závislost poměru proudu píku a proudu šumu (I_p/I_s) pro 2-AN (●), 1-AN (■), 4-AB (▲) a 2-AB (◇) každý o $c = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a samotného proudu šumu (I_s) (○) na detekčním potenciálu (E_{det}) vloženém na pracovní elektrodu. Podmínky jako na obr. 15.

3.2.3 Elektrochemická detekce na SPCE v režimu gradientové eluce

Po optimalizaci podmínek pro separaci směsi aminonaftalen a aminobifenyl izokratickou elucí bylo dalším úkolem pokusit se urychlit eluci 2-aminobifenylu, který eluuje se zpožděním přibližně 5 minut za ostatními analyty, a otestovat tak zároveň stabilitu odezvy SPCE pro ampérometrickou detekci při změně složení mobilní fáze. Pro tento účel byl využit režim gradientové eluce. Postupné zvyšování obsahu acetonitrilu v mobilní fázi vede k nárůstu její elučovací síly a ke zkrácení retenčních časů jednotlivých stanovovaných látek a tím i doby jednoho stanovení. Zároveň byl hledán takový gradientový profil, který by zachoval dostatečné rozlišení mezi prvními těmi látkami pro kvantitativní vyhodnocení.

U gradientové eluce je nutné po skončení daného měření nechat znovu ustanovit rovnováhu na koloně po určitém složení mobilní fáze. To je označováno jako reekvilibrací doba. Pro získání retenčních časů s vyhovující opakovatelností nemusí být dosaženo úplné rovnováhy. K tomu stačí i v případě separace ionizovatelných sloučenin propláchnutí kolony dvojnásobkem jejího objemu⁶¹. Experimentálně bylo zjištěno, že tento proces při rychlosti průtoku mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ trvá v našem případě 4 minuty. Doba opětovného ustavení rovnováhy na koloně musí být přitom k zásadě separace, aby byla získána celková doba jednoho stanovení.

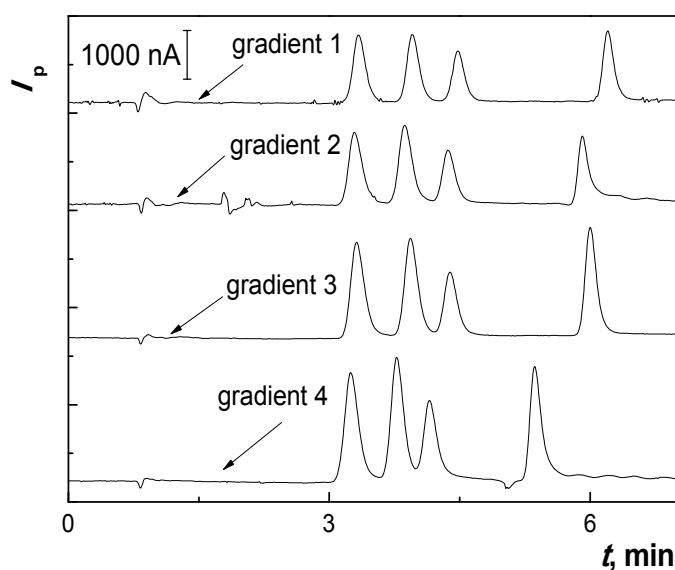
Pro gradientovou eluci směsi aminonaftalen a aminobifenyl byly navrženy čtyři gradientové programy označované dále jako gradient 1, gradient 2, gradient 3 a gradient 4. Nejvyšší obsah acetonitrilu byl omezen na 70% s přihlédnutím k dosaženým výsledkům stability sítotiskových uhlíkových elektrod, viz kapitola 3.1.1. Jednotlivé gradientové programy byly sestaveny takto:

- A) gradient 1: Po určité poměru acetonitrilu a $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosforenanového pufru (pH 3,0) 40:60 (V/V) byl lineárně měněn na koncový poměr 70:30 (V/V) do konce 7. minuty, kdy byla analýza zastavena.
- B) gradient 2: Po určité poměru acetonitrilu a $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosforenanového pufru (pH = 3,0) 40:60 (V/V) byl lineárně měněn na poměr 60:40 (V/V) po dobu 4 minut. Poté bylo složení mobilní fáze skokově změněno na poměr 70:30 (V/V) a ten byl udržován až do eluce posledního píku.
- C) gradient 3: Po určité poměru acetonitrilu a $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosforenanového pufru (pH = 3,0) 40:60 (V/V) byl lineárně měněn na poměr 60:40 (V/V) po dobu

4 minut. Následně byl nastaven lineární nárůst obsahu acetonitrilu až na 70% po dobu 2 minut a tento poměr byl udržován až do ukončení měření na konci 7. minuty.

D) gradient 4: Po dosažení poměru acetonitrilu a $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosforenanového pufru ($\text{pH} = 3,0$) 40:60 (V/V) byl lineárně měněn na poměr 70:30 (V/V) po dobu 4 minut a po jeho dosažení byla prováděna izokratická eluce při poměru 70:30 (V/V) až do detekce posledního píku.

Chromatogramy testovaných gradientových programů jsou zobrazeny na obr. 17. V tab. 5 jsou shrnuty údaje o retenčních časech jednotlivých analytů a rozlišení mezi nimi. Gradientové programy jsou seřazeny vzestupně podle retenčního času posledně eluovaného 2-aminobifenyly.



Obr. 17 Chromatogramy směsi aminonaftalen a aminobifenyl, každý o $c = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, získané různými gradientovými programy. Zaznamenané píky odpovídají po řadě 2-AN, 1-AN, 4-AB a 2-AB. Složka A mobilní fáze – acetonitril, složka B mobilní fáze – $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosforenanový pufr pH 3,0. Gradientové programy – od začátku do konce separace lineární gradient ze 40/60 A/B na 70/30 A/B (1), od začátku měření do konce 4. minuty lineární gradient ze 40/60 A/B na 60/40 A/B, v 5. minutě skoková změna na 70/30 A/B a pak v tomto poměru izokratická eluce až do konce měření (2), od začátku měření do konce 4. minuty lineární gradient ze 40/60 A/B na 60/40 A/B, od začátku 5. minuty do konce separace lineární gradient ze 40/60 A/B na 70/30 A/B (3), od začátku měření do konce 4. minuty lineární gradient ze 40/60 A/B na 70/30 A/B, od začátku 5. minuty do konce separace izokratická eluce v tomto poměru (4). Měření metodou HPLC s ampérometrickou detekcí na SPCE při $E_{\text{det}} = +0,9 \text{ V}$. Kolona LiChroCART® Purospher STAR100 RP-18e, $5 \mu\text{m}$, $125 \times 4 \text{ mm}$, dávkováno $20 \mu\text{l}$ vzorku, proudová rychlost $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Tab. 5 Porovnání gradientových programů. Retenční časy (t_R) a rozlišení (R) pro 2-AN, 1-AN, 4-AB a 2-AB, každý o $c = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Metoda HPLC s ampérometrickou detekcí na SPCE. Kolona LiChroCART® Purospher STAR100 RP-18e, 5 μm , 125×4 mm, dávkováno 20 μl vzorku, proudová rychlost 1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Podrobné informace o gradientových programech viz text.

gradientový program	t_R (min) (po adí, ve kterém analyt eluuje)				$R_{1,2}$	$R_{2,3}$	$R_{3,4}$
	2-AN (1)	1-AN (2)	4-AB (3)	2-AB (4)			
4	3,25	3,78	4,15	5,37	1,9	1,4	4,8
2	3,29	3,87	4,37	5,91	2,0	1,8	6,2
3	3,32	3,94	4,39	6,01	2,1	1,6	6,4
1	3,34	3,96	4,48	6,21	2,3	2,0	7,0

Nejkratší dobu trvala analýza při gradientu 4, při níž bylo nejrychleji dosaženo 70% obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Pro účely kvantitativního vyhodnocení není tento gradientový program vhodný, protože hodnota rozlišení mezi 1-aminonaftalenem a 4-aminobifenylem je nižší než 1,5; nízké rozlišení je zřejmé i z obr. 17. Nepatrné rozdíly retenčních časů pík 2-aminonaftalenu, 1-aminonaftalenu a 4-aminobifenyly mezi gradientem 2 a 3, i přes jejich shodný počet gradientový profil, může být vysvětlen nedosažením plné rovnováhy na koloně a výkyvy teploty okolního prostředí⁶¹. Za rozdíly v rozlišení mezi oběma gradientovými programy jsou zodpovědné rozdíly v retenčních časech a rozdíly v šířce pík. Z chromatogramu na obr. 17 je patrné, že gradientová eluce v zásadě neovlivňuje základní linii, ani pokud je provedena skoková změna ve složení mobilní fáze, jako je tomu u gradientu 2. Pro následující měření byl vybrán gradient 1 s kontinuální změnou složení mobilní fáze, který je ze všech navržených programů z experimentálního hlediska nejjednodušší. Navíc rozlišení jednotlivých pík je pro kvantitativní analýzu dostatečné a ani v důsledku výše uvedených vlivů by nemělo klesnout pod hodnotu 1,5. Po přetížení reekvilibrací doby k době separace získáme v případě gradientového programu 1 celkový čas jedné analýzy kratší než 10,5 minuty. To je o 4 minuty méně ve srovnání s izokratickou elucí.

U gradientu 1 byla následně sledována pro tyto i následná měření opakovatelnost retenčních časů analytů, výšky proudu pík a rozlišení. Relativní směrodatná odchylka výšky proudu píku činila 2,35% pro 1-aminonaftalen, 2,78% pro 2-aminobifenyl, 3,10%

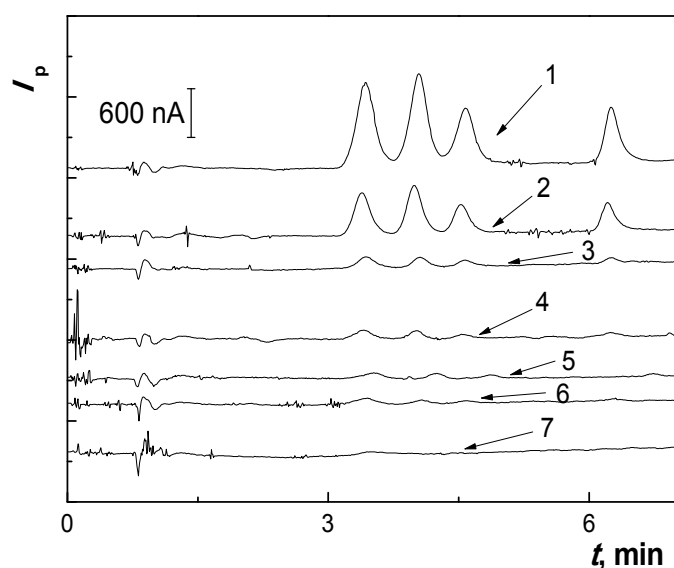
pro 2-aminonaftalen a 3,40 % pro 4-aminobifenyl. Sm rodatná odchylka reten ních as se pohybovala v rozmezí 0,022 – 0,032 minuty. Pro všechny sledované látky byla opakovatelnost výšky proudu pík uspokojivá, to samé platí i pro opakovatelnost rozlišení a reten ních as analyt . Zárove bylo potvrzeno, že p i gradientové eluci dochází k zúžení ší ky píku analyt . Obzvlášt u pozd ji eluujících látek je tato zm na výrazná a nap íklad pro nejvíce zadržovaný 2-aminobifenyl je ší ka píku p i základn 2,5 krát menší než u izokratické eluce. Hodnoty rozlišení poklesly p i gradientové eluci mezi všemi píky oproti izokratickému módu, mezi 2-aminonaftalenem a 1-aminonaftalenem z 2,9 na 2,3, mezi 1-aminonaftalenem a 4-aminobifenylem z 4,8 na 2,0 a mezi 4-aminobifenylem a 2-aminobifenylem z 11,1 na 7,0. Hodnoty výše uvedených charakteristik, reten ních as , redukovaných reten ních as , reten ních pom r a separa ních faktor pro gradient 1 jsou uvedeny v tab. 6.

Tab. 6 Charakteristiky separace aminonaftalen a aminobifenyl pomocí RP-HPLC v gradientovém režimu: reten ní as (t_R), redukovaný reten ní as (t'_R), reten ní faktor (k), separa ní faktor (α), ší ka píku (w), rozlišení (R) pro jednotlivé analyty p i separaci s mobilní fází acetonitril:fosfore nanový pufr, $c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 3,0; gradientový program 1. Kolona LiChroCART® Purospher STAR100 RP-18e, 5 μm , 125×4 mm, dávkováno 20 μl vzorku, ampérometrická detekce na SPCE p i $E_{\text{det}} = +0,9 \text{ V}$, pr toková rychlost 1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

analyt	t_R (min)	t'_R (min)	k	α	w (min)	R
2-AN	3,34	2,44	2,71		0,27	
1-AN	3,96	3,06	3,40	1,25	0,27	2,3
4-AB	4,48	3,58	3,98	1,17	0,25	2,0
2-AB	6,21	5,31	5,90	1,48	0,24	7,0

3.2.4 Kalibra ní závislosti sm si aminobifenyl a aminonaftalen

S gradientem 1 byly dále nam eny kalibra ní závislosti pro vzorek sm si aminonaftalen a aminobifenyl . Chromatogramy kalibra ních závislostí ukazuje obr. 18. M ení bylo provád no od koncentrace $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, kde byla podle p edchozích FIA m ení a podle pom ru I_p/I_s pro HPLC o ekávána mez detekce látky s nejvyšší odezvou, do koncentrace $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Odhad meze detekce zjišt ný jako nejnižší vyhodnotitelná koncentrace na chromatogramu m la pro 2-aminobifenyl hodnotu $7 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pro ostatní látky inila mén než $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tento p edpoklad vychází ze získaných hodnot odezvy látek (69,4 nA pro 2-aminonaftalen, 50,0 nA pro 1-aminonaftalen a 28,0 nA pro 4-aminobifenyl) p í koncentraci $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, které byly v tší než trojnásobek hodnoty šumu ($I_s = 7,4 \text{ nA}$) pro tuto metodu. Meze detekce a meze stanovitelnosti vypo tené z regresních rovnic m ly hodnoty $2,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $7,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro 2-aminonaftalen, $2,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $7,0 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro 1-aminonaftalen, $3,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $11,7 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro 4-aminobifenyl a $3,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $10,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro 2-aminobifenyl. Tab. 7 ukazuje hodnoty parametr kalibra ních závislostí pro jednotlivé stanovované látky.



Obr. 18 Chromatogramy kalibračních závislostí směsí 2-AN, 1-AN, 4-AB a 2-AB. Koncentrace stanovovaných látek – $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (1), $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (2), $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (3), $8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (4), $7 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (5), $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (6), $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (7). Metoda HPLC s ampérometrickou detekcí na SPCE při $E_{\text{det}} = +0,9 \text{ V}$ v mobilní fázi acetonitril:fosforenanový pufr, $c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{pH} = 3,0$; od začátku do konce separace lineární gradient ze 40/60 A/B na 70/30 A/B. Kolona LiChroCART® Purospher STAR100 RP-18e, $5 \mu\text{m}$, $125 \times 4 \text{ mm}$, dávkováno $20 \mu\text{l}$ roztoku směsi, proudová rychlost $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Tab. 7 Souhrn parametrů kalibračních přímek pro 1-AN, 2-AN, 2-AB a 4-AB měřených metodou HPLC s ampérometrickou detekcí na SPCE při detekčním potenciálu (E_{det}) $+0,9 \text{ V}$ s využitím gradientového programu 1, dávkováno $20 \mu\text{l}$ vzorku, proudová rychlost $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

analyt	koncentrace ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	smrnice ($\text{mA}\cdot\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}$)	úsek (nA)	korelační koeficient	L_D ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
2-AN	1 – 100	$9,9 \pm 0,2$	$22,6 \pm 6,9$	0,999	2,2
1-AN	1 – 100	$10,5 \pm 0,3$	$10,0 \pm 14,2$	0,997	2,1
4-AB	1 – 100	$6,3 \pm 0,1$	$1,7 \pm 5,3$	0,998	3,5
2-AB	1 – 100	$6,8 \pm 0,1$	$-11,0 \pm 6,2$	0,999	3,3

4 Závěr

V této práci byly studovány možnosti použití sítotiskových uhlíkových elektrod jako pracovní elektrody ampérometrického detektoru v pr tokových metodách. Metodou FIA byla ov ěna jejich schopnost poskytnout odezvu jak ve vodné mobilní fázi, tak v mobilní fázi s podílem organického modifikátoru. Stabilita elektrod a dostate ná opakovatelnost odezvy byly prokázány až do 70% obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Vysoká opakovatelnost m ění odezvy na jedné elektrod ě ukazuje, že nedochází k pasivaci elektrodového povrchu. Naproti tomu odlišná opakovatelnost m ění odezvy mezi r ťnými elektrodami vypovídá o rozdílné kvalit ě jednotlivých kus ě elektrod. Nejvhodn ějším detek ěním potenciálem pro stanovení 4-aminobifenyly se s p ěhlédnutím k velikosti proudu šumu ukázala hodnota +0,9 V. Bylo zjišt ěno, že po deseti minutách od vložení detek ěního potenciálu +0,9 V na pracovní elektrodu je možno provád ět ampérometrickou detekci analyt ě, aniž by výsledná odezva byla ovlivn ěna neustále klesajícím proudem pozadí. Mez detekce pro 4-aminobifenyly dosažená metodou FIA ve vodném roztoku 0,01 mol·l⁻¹ fosfore nanového pufru pH 3,0 jako mobilní fáze byla 0,85 μmol·l⁻¹ a ve sm ěsi acetonitrilu a 0,01 mol·l⁻¹ fosfore nanového pufru pH 3,0 v pom ěru 40:60 (V/V) jako mobilní fáze m ěla hodnotu 1,00 μmol·l⁻¹. Za nejlepší podmínky pro separaci sm ěsi 2-aminobifenyly, 4-aminobifenyly, 2-aminonaftalenu a 1-aminonaftalenu pomocí RP-HPLC v režimu izokratické eluce byly na základ ě experiment ě vybrány mobilní fáze z acetonitrilu a 0,01 mol·l⁻¹ fosfore nanového pufru pH 3,0 v pom ěru 40:60 (V/V) a detek ění potenciál +0,9 V. V tomto p ěípad ě trvalo jedno m ění p ěibližn ě 14 minut. P ě íp ěchodu k režimu gradientové eluce byly ponechány stejné po áte ění podmínky jako u izokratické eluce. Ze zkoušených gradientových program ě se nejvíce osv ědil gradient 1, kdy byl výchozí pom ěr acetonitrilu a fosfore nanového pufru 40:60 (V/V) m ěn ěn lineárn ě na pom ěr 70:30 (V/V) od za átku až do zastavení analýzy na konci 7. minuty. S tímto gradientovým profilem trvalo celé m ění, tzn. separace sm ěsi a reekvilibra ění doba, okolo 10,5 minuty. Meze detekce zjišt ěné metodou RP-HPLC s režimem gradientové eluce gradientu 1 m ěly hodnotu 3,5 μmol·l⁻¹ pro 4-aminobifenyly, 3,3 μmol·l⁻¹ pro 2-aminobifenyly, 2,2 μmol·l⁻¹ pro 2-aminonaftalen a 2,1 μmol·l⁻¹ pro 1-aminonaftalen

V porovnání se všemi studii uvedenými v tab. 1 (kapitola 1.4) zabývajícími se stanovením aminonaftalen a aminobifenyl metodou HPLC jsou námi naměřené meze detekce (řádově v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nejméně o jeden řád vyšší. Jednou z příčin může být nezařazení zakoncentrování vzorku před vlastním stanovením například pomocí SPE, která se běžně používá, protože analýza z konkrétní matrice nebyla v této základní studii provedena. Při srovnání prací, ve kterých byly použity pro stanovení vybraných organických analytů nemodifikované SPCE (tab. 2, kapitola 1.6) jak ve vsádkovém, tak v proudovém uspořádání, najdeme výsledky v každém případě srovnatelné. Pokud vezmeme v úvahu povolené limity výskytu těchto látek v barvivech nebo krvi udané FDA, případně komisí MAK, viz kapitola 1.2, nejsou v této práci popsány metody dostatečné pro jejich spolehlivé stanovení, nicméně opatřit se dá předpokládat, že vhodně zvolená extrakční metoda nutná k analýze těchto matric by souasně vedla k prekoncentraci analytu a snížení detekčních limitů pro konkrétní matrici.

Závěrem lze konstatovat, že nemodifikované SPCE použité pro ampérometrickou detekci ve FIA a HPLC jsou vhodnými senzory pro stanovení aminobifenyl a aminonaftalen. Jistou nevýhodou je rozlišná kvalita elektrod od konkrétního výrobce, která je předmětem odhadnutelná. Možnosti dalšího snížení mezí detekce spoívají v zakoncentrování analytu pomocí vhodné extrakční techniky při analýze konkrétní matrice a v modifikaci povrchu elektrody.

5 Literatura

1. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some aromatic amines, organic dyes, and related exposures (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; v. 99), International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2010.
2. Bingham E., Cohn B., Powell Ch. H. (eds.): *Patty's Toxicology*, John Wiley & Sons, New York, 2001.
3. Hammond S. K., Sorensen G., Youngstrom R., Ockene J. K.: Occupational Exposure to Environmental Tobacco-Smoke. *Jama-Journal of the American Medical Association* 274 (1995) 956-960.
4. Hoffmann D., Djordjevic M. V., Hoffmann I.: The Changing Cigarette. *Preventive Medicine* 26 (1997) 427-434.
5. Stabbert R., Schafer K. H., Biefel C., Rustemeier K.: Analysis of Aromatic Amines in Cigarette Smoke. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17 (2003) 2125-2132.
6. 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 (1999) 125-134.
7. Bafana A., Devi S. S., Krishnamurthi K., Chakrabarti T.: Kinetics of Decolourisation and Biotransformation of Direct Black 38 by *C-hominis* and *P-stutzeri*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74 (2007) 1145-1152.
8. Masuda Y., Mori K., Kuratsun.M: Studies on Bladder Carcinogens in Human Environment .I. Naphthylamines Produced by Pyrolysis of Amino Acids. *International Journal of Cancer* 2 (1967) 489-493.
9. Hansen A. M., Omland O., Poulsen O. M., Sherson D., Sigsgaard T., Christensen J. M., Overgaard E.: Correlation between Work Process-Related Exposure to Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons and Urinary Levels of Alpha-Naphthol, Beta-Naphthylamine and 1-Hydroxypyrene in Iron Foundry Workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 65 (1994) 385-394.

10. Richfieldfratz N., Bailey J. E., Bailey C. J.: Determination of Unsulfonated Aromatic-Amines in FD-and-C Yellow No-6 by the Diazotization and Coupling Procedure Followed by Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography. *Journal of Chromatography* 331 (1985) 109-123.
11. Akyuz M., Ata S.: Determination of Aromatic Amines in Hair Dye and Henna Samples by Ion-Pair Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47 (2008) 68-80.
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 (2003) 1162-1173.
13. Cassidy L. D., Youk A. O., Marsh G. M.: The Drake Health Registry Study: Cause-Specific Mortality Experience of Workers Potentially Exposed to Beta-Naphthylamine. *American Journal of Industrial Medicine* 44 (2003) 282-290.
14. Veys C. A.: Bladder Tumours in Rubber Workers: A Factory Study 1946-1995. *Occupational Medicine-Oxford* 54 (2004) 322-329.
15. Felknor S. A., Delclos G. L., Lerner S. P., Burau K. D., Wood S. M., Lusk C. M., Jalayer A. D.: Bladder Cancer Screening Program for a Petrochemical Cohort with Potential Exposure to Beta-Naphthylamine. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 45 (2003) 289-294.
16. Ohnishi S., Murata M., Kawanishi S.: Oxidative DNA Damage Induced by a Metabolite of 2-Naphthylamine, a Smoking-Related Bladder Carcinogen. *Japanese Journal of Cancer Research* 93 (2002) 736-743.
17. Makena P., Chung K. T.: Role of 4-Aminobiphenyl, Benzidine and Benzidine Analogues in Oxidative Genotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47 (2006) 427-427.
18. 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-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 778 (2002) 179-192.
19. Loos R., Hanke G., Eisenreich S. J.: Multi-Component Analysis of Polar Water Pollutants Using Sequential Solid-Phase Extraction Followed by LC-ESI-MS. *Journal of Environmental Monitoring* 5 (2003) 384-394.

20. Shelke M., Sanghi S. K., Asthana A., Lamba S., Sharma M.: Fast Separation and Sensitive Detection of Carcinogenic Aromatic Amines by Reversed-Phase μ -Liquid Chromatography Coupled with Electrochemical Detection. *Journal of Chromatography A* 1089 (2005) 52-58.
21. Jezewska A., Buszewski B.: Isolation and Determination of 4-Biphenylamine for Air Sample by SPE-HPLC Coupling. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 34 (2011) 397-407.
22. Akyuz M.: Simultaneous Determination of Aliphatic and Aromatic Amines in Indoor and Outdoor Air Samples by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Talanta* 71 (2007) 486-492.
23. 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 (2006) 588-591.
24. Maixnerova L., Berek J., Peckova K.: Thin-Layer and Wall-Jet Arrangement of Amperometric Detector with Boron-Doped Diamond Electrode: Comparison of Amperometric Determination of Aminobiphenyls in HPLC-ED. *Electroanalysis* 24 (2012) 649-658.
25. Peckova K., Jandova K., Maixnerova L., Swain G. M., Berek J.: Amperometric Determination of Aminobiphenyls Using HPLC-ED with Boron-Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis* 21 (2009) 316-324.
26. Lu C. S., Huang S. D.: Trace Determination of Aromatic-Amines or Phenolic-Compounds in Dyestuffs by High-Performance Liquid-Chromatography with Online Preconcentration. *Journal of Chromatography A* 696 (1995) 201-208.
27. Zima J., Dejmekova H., Berek J.: HPLC Determination of Naphthalene Amino Derivatives Using Electrochemical Detection at Carbon Paste Electrodes. *Electroanalysis* 19 (2007) 185-190.
28. Pecková K., Mocko V., Opekar F., Swain G.M., Zima J., Berek J.: Miniaturizované Ampérometrické Detektory pro HPLC a Kapilární Zónovou Elektroforézu. *Chemické Listy* 100 (2006) 124-132.
29. Narvekar M. S., Srivastava A. K.: Ion-Pair Reversed-Phase HPLC Determination of Aromatic Amine Isomers. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 26 (2003) 85-98.

30. Schmidt T. C., Less M., Haas R., von Low E., 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 (1998) 161-172.
31. Narvekar M. S., Srivastava A. K.: Separation of Banned Amine Isomers in Relation to German Ban on Azo Dyes by Derivatization on GC-MS. *Chromatographia* 55 (2002) 729-735.
32. Lin Z. A., Zhang J. H., Cui H. M., Zhang L., Chen G. N.: Determination of Aromatic Amines in Environmental Water Sample by Hollow Fiber-Liquid Phase Microextraction and Microemulsion Electrokinetic Chromatography. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 4507-4510.
33. Del Carlo M., Di Marcello M., Perugini M., Ponzielli V., Sergi M., Mascini M., Compagnone D.: Electrochemical DNA Biosensor for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Detection. *Microchimica Acta* 163 (2008) 163-169.
34. Kadara R. O., Haggett B. G. D., Birch B. J.: Disposable Sensor for Measurement of Vitamin B(2) in Nutritional Premix, Cereal, and Milk Powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 4921-4924.
35. Bergamini M. F., Boldrin Zanoni M. V.: Anodic Stripping Voltammetric Determination of Aurothiomalate in Urine Using a Screen-Printed Carbon Electrode. *Electroanalysis* 18 (2006) 1457-1462.
36. Bergamini M. F., Santos A. L., Stradiotto N. R., Zanoni M. V. B.: Flow Injection Amperometric Determination of Procaine in Pharmaceutical Formulation Using a Screen-Printed Carbon Electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 (2007) 315-319.
37. Chiu M. H., Yang H. H., Liu C. H., Zen J. M.: Determination of Lincomycin in Urine and Some Foodstuffs by Flow Injection Analysis Coupled with Liquid Chromatography and Electrochemical Detection with a Preanodized Screen-Printed Carbon Electrode. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 877 (2009) 991-994.
38. Zen J. M., Yang H. H., Chiu M. H., Chen Y. J., Shih Y.: Determination of Thioglycolic Acid in Hair-Waving Products by Disposable Electrochemical Sensor

- Coupled with High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of AOAC International* 92 (2009) 574-579.
39. Lucarelli F., Authier L., Bagni G., Marrazza G., Baussant T., Aas E., Mascini M.: DNA Biosensor Investigations in Fish Bile for Use as a Biomonitoring Tool. *Analytical Letters* 36 (2003) 1887-1901.
40. Zima J., Svancara I., Barek J., Vytras K.: Recent Advances in Electroanalysis of Organic Compounds at Carbon Paste Electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 39 (2009) 204-227.
41. Yosypchuk B., Barek J.: Analytical Applications of Solid and Paste Amalgam Electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 39 (2009) 189-203.
42. 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 (2009) 148-172.
43. Navratil T., Barek J.: Analytical Applications of Composite Solid Electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 39 (2009) 131-147.
44. Vasjari M., Merkoci A., Hart J. P., Alegret S.: Amino Acid Determination Using Screen-Printed Electrochemical Sensors. *Microchimica Acta* 150 (2005) 233-238.
45. Honeychurch K. C., Hart J. P., Pritchard P. R. J., Hawkins S. J., Ratcliffe N. M.: Development of an Electrochemical Assay for 2,6-Dinitrotoluene, Based on a Screen-Printed Carbon Electrode, and its Potential Application in Bioanalysis, Occupational and Public Health. *Biosensors & Bioelectronics* 19 (2003) 305-312.
46. Wang S. M., Su W. Y., Cheng S. H.: A Simultaneous and Sensitive Determination of Hydroquinone and Catechol at Anodically Pretreated Screen-Printed Carbon Electrodes. *International Journal of Electrochemical Science* 5 (2010) 1649-1664.
47. Su W. Y., Wang S. M., Cheng S. H.: Electrochemically Pretreated Screen-Printed Carbon Electrodes for the Simultaneous Determination of Aminophenol Isomers. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 651 (2011) 166-172.
48. Chen J. C., Kumar A. S., Chung H. H., Chien S. H., Kuo M. C., Zen J. M.: An Enzymeless Electrochemical Sensor for the Selective Determination of Creatinine in Human Urine. *Sensors and Actuators B-Chemical* 115 (2006) 473-480.

49. Renedo O. D., Alonso-Lomillo M. A., Martinez M. J. A.: Recent Developments in the Field of Screen-Printed Electrodes and their Related Applications. *Talanta* 73 (2007) 202-219.
50. Tudorache M., Bala C.: Biosensors Based on Screen-Printing Technology, and Their Applications in Environmental and Food Analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007) 565-578.
51. Piano M., Serban S., Pittson R., Drago G. A., Hart J. P.: Amperometric Lactate Biosensor For Flow Injection Analysis Based on a Screen-Printed Carbon Electrode Containing Meldola's Blue-Reinecke Salt, Coated with Lactate Dehydrogenase and NAD(+). *Talanta* 82 (2010) 34-37.
52. Shih Y., Zen J. M., Kumar A. S., Chen P. Y.: Flow Injection Analysis of Zinc Pyrithione in Hair Care Products on a Cobalt Phthalocyanine Modified Screen-Printed Carbon Electrode. *Talanta* 62 (2004) 912-917.
53. Pemberton R. M., Amine A., Hart J. P.: Voltammetric Behavior of Chlorophyll a at a Screen-Printed Carbon Electrode and its Potential Role as a Biomarker for Monitoring Fecal Contamination. *Analytical Letters* 37 (2004) 1625-1643.
54. Ferancova A., Korgova 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 (2002) 1668-1673.
55. Gornall D. D., Collyer S. D., Higson S. P. J.: Investigations into the Use of Screen-Printed Carbon Electrodes as Templates for Electrochemical Sensors and Sonochemically Fabricated Microelectrode Arrays. *Sensors and Actuators B-Chemical* 141 (2009) 581-591.
56. Cva ka J.: Diserta ní práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha, 2001.
57. Maixnerová L.: Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha, 2010.
58. Barek J., Jandova K., Peckova K., Zima J.: Voltammetric Determination of Aminobiphenyls at a Boron-Doped Nanocrystalline Diamond Film Electrode. *Talanta* 74 (2007) 421-426.
59. Mitadera M., Spataru N., Fujishima A.: Electrochemical Oxidation of Aniline at Boron-Doped Diamond Electrodes. *Journal of Applied Electrochemistry* 34 (2004) 249-254.
60. Zavázalová J.: Bakalá ská práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha, 2009.

61. Schellinger A.P., Stoll D.R., Carr P.W.: High-Speed Gradient Reversed Phase Liquid Chromatography of Bases in Buffered Eluents – Part I. Retention Repeatability and Column Re-equilibration. *Journal of Chromatography A* 1192 (2008) 41-53.