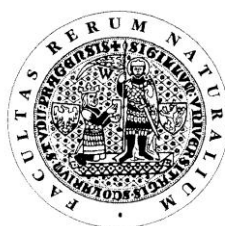


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Petra Anýžová

STANOVENÍ AROMATICKÝCH AMINŮ V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU

Determination of aromatic amines in biological material

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jaroslav Mráz, CSc.

Praha 2012

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení:

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

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 23. 4. 2012

Podpis

ABSTRAKT

Na souboru 18 aromatických aminů různých strukturních typů byly testovány kritické body stanovení těchto látek v moči s využitím plynově chromatografické koncovky. Látky byly opakovaně analyzovány jednak jednoduchou referenční metodou, jednak kompletním standardním postupem využívaným pro posouzení expozice aromatickým aminům při biologickém monitorování, který zahrnoval simulovanou hydrolýzu, alkalizaci, extrakci toluenem, chemickou derivatizaci, praní vzorku a stanovení plamenovým ionizačním detektorem. Byly určeny látky, které vykazují velké ztráty v průběhu celé procedury a pravděpodobné kritické body. Zjištění důvodů těchto ztrát a případná optimalizace této metody budou předmětem další práce.

Klíčová slova: aromatické aminy

biologické monitorování

plynová chromatografie

ABSTRACT

A set of 18 aromatic amines of various structure types was used to assess possible critical points of their determination in urine. The selected aromatic amines were analyzed by a simple reference method as well as by a complete standard procedure used in biological monitoring that consisted of simulated hydrolysis, alkalization, extraction with toluene, chemical derivatization, sample washing and determination by gas chromatography with flame ionization detector. Compounds with significant losses and possible critical points of the procedure were identified. The reason of the losses and method optimization will be studied in forthcoming investigations.

Keywords: aromatic amines

biological monitoring

gas chromatography

Poděkování

Chtěla bych poděkovat panu RNDr. Jaroslavu Mrázovi, CSc. a paní Ing. Ivetě Hanzlíkové za poskytnutí zázemí, materiálu a pomoc při vypracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc. za konzultaci mé bakalářské práce.

Tato práce byla vypracována v oddělení pro hodnocení expozice chemickým látkám na pracovišti Centra hygieny práce a pracovního lékařství Státního zdravotního ústavu v Praze.

OBSAH

1. Úvod	7
2. Teoretická část	8
2.1. Aromatické aminy	8
2.1.1. Výskyt aromatických aminů v životním a pracovním prostředí	8
2.1.2. Charakteristika a vlastnosti aromatických aminů.....	8
2.1.3. Metabolismus a mechanismus toxicity aromatických aminů	9
2.1.4 Aromatické aminy ve vlastní experimentální práci.....	10
2.2. Biologické monitorování.....	15
2.3. Základní metodiky stanovení aromatických aminů.....	16
2.3.1. Obecný postup stanovení	16
2.3.2. Metodické detaily postupu stanovení.....	17
3. Experimentální část	18
3.1. Přístroje a chemikálie	18
3.2. GC analýza	20
3.3. Příprava roztoků	20
3.3.1. Příprava pomocných roztoků.....	20
3.3.2. Příprava zásobních a směsných roztoků aromatických aminů	20
3.4. Postup derivatizace jednotlivých aminů a příprava směsi aromatických aminů	21
3.4.1. Derivatizace roztoků jednotlivých aromatických aminů	21
3.4.2. Příprava směsného roztoku aromatických aminů.....	21
3.4.3. Příprava roztoku 4-AB-HFB jako vnitřního standardu	22
3.5. Provedení modelových experimentů	22
3.5.1. Provedení modelového experimentu pro směs aromatických aminů přítomných v matrici	22
3.5.2. Provedení modelového experimentu pro směs aromatických aminů bez matrice.....	23
4. Výsledky a diskuze	24
5. Závěr	34
6. Seznam použité literatury	35

1. Úvod

Podnětem k předložené studii bylo pozorování pracovníků Státního zdravotního ústavu v Praze učiněné při zavádění metodiky pro stanovení 2- a 3-aminobenzanthronu (2- a 3-ABA) v moči, které jsou metabolity toxikologicky významných látek 2- a 3-nitrobenzanthronu. Při hledání vhodných vnitřních standardů pro metodu s plynově chromatografickou koncovkou byly testovány různé další aromatické aminy, které byly přidávány ke vzorkům analyzované moče na samém počátku jejich zpracování. Ukázalo se, že některé z testovaných látek v průběhu analytického postupu opakovaně vykazují značné ztráty a velmi nízkou reprodukovatelnost výsledků stanovení. Toto překvapivé chování ukázalo na potřebu podrobněji prostudovat kritické body dané metodiky. Cílem předložené bakalářské práce bylo navrhnout systematický postup pro ověření předchozích výsledků (tj. ztráty některých aminů v průběhu zpracování vzorku) na rozšířeném souboru testovacích látek.

2. Teoretická část

2.1. Aromatické aminy

2.1.1. Výskyt aromatických aminů v životním a pracovním prostředí

Člověk je během svého života vystaven mnoha škodlivým látkám. Jejich zdrojem je potrava, znečištěná voda a ovzduší, nebo nejrůznější spotřebitelské produkty [1]. Mezi takové látky patří i aromatické aminy. Tyto látky se mohou vyskytovat v chemických surovinách nebo nečistotách na pracovištích, jako heterocyklické aminy v potravinách, v materiálech, přicházejících do styku s potravinami, apod. Aromatické aminy, aromatické nitrosloučeniny a jejich deriváty jsou také důležité a často používané meziprodukty v chemickém průmyslu. Slouží k přípravě barviv, léčiv, pesticidů a plastů. Dinitrotoluen a 2,4,6-trinitrotoluen jsou používány jako výbušniny. Normálně se tyto látky ale v konečných výrobcích chemického průmyslu neobjevují. Je proto udivující, že některé tyto látky nebo jejich metabolity byly nalezeny v moči nebo krvi lidí, u nichž zdroj expozice těmto látkám není znám. Anilin a *p*-toluidin byly rovněž zjištěny v mateřském mléce. Nedávno byly anilin, toluidiny a další aromatické aminy nalezeny ve vnitřním i venkovním vzduchu [2]. Některé z těchto látek patří mezi tzv. podezřelé karcinogeny, některé mezi potvrzené karcinogeny a některé mají jiné toxické účinky na lidský organismus.

2.1.2. Charakteristika a vlastnosti aromatických aminů

Aromatické aminy jsou skupinou monocyklických a polycyklických organických sloučenin, které mají na aromatickém kruhu alespoň jeden atom vodíku nahrazen $-NR_2$ skupinou (R je buď alkyl, aryl, nebo vodík) [3].

Nižší aromatické aminy (jednokruhové) jsou látky kapalné, vyšší jsou již látky pevné.

Aromatické aminy velmi snadno podléhají elektrofilní substituci [4]. K hlavním reakcím těchto látek patří zejména alkylace a acylace, nitrace, sulfonace, a dále například halogenace, chloromethylace nebo formylace [5]. Aromatické aminy se též využívají v kopulační reakci s aryl diazonovými solemi pro přípravu azosloučenin, z nichž je řada používána jako azobarviva. Ta jsou využívána například jako průmyslová barviva nebo jako acidobazické indikátory (např. methyloranž, methylčerveň) [6].

Aromatické aminy mají vysoký bod varu (např. anilin 184 °C) a jsou pouze omezeně rozpustné ve vodě. Rozpustnost aromatických aminů ve vodě je možné zvyšovat zavedením hydrofilních substituentů do molekuly - hydroxylových, sulfonových nebo kvarterních aminoskupin. Toto zavedení hydrofilních skupin vede ke snížení absorpce látek kůží, ke zvýšení jejich vylučovací rychlosti a tím ke snížení jejich toxicity. Například sulfonované aromatické aminy na rozdíl od těch nesubstituovaných nevykazují žádné známky methemoglobinového efektu [3,4]. V porovnání s alkylaminami jsou aromatické aminy o zhruba 6 řádů slabšími bázemi. Konjugace aminoskupin arylaminů s dalšími aromatickými jádry vede k ještě většímu snížení bazicity těchto látek. Elektrodonorové substituenty zvyšují bazicitu těchto látek, zatímco elektroakceptorové substituenty ji snižují [4].

Poloha a typ substituentů na aromatickém kruhu je velmi důležitá i pro biologické účinky těchto látek. U bicyklických aromatických aminů závisí toxicita pro člověka na tom, zda jsou aromatické kruhy spojeny přímo nebo přemostěním mezi atomy dusíku a uhlíku. Tak například 4-aminobifenyl, jehož dva aromatické kruhy jsou spojeny přímo, je jedním z nejsilnějších karcinogenů, zatímco 4-aminodifenylamin karcinogenní není [7].

Právě karcinogenita je největším nebezpečím těchto látek. Hlavním cílovým místem chronických toxických účinků aromatických aminů je močový měchýř [7]. Inhalace nebo dermální absorpce aromatických aminů může způsobovat klinicky rozpoznatelnou cyanózu v důsledku vytváření methemoglobinu. Cyanóza se projevuje šedavě namodralým, až modrofialovým zabarvením kůže a sliznic, obvykle na konečcích prstů, nehtech, rtech a uších. Je způsobena zvýšenou koncentrací redukovaného hemoglobinu neboli methemoglobinu v krvi. Pokud je jeho koncentrace v červených krvinkách zvýšená, může dojít až k tkáňové hypoxii. Z těla jsou aromatické aminy vylučovány po přeměně různými metabolickými drahami (2.1.3.) [3].

Nemoci močových cest, způsobené expozicí aromatickým aminům, jsou oficiálně uznány jako nemoci z povolání a podle toho jsou poté odškodňovány [7].

2.1.3. Metabolismus a mechanismus toxicity aromatických aminů

Malé dávky lipofilních aromatických aminů obecně podléhají přímé acetylaci, která umožňuje, aby byly vylučovány močí. Acetylace je katalyzována enzymem N-acetyltransferázou, která je také zodpovědná za acetylaci alifatických aminů, aminokyselin, nukleových kyselin a jiných látek v lidském organismu.

Hlavní metabolická cesta aromatických aminů je přes N-acetylarylamín. Jejich oxidací se tvoří N-acetyl-p-hydroxyarylamín a kyslíkaté konjugáty *ortho* a *para*-hydroxyarylamínů jsou poté zjistitelné v moči. Metabolity, které jsou rozhodující pro spojení s methemoglobinem (N-acetylhydroxyarylamíny a aromatické nitroso sloučeniny) jsou vylučovány pouze v malých množstvích, zejména proto, že nejsou acetylovány. N-hydroxyarylamín, který se vytváří v játrech během aktivace metabolismu lipofilních aromatických aminů je také považován za bezprostřední karcinogen a napadá močový měchýř. Všechny vytvořené N-hydroxyarylamíny jsou za přítomnosti uridin-(UDP)-glukuronyltransferázy konjugovány na N-glukuronidy v endoplazmatickém retikulu. N-glukuronidy jsou distribuovány do různých částí těla, kde mohou být štěpeny na původní N-hydroxyarylamíny pomocí enzymů β -glukuronidáz. V erythrocytech aromatické sloučeniny tvoří kovalentní vazbu s thiolovými skupinami hemoglobinu a glutathionu. Vzniknou tak arylsulfonamidové konjugáty. V kyselém prostředí (pH 5 - 6) močového měchýře se mohou nestabilní glukuronidy štěpit a vytvářet elektrofilní arylnitroniové ionty nebo jiné elektrofilní deriváty. Tyto deriváty buď tvoří kovalentní vazby přímo s DNA, RNA nebo s proteiny z epitelu močového měchýře, nebo mohou být neškodně vyloučeny.

Mezi faktory ovlivňující vytváření methemoglobinu patří substituce na aromatickém kruhu. Tyto substituenty mohou jeho vytváření snížit, nebo i úplně zrušit. To platí zejména pro substituci SO_3H , alkylové a hydroxylové skupiny. Oproti tomu např. halogenová substituce

na aromatickém kruhu (jako v případě chloranilinu) může vést k výraznějšímu vytváření methemoglobinu. Další aspekty a vztahy účinků jsou rozmanité a jejich principy zatím nebyly zcela objasněny. Například poloha atomu chloru má velmi významný vliv na vznik methemoglobinu. Výrazně silnější účinek má *m*-chloranilin oproti *o*-a *p*-chloranilinu [3].

2.1.4 Aromatické aminy ve vlastní experimentální práci

Pro experiment byl vybrán soubor aromatických aminů - od jednokruhových až po čtyřkrahové. Původně bylo vybráno 21 zástupců jednotlivých skupin těchto látek. Na základě výsledků jejich analýz byly 2 aminy zcela vyloučeny, a to 2-aminobenzathron a 2-aminobifenyl. První látka byla vyloučena kvůli nedostatečnému množství standardu a u druhé bylo zjištěno, že má totožný retenční čas, jako rovněž zařazený 1-naftylamin. Dále byl z analyzovaného souboru látek vyloučen 4-aminobifenyl, který byl díky výhodnému retenčnímu času (4. - Obr.2) použit jako vnitřní standard (3.4.3.). Výsledný soubor analyzovaných látek je uveden v tabulce č. 1.

Tab.1- Soubor vybraných aromatických aminů pro vlastní experimentální práci

látka	zkratka	CAS	Mw (Ar-NH ₂)	počet kruhů	počet NH ₂ skupin
anilin	A	62-53-3	91,13	1	1
o-toluidin	o-T	95-53-4	107,15	1	1
m-toluidin	m-T	108-44-1	107,15	1	1
p-toluidin	p-T	106-49-0	107,15	1	1
2,4-diaminotoluen	2,4-TDA	95-80-7	122,17	1	2
2,6-diaminotoluen	2,6-TDA	823-40-5	122,17	1	2
3,4-diaminotoluen	3,4-TDA	496-72-0	122,17	1	2
1-naftylamin	1-NA	134-32-7	143,19	2	1
2-naftylamin	2-NA	91-59-8	143,19	2	1
3,3'-methylendianilin	3,3'-MDA	19471-12-6	198,26	2	2
4,4'-methylendianilin	4,4'-MDA	101-77-9	198,26	2	2
4-aminobifenyl	4-AB	92-67-1	169,23	2	1
2-aminoanthracen	2-AA	613-13-8	193,25	3	1
2-aminofluoren	2-AF	153-78-6	181,23	3	1
2-amino-9-fluorenon	2-A-9-F	3096-57-9	199,22	3	1
3-aminofluoranthren	3-AFA	2693-46-1	217,26	4	1
1-aminopyren	1-AP	1606-67-3	217,27	4	1
6-aminochrysen	6-ACh	2642-98-0	243,30	4	1
3-aminobenzanthron	3-ABA	-	245,27	4	1

Jednokruhové aromatické aminy:

Anilin: Olejovitá kapalina, bezbarvá pokud je čerstvě destilovaná [8]. Anilin je z velké části metabolizován na konjugáty *p*-aminofenolu, konkrétně *p*-aminofenylglukoronid a *p*-acetaminofenylglukuronid [9]. Anilin není karcinogenní, ale způsobuje methemoglobinémii [10].

Isomery toluidinu: *o*-Toluidin, nažloutlá karcinogenní látka se barví červenohnědě při kontaktu se vzduchem [8]. Používá se při výrobě barviv, chemických látek, pesticidů, tužidel a pryskyřicových epoxidových systémů. Právě v gumárenském průmyslu byl zjištěn zvýšený výskyt rakoviny močového měchýře [11]. *m*-Toluidin je bezbarvá až nažloutlá kapalina [12]. V moči exponovaných osob byly zjištěny spolu s malým množstvím mateřské sloučeniny metabolity 2-amino-4-methylfenol a 4-amino-2-methylfenol [13]. Není prokázaným

karcinogenem, ale může dráždit oči a kůži [14]. *p*-Toluidin je bílá pevná látka [12]. Je prokázaným karcinogenem pro zvířata, pro člověka karcinogenní není [14].

Isomery toluendiaminu: Bezbarvé až hnědé, jehlovité krystalky nebo prášek 2,4-toluendiaminu jsou prokázaným karcinogenem pro zvířata a předpokládaným karcinogenem pro člověka [10,15]. Senzibilizující účinky mají 2,6-toluendiamin a 3,4-toluendiamin. Mohou způsobovat dermatitidu a kopřivku, dále astma, zánět žaludku, zvyšují krevní tlak, způsobuje závratě, třes, křeče až koma [16]. Toluendiaminy jsou obecně biomarkery expozice toluendiisokyanátům (2.2.) [17].

Dvoukruhové aromatické aminy:

Isomery naftylaminu: Bílé krystalky 1-naftylaminu mohou červenat na vzduchu [18]. Není prokázaným karcinogenem, nalezl od 2-naftylaminu, který způsobuje nádory močového měchýře, zvláště u lidí trpících dlouhodobým stresem nebo vnitřním napětím a úzkostí. Jelikož jde o izomery lišící se svou karcinogenitou, je potřeba, aby byl každý analytický postup pro stanovení 2-naftylaminu jasně oddělen od stanovení 1-naftylaminu, aby se zabránilo falešnému odhadu zdravotního rizika, existujícího v pracovním prostředí [7].

Isomery methyldianilinu: Tyto látky se používají jako chemické meziproducty při výrobě isokyanátů a polyisokyanátů pro přípravu polyuretanových pěn, jako tvrdidlo pro epoxidové pryskyřice a urethanové polymery, dále jako inhibitory koroze. To může mít za následek jejich uvolnění do životního prostředí prostřednictvím nejrůznějších odpadů [19].

4-Aminobifenyl: Bezbarvé krystalky této látky se barví fialově při kontaktu se vzduchem [20]. Je vedlejším produktem při výrobě anilinu, používá se při výrobě pryže. Je další látkou, která způsobuje rakovinu ledvin a močového měchýře [21].

Tříkruhové aromatické aminy:

2-Aminoanthracen: Tato mutagenní látka se používá při výrobě nejrůznějších chemických látek, přípravků, léčiv, barviv a polymerů. Napadá hlavně slinivku břišní [22].

2-Aminofluoren: Tato látka napadá gastrointestinální trakt a způsobuje nádory zejména tlustého střeva. Bylo zjištěno, že anaerobní bakterie *Bacteroides fragilis* má enzymatické schopnosti přeměnit 2-aminofluoren na látku mutagenní pro typ bakterie *Salmonella typhimurium* [23].

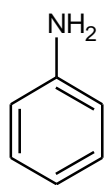
2-Amino-9-fluorenon: Jde o červenou až hnědou krystalickou látku, jejíž hlavní využití je při výrobě antimalarických léčiv [24].

Čtyřkruhové aromatické aminy:

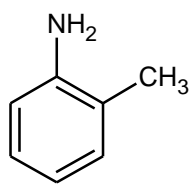
1-Aminopyren: Tato látka je hlavním metabolitem biotransformace 1-nitropyrenu, který je karcinogenním kontaminantem a napadá přirozenou mikroflóru [25].

6-Aminochrysen: Tato toxická látka znečišťující životní prostředí je cytotoxická a genotoxická [26].

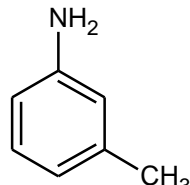
Látky 3-aminobenzanthron a 3-aminofluoranthen jsou velmi specifickými látkami a zatím toho o nich není moc známo.



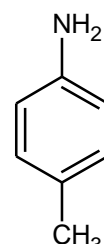
anilin



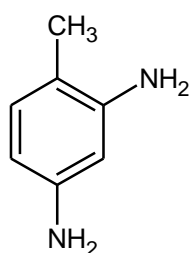
o-toluidin



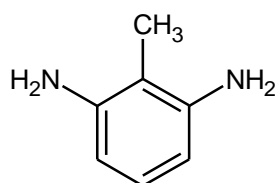
m-toluidin



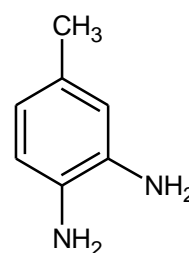
p-toluidin



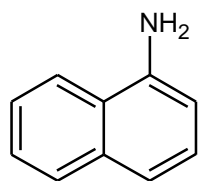
2,4-toluendiamin



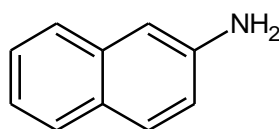
2,6-toluendiamin



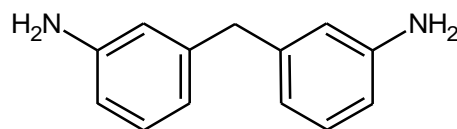
3,4-toluendiamin



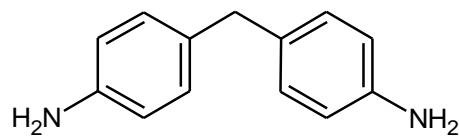
1-naftylamin



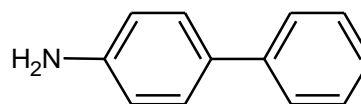
2-naftylamin



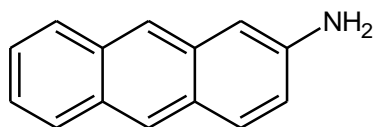
3,3'-methyldianilin



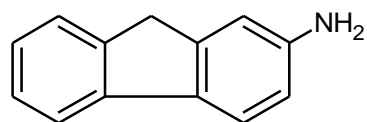
4,4'-methyldianilin



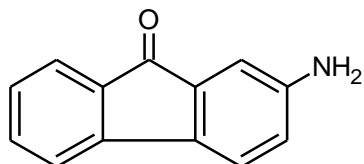
4-aminobifenyl



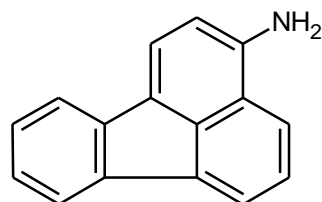
2-aminoanthracen



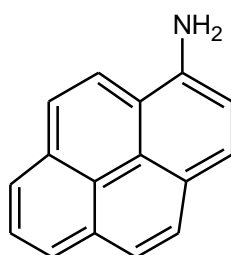
2-aminofluoren



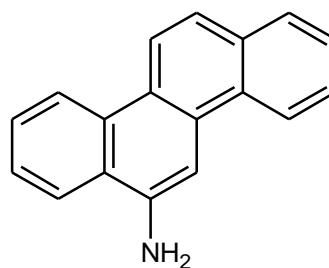
2-amino-9-fluorenon



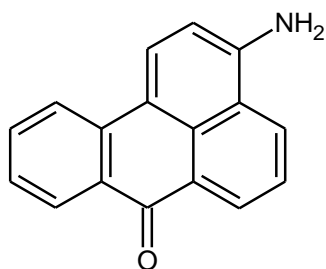
3-aminofluoranthen



1-aminopyren



6-aminochrysen



3-aminobenzanthron

Obr. 1- Vzorci vybraných aromatických aminů (jednotlivé vzorce byly vytvořeny v programu ACD/ChemSketch)

2.2. Biologické monitorování

Hlavními oblastmi využití biologického monitorování je měření expozice na pracovištích, ověření ochranných opatření a osobních ochranných prostředků a vyšetření v rámci preventivních prohlídek. Mezi nejčastěji prováděná vyšetření v ČR patří v současné době stanovení kyseliny hippurové, kyselin methyhlippurových a kyseliny mandlové v moči, které jsou ukazateli expozice toluenu, xylenům a styrenu [1].

Biologické monitorování, nebo biologické expoziční testy, zahrnují monitorování sledované látky nebo jejích metabolitů přímo v organismu - v tzv. biologickém materiálu. Nejčastějším biologickým materiálem bývá krev a moč. Stanovovaná látka se označuje jako biomarker (ukazatel) expozice. V oblasti biologických expozičních testů se využívá tzv. biologický limit (BL), který vyjadřuje povolenou koncentraci měřeného indikátoru dávky nebo účinků většinou v moči. Biologický limit odpovídá takové úrovni expozice, o níž se podle současných vědeckých poznatků předpokládá, že ani při dlouhodobém každodenním opakování nepoškodí zdraví exponovaných osob. Biologické limity jsou navrhovány tak, aby byly v souladu s přípustnými expozičními limity (PEL), pro koncentraci výchozích škodlivin v pracovním ovzduší. Vyšetření, jehož výsledek je porovnatelný s biologickým limitem, se nazývá biologický expoziční test (BET) [1].

Pojem biologické monitorování přesně nevymezuje, zda je pro daný ukazatel pouze prokázána jeho přítomnost nebo i množství. Má-li být ukazatel prakticky použitelný pro posouzení velikosti expozice dané škodlivině a zároveň chránit před expozicí nadměrnou, je nutné zjistit kvantitativní vztah mezi hladinami škodliviny a příslušného ukazatele. Určitá hladina ukazatele je pak dohodou přijata jako biologický limit [1].

Z analytických metod u biologického monitorování převládají metody chromatografické. Základními metodami jsou plynová chromatografie (GC) s univerzálním plamenovým ionizačním detektorem, případně se selektivním detektorem pro dusíkaté látky nebo detektorem elektronového záhytu pro sloučeniny s atomy halogenů, a kapalinová chromatografie (HPLC) s UV detektorem. Běžně dostupnou se stává také kombinace plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS). Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS), představující nástroj s největšími analytickými možnostmi, je pro rutinní analýzy využíváno zatím jen ojediněle. Základní metodou pro stanovení kovů je atomová absorpční spektrometrie (AAS), nástrojem s největšími možnostmi je hmotnostní spektrometrie s ionizací induktivně vázanou plasmou (ICP/MS). Výběr metod pro stanovení ukazatelů biologického monitorování není v ČR vázán předpisy [1].

Aromatické aminy se běžně stanovují například ve vzorcích materiálu, pracovního ovzduší, výluhů, potravin a podobně. Při biologickém monitorování se tyto látky nejčastěji stanovují v moči, nebo jako sulfinamidové adukty s krevními proteiny. V oblasti monitorování aromatických aminů se nejčastěji posuzuje expozice toluendiisokyanátům (TDI), které jsou důležitými průmyslovými chemikáliemi. Používají se při výrobě polyuretanových polymerů, jako jsou například pěny, nátěrové hmoty, sportovní vybavení (lyže, tenisové rakety), nebo obuv a nábytek [27,28]. Toluendiisokyanát může ve vysokých koncentracích způsobovat podráždění sliznice, má senzibilizující vlastnosti, může způsobovat astma a také může postupně zhoršovat funkci plic. Je karcinogenní pro zvířata, pro člověka jeho karcinogenita zatím prokázána nebyla [30]. Průmyslově se vyrábí jako směs 2,4- a 2,6-TDI, v poměru 80:20 [31].

Ukazateli této expozice jsou potom 2,4- a 2,6-toluendiaminy (TDA). Obvykle se monitorování těchto látek v biologickém materiálu kombinuje s jejich stanovením ve vzduchu [17].

Z hlediska právního a hygienického jsou pro hodnocení pracovního prostředí podle nařízení vlády č. 362/2007 Sb, § 14 (Hodnocení zdravotního rizika chemických faktorů a prachu), definovány přípustné expoziční limity (PEL) a nejvyšší přípustné koncentrace (NPK - P) [29].

Přípustné expoziční limity jsou celosměnové, časově vážené průměry koncentrací plynů, par nebo aerosolů v pracovním ovzduší, jimž mohou být podle současného stavu vědomostí a znalostí vystaveni zaměstnanci při osmihodinové pracovní době, aniž by u nich došlo i při celoživotní pracovní expozici k poškození zdravotního stavu, k ohrožení jejich pracovní schopnosti a pracovní výkonnosti. Výkyvy koncentrace škodliviny nad hodnotu PEL až do hodnoty NPK - P musí být v průběhu směny kompenzovány jejím poklesem tak, aby nebyla hodnota PEL překročena. PEL platí za předpokladu, že zaměstnanec je zatěžován tělesnou prací, při které jeho průměrná plicní ventilace nepřekračuje 20 litrů za minutu a doba výkonu práce nepřesahuje 8 hodin [29].

Nejvyšší přípustné koncentrace chemických látek v pracovním ovzduší jsou takové koncentrace, kterým nesmí být zaměstnanec v žádném časovém úseku pracovní doby vystaven. Podle citlivosti použité analytické metody pro stanovení škodliviny v pracovním ovzduší je možné porovnávat s NPK - P časově vážený průměr její koncentrace po dobu nejvýše 15 minut [29].

Analogie PEL a NPK - P v pracovním prostředí platí pro životní prostředí. Hovoří se o přípustných koncentracích (PK) nebo nejvyšších přípustných koncentracích (NPK). Je definována průměrná 24hodinová koncentrace jako střední hodnota měřená na stanoveném místě v rozmezí 24 hodin. Krátkodobou koncentrací se rozumí střední hodnota koncentrace změřená na stanoveném místě v časovém úseku 30 minut [1].

2.3. Základní metodiky stanovení aromatických aminů

2.3.1. Obecný postup stanovení

Jak již bylo zmíněno (2.2.), pro účely biologického monitorování expozice aromatickým aminům lze stanovit buď jejich kovalentní adukty s krevními proteiny, kde jsou vázány přes cysteinovou -SH skupinu jako sulfinamidy (protein-SONH-Ar) nebo v moči, do které se z větší části vylučují ve formě acetylderivátů (Ar-NHCOCH₃).

Byla vypracována metoda monitorování expozice aromatickým aminům. Tento postup má velký význam pro posouzení rizik pro zdraví zaměstnanců vystavených působení těmto látkám. Příprava vzorku a stanovení aromatických aminů jsou ale poměrně komplikované a časově náročné [3].

Aromatické aminy, z nichž některé jsou v biologickém materiálu přítomny v konjugované formě, jsou kyselou nebo alkalickou hydrolýzou převedeny na volné aminy. Pokud je známo, že se aminy v materiálu vyskytují jen ve své volné formě, hydrolýza není nutná a vzorky se zpracují a analyzují podle dalšího potupu. Volné aminy se od biologické matrice separují dvojitou L/L (kapalina/kapalina) extrakcí nejčastěji do toluenu [3].

Dalším krokem celého postupu je derivatizace volných aminů (nejčastěji perfluoroacylanhydridy). Chemická derivatizace je cílená chemická reakce pro určitý typ sloučenin. Provádí se za účelem zlepšení chromatografického chování - snížení polaritu analytu blokováním polárních funkčních skupin, např. -OH, -NH₂, -COOH, ke snížení meze detekce, nebo k podpoření identifikace domnělého analytu po převedení na vhodný derivát v následné konfirmační analýze. Aminy lze převést na deriváty buď pomocí anhydridu kyseliny pentafluoropropionové (PFPA) nebo anhydridu kyseliny heptafluoromáselné (HFBA) [3].

Separace a kvantitativní analýza aromatických aminů se provádí kapilární plynovou chromatografií v kombinaci s detektorem elektronového záchytu (ECD), plamenovým ionizačním detektorem (FID) nebo termoionizačním dusíko - fosforovým detektorem (NPD). Někdy může stanovení aromatických aminů s těmito detektory přinášet problémy, poté je vhodná detekce sloučenin v kombinaci plynová chromatografie - hmotnostní spektrometrie (GC/MS), která se během několika posledních let stala velmi populární [3].

2.3.2. Metodické detaily postupu stanovení

Výše popsaná standardní metoda může být různě modifikována a může se odlišovat v dílčích krocích pracovního postupu, podle typu dané sloučeniny nebo podle typu biologického materiálu, ve kterém se aromatické aminy stanovují. Schéma jednotlivých postupů bývá stejné jako u výše popsané metody a většinou se liší pouze v použitých chemikáliích a dílčích operačních parametrech.

Jednotlivá měření se v první řadě liší způsobem odběru biologického materiálu. Liší se v počtu odběrů, časovém rozmezí mezi jednotlivými odběry a dobou, která uplynula od expozice.

Dalším často modifikovaným krokem je hydrolyza látek. Nejčastěji se k hydrolyze používá 6 mol·dm⁻³ kyselina chlorovodíková. Dále se může použít i 3 mol·dm⁻³ kyselina sírová. K následné alkalizaci vzorků bývá nejčastěji používán 5 mol·dm⁻³ nebo 10 mol·dm⁻³ hydroxid sodný. Významně se ale tento krok liší v době, po kterou jsou látky hydrolyzovány. Některé vzorky se hydrolyzují přes noc (16 hodin), některé jen 2 hodiny, některé i 1 hodinu. Teplota bývá zpravidla 100 °C. Tento krok je pravděpodobně nejvíce problémovým a veškeré údaje (čínidlo, čas, teplota) je třeba pro dané látky optimalizovat.

Posledním rozdílem je konečná analýza vzorků. Zde jsou možnosti dvě - plynová nebo kapalinová chromatografie. Obě metody se kombinují s vhodnými detektory pro daný druh stanovovaných látek [2, 17, 27, 28, 31].

3. Experimentální část

Experimentální část práce zahrnuje zavedení základního analytického postupu pro stanovení aromatických aminů (2.4.) a provedení modelových experimentů s cílem potvrdit případné anomální chování některých aminů, jak bylo popsáno v kapitole 1, pro další studium jeho příčin. Na základě předběžné analýzy jednotlivých kandidátských látek byl sestaven definitivní soubor 18 aromatických aminů, jejichž směsný roztok o známých koncentracích jednotlivých složek byl pak analyzován několika způsoby. Nejprve byl tento směsný roztok rovnou derivatizován a analyzován plynovou chromatografií, a naměřené plochy píků jednotlivých látek byly označeny jako referenční hodnoty. Dále byl směsný roztok aminů přidáván do destilované vody nebo lidské a potkaní moči a zpracován postupem, který simuloval kompletní stanovení aminů v reálných vzorcích moči. Nalezené plochy píků aminů v takto zpracovaných vzorcích byly porovnány s referenčními hodnotami. U některých aminů byly nalezeny významné rozdíly mezi referenčními hodnotami a nálezy v kompletně zpracovaných vzorcích. Příčiny těchto rozdílů budou dále studovány.

3.1. Přístroje a chemikálie

Přístroje: vrtítka - Thermoline, Maximix

centrifugy - Hettich Zentrifugen EBA 21, Hettich Zentrifugen EBA 20

vyhřívací blok – Multi - block heater

vaková odparka - Jouan RC 10-22

plynový chromatograf Agilent 6890N s plamenovým ionizačním detektorem

Chemikálie: toluen p.a. - Merck

acetonitril - Merck

koncentrovaná H₂SO₄ - čistota 96,6 %

NaOH - Merck, CAS: 1310-73-2, čistota 99,6 %

Na₂HPO₄·2 H₂O - Merck, CAS: 10028-24-7, čistota 99,5 %

NaH₂PO₄·H₂O - Merck, CAS: 10049-21-5, čistota 99,0 %

HFBA (anhydrid kyseliny heptafluoromáselné) -CAS: 336-59-4,
čistota 99,0 %

anilin (A) - Fluka Chemika, CAS: 62-53-3, čistota 99,5 %

o-toluidin (*o*-T) - Aldrich Chemical Company, CAS: 95-53-4,
čistota 99,0 %

m-toluidin (*m*-T) - Aldrich Chemical Company, CAS: 108-44-1,
čistota 99,0 %

p-toluidin (*p*-T) - Loba Feinchemie, CAS: 106-49-0, čistota 99,0 %

2,4-toluendiamin (2,4-TDA) - Fluka Chemika, CAS: 95-80-7,
čistota 98,0 %

2,6-toluendiamin (2,6-TDA) - Aldrich Chemical Company,
CAS: 823-40-5, čistota 97,0 %

3,4-toluendiamin (3,4-TDA) - Fluka Chemika, CAS: 496-72-0,
čistota 97,0 %

1-naftylamin (1-NA) - Lachema Brno, CAS: 134-32-7, čistota 99,0 %

2-naftylamin (2-NA) – Lachema Brno, CAS: 91-59-8, čistota 99,0 %

3,3'-methylendianilin (3,3'-MDA) - Aldrich Chemical Company,
CAS: 19471-126, čistota 97,0 %

4,4'-methylendianilin (4,4'-MDA) - Aldrich Chemical Company,
CAS: 101-77-9, čistota 97,0 %

4-aminobifenyl (4-AB) – Riedel - de Haën, CAS: 92-67-1, čistota 98,5 %

2-aminoanthracen (2-AA) - zapůjčeno z katedry analytické chemie
PřF UK, CAS: 613-13-8

2-aminofluoren (2-AF) - zapůjčeno z katedry analytické chemie PřF UK,
CAS: 153-78-6

2-amino-9-fluorenon (2-A-9-F) - zapůjčeno z katedry analytické chemie
PřF UK, CAS: 3096-57-9

3-aminofluoranthén (3-AFA) - zapůjčeno z katedry analytické chemie
PřF UK, CAS:13177-26-9

1-aminopyren (1-AP) - Aldrich Chemical Company, CAS: 1606-76-3,
čistota 97,0 %

6-aminochrysen (6-ACh) - Aldrich Chemical Company, CAS: 2642-98-0,
čistota 97,0 %

3-aminobenzanthron (3-ABA) - syntetizováno na katedře organické
chemie VŠCHT a dodáno ve formě roztoku v acetonitrilu

3.2. GC analýza

Veškerá plynově - chromatografická stanovení byla provedena na přístroji Agilent 6890N s plamenovým ionizačním detektorem. Vzorky byly analyzovány na koloně DB-5MS UI (délka 30 m, vnitřní průměr 250 μm a tloušťka filmu 0,25 μm) od firmy J&W Scientific. Nosným plynem byl dusík o průtokové rychlosti 1,5 ml/min. Analýzy byly prováděny v režimu split v poměru 1:20. Teplota injektoru: 250 $^{\circ}\text{C}$, nástřik: 1 μl . Teplota kolony: 50 - 320 $^{\circ}\text{C}$ s teplotním gradientem 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Doba jedné analýzy byla 14 minut. Teplota detektoru: 250 $^{\circ}\text{C}$.

3.3. Příprava roztoků

3.3.1. Příprava pomocných roztoků

- 0,1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ fosfátový pufr, pH 7,0: 0,2 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaH_2PO_4 (100 ml) byl připraven rozpuštěním 2,788 g pevného $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ v destilované vodě, ve 100ml odměrné baňce. 0,2 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Na_2HPO_4 (200 ml) byl připraven rozpuštěním 7,155 g pevného $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v destilované vodě, ve 200ml odměrné baňce. K přípravě pufru bylo použito 39,0 ml 0,2 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaH_2PO_4 a 61,0 ml 0,2 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Na_2HPO_4 . Roztok byl v odměrné baňce doplněn destilovanou vodou na 200 ml a upraven na přesnou hodnotu pH 7,0.

- 3 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ H_2SO_4 : 16,6 ml koncentrované H_2SO_4 bylo doplněno v odměrné baňce destilovanou vodou na 100 ml.

- 10 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaOH: 200 g pevného NaOH bylo doplněno v odměrné baňce destilovanou vodou na 500 ml.

3.3.2. Příprava zásobních a směsných roztoků aromatických aminů

Roztoky pevných aromatických aminů (1 mg/ml) byly připraveny navážením 3 mg dané látky na analytických vahách a rozpuštěním ve 3 ml acetonitrilu. Roztoky kapalných látek (1%) byly připraveny odměřením 30 μl těchto látek a doplněním 2970 μl acetonitrilu. Jejich koncentrace tedy byla desetkrát vyšší, než u roztoků pevných látek. Zvlášť byl připraven roztok látky 3-aminobenzanthronu. Koncentrace zásobního roztoku byla 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ acetonitrilu. Ze zásobního roztoku bylo odměřeno 312,5 μl a roztok byl doplněn 687,5 μl toluenu. Jeho výsledná koncentrace byla tedy 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a tento roztok byl již použit přímo k derivatizaci.

Roztok 3-aminobenzanthronu byl také zakoncentrován pro stanovení látek v matrici. Kvůli jeho omezenému množství bylo 15,625 ml roztoku 3-aminobenzanthronu (32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ acetonitrilu) postupně po cca 5 ml přidáváno do 10ml zkumavky a částečně odpařováno ve vakuové odparce Jouan při teplotě 40 $^{\circ}\text{C}$, do zbytku přibližně 1 ml. Poté byl vysušen dosucha. Odparek byl rozpuštěn ve 3 ml acetonitrilu. Tento roztok byl přidán do syntetické směsi standardů aromatických aminů, kde jeho výsledná koncentrace činila 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (3.4.2.).

3.4. Postup derivatizace jednotlivých aminů a příprava směsi aromatických aminů

3.4.1. Derivatizace roztoků jednotlivých aromatických aminů

Z připravených zásobních roztoků pevných aromatických aminů (1 mg/ml) bylo odebráno po 100 μl do 4ml vialek. Roztoky byly doplněny 900 μl toluenu. Koncentrace těchto látek ve vzorku tedy byla 100 $\mu\text{g/ml}$. Ze zásobních roztoků kapalných aromatických aminů (10 mg/ml) bylo odebráno po 10 μl a doplněno 990 μl toluenu. Koncentrace těchto roztoků byla také 100 $\mu\text{g/ml}$. K sadě roztoků byl přidán již dříve připravený roztok 3-aminobenzanthronu (10 $\mu\text{g/ml}$) (3.2.2.). Koncentrace tohoto vzorku tedy byla desetkrát nižší, než koncentrace ostatních roztoků. Do všech vialek s roztoky bylo přidáno 20 μl derivatizačního činidla HFBA. Vialky byly vloženy do bloku, vyhřátého na 50 °C. Derivatizace látek v bloku probíhala po dobu 1 hodiny. Po vyjmutí z vyhřívacího bloku byl do vialek přidán 1 ml 0,1 mol·dm⁻³ fosfátového pufru o pH 7,0. Všechny vzorky byly 1 minutu protřepávány na vrtítku a poté stočeny v centrifuze při 5000 otáčkách po dobu 5 minut. Oddělené toluenové extrakty byly přeneseny do další sady 4ml vialek a zcela vysušeny ve vakuové odparce Jouan. Vysoušení trvalo 40 min, při 40 °C. Po vysušení byly vzorky rozpuštěny ve 200 μl toluenu (3-aminobenzanthron ve 100 μl toluenu) a analyzovány plynovou chromatografií s plamenovým ionizačním detektorem (3.2.) [32]. Změřením jednotlivých vzorků aromatických aminů byla zjištěna jejich charakteristická odezva, retenční časy a jejich pořadí (4. - Tab. 2) a přistoupilo se k dalšímu kroku celého experimentu.

3.4.2. Příprava směsného roztoku aromatických aminů

Do jedné 4ml vialky bylo odměřeno po 100 μl ze všech zásobních roztoků jednotlivých látek a rozpouštědlo bylo odfoukáno dusíkem na objem 0,5 ml. Do druhé 4ml vialky bylo odměřeno po 10 μl všech zásobních roztoků. Do obou vzorků byl přidán 1 ml toluenu a derivatizační činidlo HFBA. Do vialky se 100 μl zásobních roztoků bylo přidáno 40 μl činidla, do druhé vialky s nižší koncentrací roztoků bylo přidáno pouze 20 μl činidla. Další postup byl stejný jako při derivatizaci jednotlivých aminů. Obě vialky byly vloženy do bloku, vyhřátého na 50 °C na 1 hodinu. Do roztoků byl přidán 1 ml 0,1 mol·dm⁻³ fosfátového pufru o pH 7,0, kterým byl poté toluen po dobu 1 minuty promýván na vrtítku. Poté byly vzorky stočeny na centrifuze při 5000 otáčkách po dobu 5 minut. Toluenová vrstva byla odebrána do nových 4ml vialek a vzorky byly zcela vysušeny a rozpuštěny v 1 ml toluenu (vzorky o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$) nebo ve 100 μl toluenu (roztoky o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$). Na základě naměřených výsledků byl poté navržen vhodný poměr koncentrací jednotlivých látek tak, aby jejich plochy píků byly srovnatelné (4. - Obr. 2). Poté byla připravena výsledná syntetická směs všech standardů aromatických aminů. Do 25 ml Erlenmayerovy baňky se zábrusem bylo odměřeno po 1 ml všech zásobních roztoků pevných látek o koncentraci 1 mg/ml. Zásobních roztoků kapalných látek o koncentraci 10 mg/ml bylo odměřeno po 150 μl a zásobního roztoku *p*-toluidinu o koncentraci 1 mg/ml bylo odměřeno 1,5 ml. Do směsi byly dále přidány 3 ml připraveného roztoku 3-aminobenzanthronu o koncentraci 166,67 $\mu\text{g/ml}$ (3.3.2.). Celá směs byla doplněna 2,05 ml acetonitrilu na celkový objem 20 ml. Výsledné koncentrace aromatických aminů ve směsi tedy byly: A, *o*-T, *m*-T a *p*-T: 75 $\mu\text{g/ml}$, 3,4-TDA, 2,6-TDA, 2,4-TDA, 1-NA,

2-NA, 2-AF, 3,3'-MDA, 2-A-9-F, 2-AA, 4,4'-MDA, 3-AFA, 1-AP, 6-ACh: 50 µg/ml a 3-ABA: 25 µg/ml.

3.4.3. Příprava roztoku 4-AB-HFB jako vnitřního standardu

V modelových experimentech (3.5.) jsou posuzovány rozdíly mezi referenčními hodnotami (plochy píků aromatických aminů) a hodnotami nalezenými v kompletně zpracovaných vzorcích. Při provádění dané série chromatografických analýz je účelné eliminovat variabilitu způsobenou vlastní instrumentální analýzou (objem vzorku, kolísání odezvy detektoru apod.). Z tohoto důvodu byl ke všem vzorkům přidáván vnitřní standard až po všech kritických krocích zpracování vzorku. Jako vnitřní standard byl použit předem derivatizovaný 4-aminobifenyl (4-AB-HFB), jehož roztok v toluenu (10 µg/100 µl) sloužil k rozpouštění finálních odparků všech vzorků před GC analýzou. Tento roztok byl připraven tak, že 1,2 ml zásobního roztoku 4-AB v acetonitrilu (1 mg/ml) bylo převedeno na HFB derivát (3.3.1.), který byl rozpuštěn ve 12 ml toluenu.

3.5. Provedení modelových experimentů

3.5.1. Provedení modelového experimentu pro směs aromatických aminů přítomných v matrici

Protože se aromatické aminy v moči vyskytují ve formě acetylderivátů (2.3.), pro jejich stanovení je nutné je nejprve hydrolyzovat. Pro provedení celého experimentu se vzorky s matricí bylo tedy nutné nasimulovat podmínky kyselé hydrolýzy. Dále přibýly další dva kroky- neutralizace a extrakce do toluenu. Jako matrice byly použity lidská a potkaní moč. Pro kontrolu se směs stanovovala i v destilované vodě. Do 10ml šroubovacích zkumavek bylo odpipetováno 200 µl směsného roztoku aromatických aminů. Množství jednotlivých látek v tomto objemu tedy byla: A, *o*-T, *m*-T a *p*-T: 15 µg/200 µl, 3,4-TDA, 2,6-TDA, 2,4-TDA, 1-NA, 2-NA, 2-AF, 3,3'-MDA, 2-A-9-F, 2-AA, 4,4'-MDA, 3-AFA, 1-AP a 6-ACh: 10 µg/200 µl a 3-ABA: 5 µg/200 µl. Dále byly přidány 2 ml dané matrice a 1 ml 3 mol·dm⁻³ H₂SO₄. Zkumavky byly vloženy na 2 h do bloku, vyhřátého na 100°C. Poté byly vzorky zchlazeny, zalkalizovány 2 ml 10 mol·dm⁻³ NaOH a promíchány na vrtítku. Dále se do zkumavek přidaly 2 ml toluenu. Všechny zkumavky byly po dobu 2 minut ručně protřepány a stočeny v centrifuze při 5000 otáčkách po dobu 10 minut. Toluenná vrstva byla odebrána do 4ml vialek. K roztokům bylo přidáno 20 µl derivatizačního činidla HFBA. Dále následovala derivatizace podle stejného postupu, jako při měření bez matrice (3.4.2.). Jediný rozdíl byl při rozpouštění konečného odparku po vysušení vzorku. Odparek byl rozpuštěn ve 100 µl zásobního roztoku 4-AB-HFB (10 µg/100 µl), který sloužil pro kontrolu jako vnitřní standard (3.4.3.). Vzhledem k náročnosti celého experimentu a omezenému času bylo toto měření provedeno pouze dvakrát.

3.5.2. Provedení modelového experimentu pro směs aromatických aminů bez matrice

Současně s modelovým experimentem pro směs látek v matrici se prováděl i experiment pro směs standardů aromatických aminů bez matrice. Z pracovního postupu byla vynechána simulovaná hydrolýza, alkalizace a extrakce toluenem. Směs standardů v toluenu (200 μ l) byla rovnou derivatizována (3.4.2.) a změřena pomocí GC/FID. Získaly se tak referenční hodnoty, k nimž se vztahovaly výsledky měření vzorků s matricí.

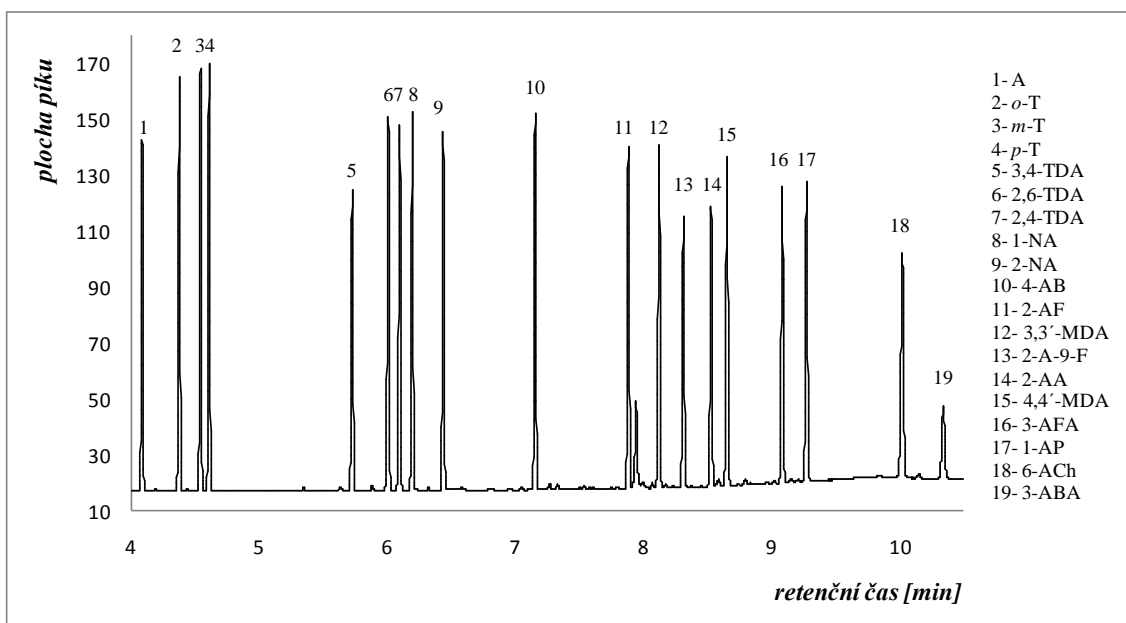
4. Výsledky a diskuze

Cílem celého experimentu bylo zjištění kritických kroků obecného pracovního postupu pro stanovení aromatických aminů, které mohou být zdrojem chyb.

Pro vybraný soubor testovacích látek byly naměřeny jejich retenční časy (Tab. 2) a chromatografické odezvy (plochy píků), na základě kterých byla sestavena vhodná směs. Chromatogram této směsi je ukázán na Obr. 2. Testovací směs byla nejprve opakovaně analyzována maximálně zjednodušeným postupem (3.5.2.), aby byly získány referenční hodnoty ploch píků (Tab. 3 - 6, Graf 1). Z těchto údajů je zřejmé, že k větším ztrátám látek nedochází a směs je stabilní. Dále byla testovací směs přidávána do jednotlivých maticí (voda, potkaní a lidská moč) a vzorky byly zpracovány kompletním postupem. Plochy píků jednotlivých aminů v maticích jsou ukázány v Tab. 7 - 12. Z těchto hodnot byly sestrojeny grafy pro jednotlivé matrice (Graf 2 - 4). Z naměřených hodnot všech analýz (bez matrice i s jednotlivými maticemi) byl zvlášť sestrojen graf pro vnitřní standard 4-AB-HFB, pro potvrzení jeho stability (Graf 5). Z porovnání grafů pro stanovení aromatických aminů v jednotlivých maticích se stanoveními bez matrice je zřejmé, že při simulaci celého postupu stanovení aromatických aminů v moči dochází u některých látek k velkým ztrátám. Bližší souhrn, pravděpodobné důvody a diskuze těchto ztrát jsou uvedeny níže.

Tab. 2 - Hodnoty retenčních časů jednotlivých aromatických aminů - GC/FID

látka	zkratka	t _r [min]
anilin	A	4,09
o-toluidin	o-T	4,38
m-toluidin	m-T	4,54
p-toluidin	p-T	4,61
3,4-diaminotoluen	3,4-TDA	5,73
2,6-diaminotoluen	2,6-TDA	6,01
2,4-diaminotoluen	2,4-TDA	6,09
1-naftylamin	1-NA	6,19
2-naftylamin	2-NA	6,43
4-aminobifenyl	4-AB	7,15
2-aminofluoren	2-AF	7,89
3,3'-methylendiamin	3,3'-MDA	8,11
2-amino-9-fluorenon	2-A-9-F	8,30
2-aminoanthracen	2-AA	8,57
4,4'-methylendiamin	4,4'-MDA	8,64
3-aminofluoranthren	3-AFA	9,08
1-aminopyren	1-AP	9,27
6-aminochrysen	6-ACh	10,02
3-aminobenzanthron	3-ABA	10,32



Obr. 2 - Chromatogram směsi 18 aromatických aminů bez matrice + 4-AB-HFB (pík 10) jako vnitřní standard

Tab. 3 - Hodnoty ploch píků referenčních vzorků - směs aromatických aminů bez matrice měření č. 1

látka	tr [min]	plocha píku					
		vz. a)	vz. b)	vz.c)	arit. průměr	SD	RSD %
anilin	4,08	108,90	89,30	94,80	92,05	4,87	5,29
<i>o</i>-toluidin	4,37	133,80	122,10	125,50	127,13	6,91	5,44
<i>m</i>-toluidin	4,54	132,40	124,60	128,00	128,33	4,61	3,60
<i>p</i>-toluidin	4,60	136,50	131,40	134,30	134,07	3,01	2,25
toluen-3,4-diamin	5,72	104,70	106,00	109,10	106,60	2,60	2,44
toluen-2,6-diamin	6,00	139,20	140,00	142,50	140,57	1,95	1,39
toluen-2,4-diamin	6,09	130,50	130,60	134,20	131,77	2,19	1,66
1-naftylamin	6,19	122,20	123,90	127,00	124,37	2,84	2,28
2-naftylamin	6,43	118,70	119,80	123,20	120,57	2,66	2,21
2-aminofenantren	7,87	121,70	122,50	125,50	123,23	2,25	1,83
3,3-methylendiamin	8,12	128,80	129,70	133,30	130,60	2,66	6,72
2-amino-9-fluoren	8,31	101,40	100,80	103,20	101,80	1,42	1,39
2-aminoanthracen	8,52	102,10	100,50	103,60	102,07	1,83	1,79
4,4-methylendiamin	8,65	125,80	121,20	126,00	124,33	2,84	2,28
3-aminofluoranth	9,08	114,10	115,30	118,10	115,83	2,36	2,04
1-aminopyren	9,27	121,70	123,30	126,40	123,80	2,78	2,25
6-aminochrysen	10,01	115,80	117,00	119,90	117,57	2,42	2,06
3-aminobenzanthron	10,33	41,20	41,60	42,80	41,87	0,95	2,27
4-aminobifenyl	7,15	128,60	128,30	127,40	128,10	0,71	0,55

Tab. 4 - Hodnoty ploch píků referenčních vzorků - směs aromatických aminů bez matrice měření č. 2

látka	tr [min]	vz. a)		vz. b)		plocha píku	
						arit. průměr	SD
anilin	4,09	101,70	74,70	88,20	23,93	27,13	
<i>o</i>-toluidin	4,38	122,40	98,80	110,60	20,91	18,91	
<i>m</i>-toluidin	4,54	121,80	100,30	111,05	11,86	10,68	
<i>p</i>-toluidin	4,61	127,00	108,40	117,70	16,48	14,00	
toluen-3,4-diamin	5,72	98,00	90,80	94,40	6,38	6,76	
toluen-2,6-diamin	6,00	132,80	123,50	128,15	8,24	6,43	
toluen-2,4-diamin	6,09	120,40	112,10	116,25	7,36	6,30	
1-naftylamin	6,19	118,20	110,20	114,20	7,09	6,21	
2-naftylamin	6,43	116,00	108,30	112,15	6,82	6,08	
2-aminofenantren	7,87	118,90	110,10	114,50	7,80	6,81	
3,3-methylendiamin	8,11	123,60	113,50	118,55	8,95	7,55	
2-amino-9-fluorenon	8,30	93,40	89,20	91,30	3,72	4,07	
2-aminoanthracen	8,52	86,20	85,30	85,75	0,80	0,93	
4,4-methylendiamin	8,64	110,70	108,10	109,40	2,30	2,10	
3-aminofluoranthen	9,07	109,50	100,80	105,15	7,71	7,33	
1-aminopyren	9,27	116,90	107,60	112,25	8,24	7,34	
6-aminochrysen	10,01	106,90	98,10	102,50	7,80	7,61	
3-aminobenzanthron	10,33	36,60	33,40	35,00	2,84	8,11	
4-aminobifenyl	7,15	138,80	141,00	139,90	1,95	1,39	

Tab. 5 - Hodnoty ploch píků referenčních vzorků - směs aromatických aminů bez matrice měření č. 3

látka	tr [min]	vz. a)		vz. b)		vz. c)		plocha píku	
								arit. průměr	SD
anilin	4,09	105,60	72,10	77,80	85,20	19,79	23,20		
<i>o</i>-toluidin	4,38	116,70	92,10	98,00	102,27	14,53	14,21		
<i>m</i>-toluidin	4,54	115,00	93,70	98,30	102,33	12,58	12,29		
<i>p</i>-toluidin	4,61	117,80	99,40	101,80	106,33	10,87	10,22		
toluen-3,4-diamin	5,72	84,60	77,40	83,70	81,90	4,25	5,19		
toluen-2,6-diamin	6,00	115,60	107,50	115,40	112,83	4,79	4,25		
toluen-2,4-diamin	6,09	99,10	91,20	98,30	96,20	4,67	4,85		
1-naftylamin	6,19	102,80	94,40	99,90	99,03	4,96	5,01		
2-naftylamin	6,43	103,90	95,00	101,40	100,10	5,79	5,78		
2-aminofenantren	7,88	109,70	101,80	109,60	109,65	0,09	0,08		
3,3-methylendiamin	8,11	112,70	105,20	113,30	110,40	4,79	4,34		
2-amino-9-fluorenon	8,30	87,30	82,60	89,20	86,37	3,90	4,52		
2-aminoanthracen	8,52	75,00	68,50	75,40	72,97	4,08	5,59		
4,4-methylendiamin	8,64	73,00	72,10	68,10	71,07	2,89	4,07		
3-aminofluoranthen	9,08	99,00	93,20	100,20	97,47	4,14	4,25		
1-aminopyren	9,26	105,70	99,40	107,00	104,03	4,49	4,32		
6-aminochrysen	10,01	93,60	88,00	94,90	92,17	4,08	4,43		
3-aminobenzanthron	10,33	34,20	31,90	34,40	33,50	1,48	4,42		
4-aminobifenyl	7,15	135,40	132,80	132,50	133,57	1,71	1,28		

Tab. 6 - Hodnoty ploch píkù referenčních vzorkù - směs aromatických aminů bez matrice měření č. 4

látka	tr [min]	plocha píku					
		vz. a)	vz. b)	vz.c)	arit. průměr	SD	RSD %
anilin	4,09	92,40	104,90	111,20	102,83	11,11	10,80
<i>o</i>-toluidin	4,38	113,30	126,40	122,20	120,63	7,34	6,08
<i>m</i>-toluidin	4,54	113,20	125,80	120,70	119,90	7,44	6,21
<i>p</i>-toluidin	4,60	116,40	128,50	123,30	122,73	7,15	5,83
toluen-3,4-diamin	5,72	85,70	90,80	91,70	89,40	3,54	4,00
toluen-2,6-diamin	6,00	115,70	113,10	122,00	116,93	5,26	4,50
toluen-2,4-diamin	6,09	103,60	109,20	111,10	107,97	4,43	4,10
1-naftylamin	6,19	109,40	116,40	118,60	114,80	5,44	4,74
2-naftylamin	6,43	110,40	117,50	120,10	116,00	5,73	4,94
2-aminofenantren	7,87	119,00	125,50	127,70	124,07	5,14	4,14
3,3-methylendiamin	8,11	113,80	111,10	121,30	115,40	6,03	5,23
2-amino-9-fluorenon	8,30	86,50	82,10	91,00	86,53	5,26	6,08
2-aminoanthracen	8,52	71,00	69,90	75,40	72,10	3,25	4,51
4,4-methylendiamin	8,64	98,70	90,40	103,50	97,53	7,74	7,94
3-aminofluoranthen	9,08	107,60	113,60	116,50	112,57	5,26	4,67
1-aminopyren	9,27	116,20	122,80	125,80	121,60	5,67	4,66
6-aminochrysen	10,01	103,40	109,50	111,70	108,20	4,90	4,53
3-aminobenzanthron	10,33	37,20	39,70	40,50	39,13	1,95	5,00
4-aminobifenyl	7,15	131,70	131,80	141,70	135,07	5,91	4,38

Tab. 7 - Hodnoty ploch píkù - směs aromatických aminů v destilované vody; měření č. 1

látka	tr [min]	plocha píku					
		vz. a)	vz. b)	vz.c)	arit. průměr	SD	RSD %
anilin	4,09	48,00	50,20	47,00	48,40	1,89	3,90
<i>o</i>-toluidin	4,38	91,60	97,40	90,70	93,23	3,96	4,25
<i>m</i>-toluidin	4,54	100,20	105,40	98,30	101,30	4,19	4,14
<i>p</i>-toluidin	4,61	107,80	113,20	105,60	108,87	4,49	4,12
toluen-3,4-diamin	5,72	49,00	51,10	44,50	48,20	3,90	8,09
toluen-2,6-diamin	6,00	45,80	41,90	44,40	44,03	2,30	5,22
toluen-2,4-diamin	6,09	40,60	43,70	39,80	41,37	2,30	5,56
1-naftylamin	6,19	98,60	102,30	93,20	98,03	5,38	5,49
2-naftylamin	6,43	98,10	102,50	93,60	98,07	5,26	5,36
2-aminofenantren	7,88	103,00	107,00	98,80	102,93	4,84	4,70
3,3-methylendiamin	8,11	104,70	109,10	100,60	104,80	5,02	4,79
2-amino-9-fluorenon	8,31	82,70	85,70	79,20	80,95	3,10	3,83
2-aminoanthracen	8,52	64,20	63,80	58,20	62,07	3,54	5,70
4,4-methylendiamin	8,65	93,00	105,10	60,90	86,33	26,11	30,24
3-aminofluoranthen	9,08	92,30	95,40	86,20	91,30	5,44	5,96
1-aminopyren	9,27	99,60	102,40	94,20	98,73	4,84	4,90
6-aminochrysen	10,01	74,00	75,70	68,90	72,87	4,02	5,52
3-aminobenzanthron	10,34	31,70	34,10	30,00	31,93	2,42	7,58
4-aminobifenyl	7,15	140,80	142,50	140,40	141,23	1,24	0,89

Tab. 8 - Hodnoty ploch píkû - směs aromatických aminů v destilované vodě; měření č. 2

látká	tr [min]	plocha píku					
		vz. a)	vz. b)	vz.c)	arit.průměr	SD	RSD %
anilin	4,09	19,60	25,90	30,10	25,20	6,20	24,60
<i>o</i>-toluidin	4,37	53,40	63,60	69,50	62,17	9,51	15,30
<i>m</i>-toluidin	4,54	67,80	70,60	77,40	71,93	5,67	7,88
<i>p</i>-toluidin	4,61	65,80	72,60	80,60	73,00	8,74	11,97
toluen-3,4-diamin	5,72	43,90	46,20	49,90	46,67	3,54	7,59
toluen-2,6-diamin	6,00	76,60	70,60	70,90	72,70	3,54	4,87
toluen-2,4-diamin	6,09	63,40	58,30	58,70	60,13	3,01	5,01
1-naftylamin	6,19	83,80	80,60	86,60	83,60	3,54	4,23
2-naftylamin	6,43	87,80	83,30	89,00	86,70	3,37	3,89
2-aminofenantren	8,21	96,40	91,50	96,00	94,63	2,89	3,05
3,3-methylendiamin	8,11	99,40	95,20	98,90	97,83	2,48	2,54
2-amino-9-fluorenon	8,30	79,30	74,70	78,30	77,43	2,72	3,51
2-aminoanthracen	8,52	43,20	47,10	49,90	46,73	3,96	8,47
4,4-methylendiamin	8,64	95,40	90,10	86,40	90,63	5,32	5,87
3-aminofluoranthen	9,07	83,80	80,80	82,90	82,50	1,77	2,15
1-aminopyren	9,26	89,50	86,90	90,70	89,03	2,25	2,53
6-aminochrysen	10,01	66,10	63,50	66,00	65,20	1,54	2,36
3-aminobenzanthron	10,33	29,70	28,10	29,40	29,07	0,95	3,27
4-aminobifenyl	7,15	135,90	133,80	135,40	135,03	1,24	0,92

Tab. 9 - Hodnoty ploch píkû - směs aromatických aminů v potkaní moči; měření č. 1

látká	tr [min]	plocha píku					
		vz. a)	vz. b)	vz.c)	arit.průměr	SD	RSD %
anilin	4,09	50,40	79,60	53,60	61,20	17,25	28,19
<i>o</i>-toluidin	4,38	88,40	106,90	91,10	95,47	10,93	11,45
<i>m</i>-toluidin	4,54	99,40	117,40	103,30	106,70	10,63	9,71
<i>p</i>-toluidin	4,61	108,70	121,80	111,60	114,03	7,74	6,79
toluen-3,4-diamin	/	/	/	/	/	/	/
toluen-2,6-diamin	6,00	45,90	45,90	47,00	46,27	0,65	1,40
toluen-2,4-diamin	6,09	42,10	37,70	41,50	40,43	2,60	6,43
1-naftylamin	6,19	66,60	78,80	71,30	72,23	7,21	9,98
2-naftylamin	6,43	88,70	95,60	93,40	92,57	4,08	4,41
2-aminofenantren	7,88	79,10	100,10	81,60	86,93	12,41	14,28
3,3-methylendiamin	8,11	102,90	103,00	109,20	102,95	0,09	0,01
2-amino-9-fluorenon	8,30	80,50	78,90	82,40	80,60	2,07	2,57
2-aminoanthracen	8,52	6,30	21,60	7,60	11,83	9,04	76,42
4,4-methylendiamin	8,64	80,50	97,20	82,00	86,57	9,87	11,4
3-aminofluoranthen	9,07	25,40	36,60	28,10	30,03	6,62	22,04
1-aminopyren	9,26	50,80	89,80	55,00	65,20	23,04	35,34
6-aminochrysen	10,01	19,70	57,80	24,10	33,87	22,51	66,46
3-aminobenzanthron	10,33	/	29,60	/	29,60	0	0
4-aminobifenyl	7,15	137,50	135,40	137,70	136,87	1,36	0,99

Tab. 10 - Hodnoty ploch píků - směs aromatických aminů v potkaní moči; měření č. 2

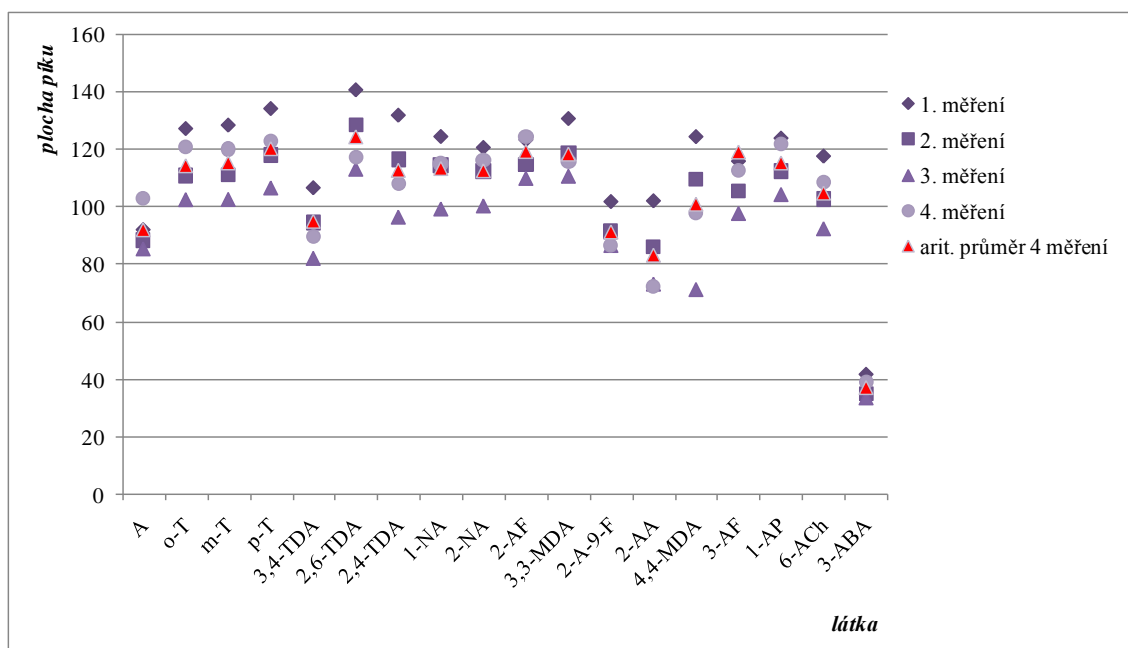
látko	tr [min]	plocha píku					
		vz. a)	vz. b)	vz.c)	arit.průměr	SD	RSD %
anilin	4,08	24,40	20,20	34,70	26,43	8,57	32,43
<i>o</i>-toluidin	4,37	52,00	46,50	70,40	65,30	14,12	25,08
<i>m</i>-toluidin	4,54	64,40	59,00	83,90	69,10	14,71	21,29
<i>p</i>-toluidin	4,61	70,90	65,10	92,80	76,27	16,37	21,46
toluen-3,4-diamin	/	/	/	/	/	/	/
toluen-2,6-diamin	6,00	65,80	63,60	76,00	68,47	7,33	10,71
toluen-2,4-diamin	6,09	54,90	53,10	63,40	57,13	6,09	10,66
1-naftylamin	6,19	56,70	55,10	65,70	59,17	6,26	10,58
2-naftylamin	6,43	76,70	75,50	90,40	80,87	8,80	10,88
2-aminofenantren	7,87	70,60	70,00	82,10	74,23	7,15	9,63
3,3-methylendiamin	8,11	93,80	95,80	112,90	100,83	11,28	11,19
2-amino-9-fluorenon	8,30	71,60	72,20	84,60	76,13	7,68	10,09
2-aminoanthracen	8,52	5,30	4,60	4,70	4,87	0,41	8,42
4,4-methylendiamin	8,64	82,50	65,80	78,60	75,63	9,87	13,05
3-aminofluoranthen	9,07	23,20	22,10	24,90	23,40	1,65	7,05
1-aminopyren	9,27	50,90	48,00	58,90	52,60	6,44	12,24
6-aminochrysen	10,01	20,10	18,60	24,10	20,93	3,25	15,53
3-aminobenzanthron	/	/	/	/	/	/	/
4-aminobifenyl	7,15	134,20	133,80	134,10	134,03	0,24	0,18

Tab. 11 - Hodnoty ploch píků - směs aromatických aminů v lidské moči; měření č. 1

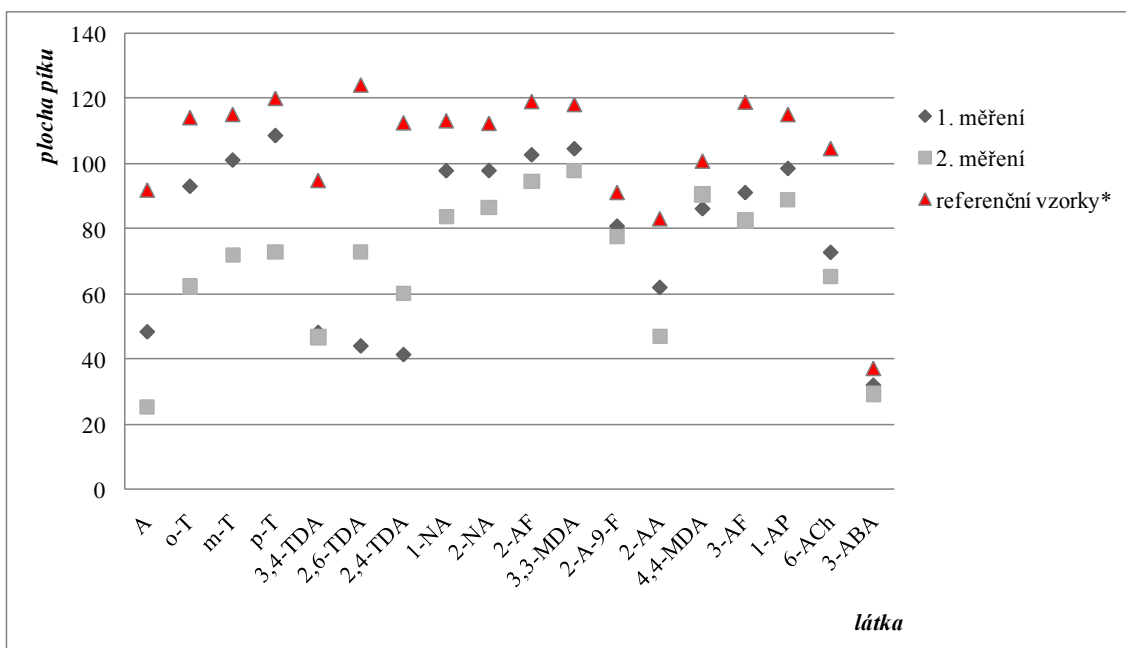
látko	tr [min]	plocha píku					
		vz. a)	vz. b)	vz.c)	arit.průměr	SD	RSD %
anilin	4,09	69,50	69,10	64,30	67,63	3,07	4,54
<i>o</i>-toluidin	4,38	105,00	106,40	100,70	104,03	3,37	3,24
<i>m</i>-toluidin	4,54	115,10	118,40	111,90	115,13	3,84	3,34
<i>p</i>-toluidin	4,61	120,70	124,40	118,20	121,10	3,66	3,02
toluen-3,4-diamin	/	/	/	/	/	/	/
toluen-2,6-diamin	6,00	48,30	48,60	46,80	47,90	1,06	2,21
toluen-2,4-diamin	6,09	41,50	43,50	40,40	41,80	1,83	4,38
1-naftylamin	6,19	81,20	73,80	76,50	77,17	4,37	5,66
2-naftylamin	6,43	95,00	97,50	95,20	95,90	1,48	1,54
2-aminofenantren	7,87	102,70	84,20	102,70	96,53	10,93	10,23
3,3-methylendiamin	8,11	104,30	115,10	101,10	106,83	8,27	7,74
2-amino-9-fluorenon	8,30	78,60	87,00	76,50	80,70	6,20	7,68
2-aminoanthracen	8,52	23,30	6,70	20,50	16,83	9,81	58,29
4,4-methylendiamin	8,64	96,40	102,40	70,20	89,67	19,02	21,21
3-aminofluoranthen	9,08	39,10	29,00	35,70	34,60	5,97	17,25
1-aminopyren	9,27	91,90	57,90	91,50	91,70	0,35	0,38
6-aminochrysen	10,01	60,90	29,20	61,60	61,25	0,62	1,01
3-aminobenzanthron	10,33	14,00	11,30	13,00	12,77	1,60	12,53
4-aminobifenyl	7,15	134,60	136,60	134,10	135,10	1,48	1,10

Tab. 12 - Hodnoty ploch píků - směs aromatických aminů v lidské moči; měření č. 2

látko	tr [min]	plocha píku					
		vz. a)	vz. b)	vz.c)	arit.průměr	SD	RSD %
anilin	4,09	42,00	44,20	52,90	46,37	6,44	13,89
o-toluidin	4,37	83,80	83,40	98,00	88,40	8,63	9,76
m-toluidin	4,54	94,30	93,20	108,60	98,70	9,10	9,22
p-toluidin	4,61	97,40	97,40	114,90	103,23	10,34	10,02
toluen-3,4-diamin	5,72	16,10	14,50	15,70	15,90	0,35	2,20
toluen-2,6-diamin	6,00	76,70	78,70	84,30	79,90	4,49	5,62
toluen-2,4-diamin	6,09	62,80	64,60	69,70	65,70	4,08	6,21
1-naftylamin	6,19	87,90	89,30	96,30	91,17	4,96	5,44
2-naftylamin	6,43	97,40	99,30	107,70	101,47	6,09	6,00
2-aminofenantren	7,87	104,60	107,40	116,60	109,53	7,09	6,47
3,3-methylendiamin	8,11	106,50	110,10	117,40	111,33	6,44	5,78
2-amino-9-fluorenon	8,30	83,10	86,50	92,70	87,43	5,67	6,49
2-aminoanthracen	8,52	40,00	40,20	43,40	41,20	2,01	4,88
4,4-methylendiamin	8,64	87,40	97,90	101,50	95,60	8,33	8,71
3-aminofluoranthen	9,08	71,00	67,00	76,90	71,63	5,85	8,17
1-aminopyren	9,27	99,70	103,80	110,50	104,67	6,38	6,28
6-aminochrysen	10,01	70,50	71,60	76,40	72,83	72,83	3,49
3-aminobenzanthron	10,33	25,30	25,70	27,80	26,27	1,48	5,63
4-aminobifenyl	7,15	138,40	131,00	141,20	136,87	6,03	4,41

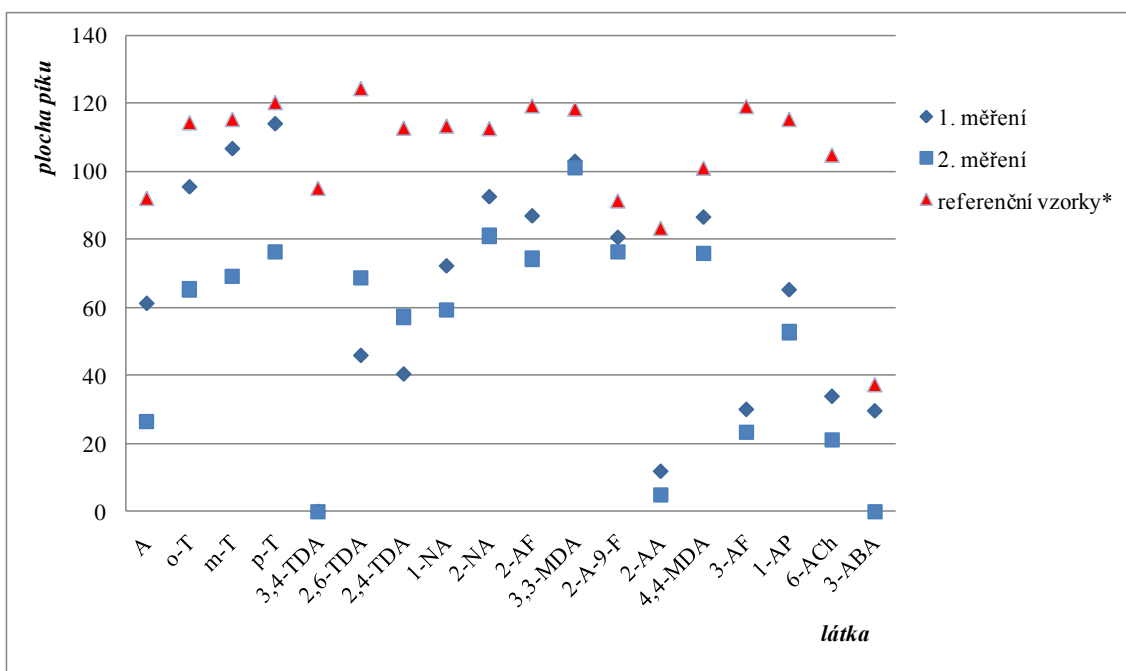


Graf 1 - Porovnání jednotlivých měření směsi standardů aromatických aminů bez matrice



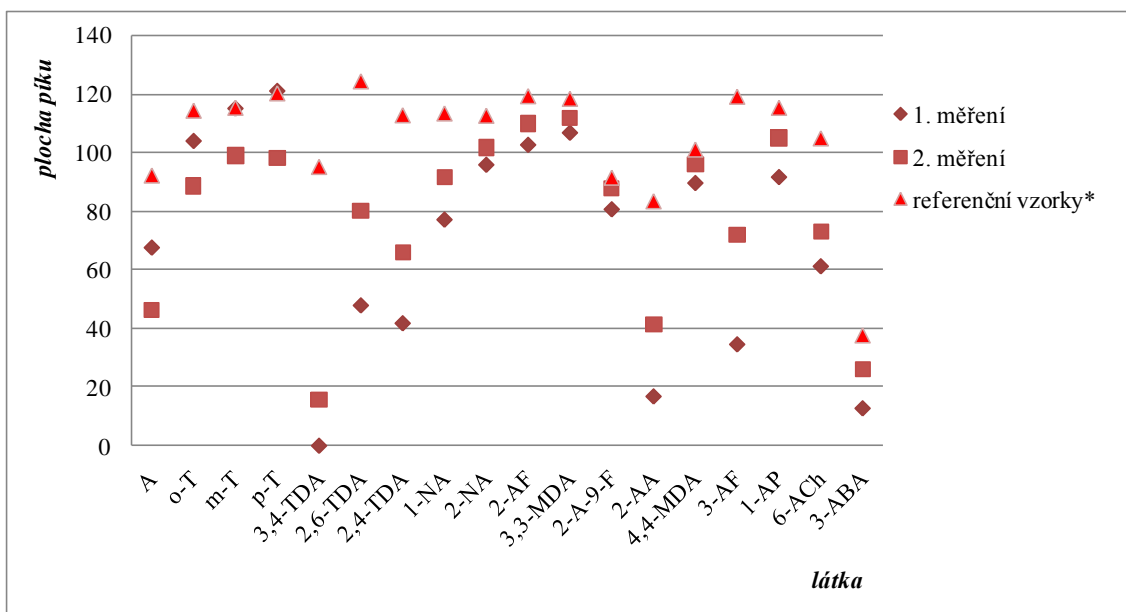
Graf 2 - Porovnání jednotlivých měření směsi standardů aromatických aminů v destilované vodě s referenčními vzorky

*aritmetický průměr 4 referenčních měření vzorků bez matrice



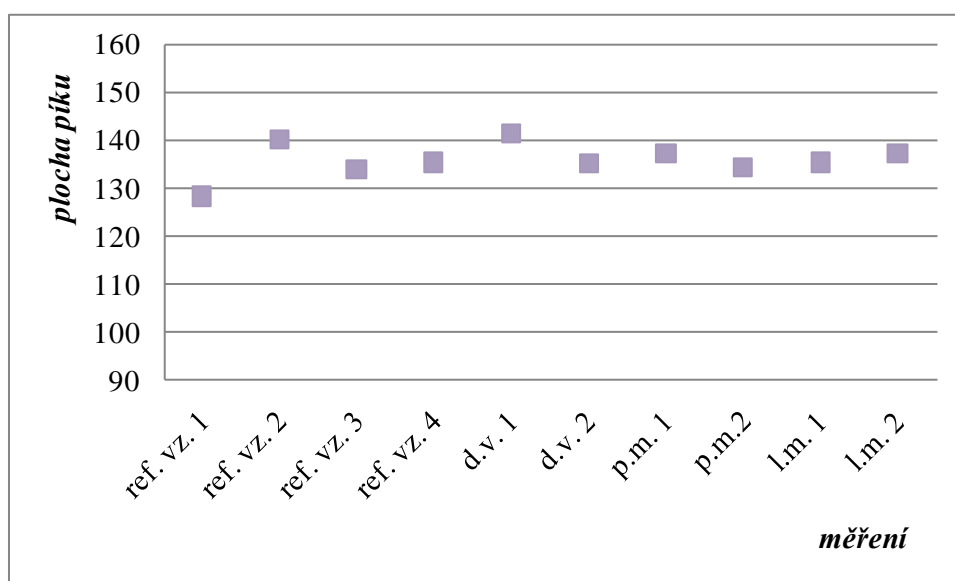
Graf 3 - Porovnání jednotlivých měření směsi standardů aromatických aminů v potkaní moči s referenčními vzorky

*aritmetický průměr 4 referenčních měření bez matrice



Graf 4 - Porovnání jednotlivých měření směsi standardů aromatických aminů v lidské moči s referenčními vzorky

*aritmetický průměr 4 referenčních měření bez matrice



Graf 5 - Porovnání jednotlivých měření pro vnitřní standard 4-AB-HFB

Jedním z možných zdrojů ztrát stanovených látek v průběhu zpracování vzorku je extrakce do toluenu. Jednak výtěžek extrakce není kvantitativní, jednak nelze kvantitativně odebrat celou toluenovou vrstvu. Realistický odhad minimální ztráty aminů při tomto kroku je

přibližně 5 %. Z porovnání výsledků měření aromatických aminů ve vzorcích, které prošly celým analytickým postupem se vzorky referenčními (Grafy 2,3 a 4) je patrné, že celková ztráta u většiny aminů nepřesahuje 5 - 10 %, a tedy i ztráty způsobené extrakcí budou nanejvýš této velikosti. K určitým ztrátám analytů může docházet i při čištění toluenových roztoků pufrem, po derivatizaci. Tento krok je ale zahrnut i ve zpracování referenčních vzorků, a případné ztráty proto nemohou být danou metodikou zjištěny.

Ke ztrátám aminů může docházet také v souvislosti s kroky simulované hydrolýzy a následné alkalizace vzorku. Tento vliv se však zřejmě bude projevovat jen selektivně u některých aminů. Porovnáním analýzy kontrolních vzorků (roztok aminů v destilované vodě), které prošly celým analytickým postupem, se vzorky referenčními se ukazuje, že k největším ztrátám dochází u A, všech isomerů TDA a u 2-AA.

Teoretickým důvodem těchto ztrát mohla být například degradace látek v připravené směsi. To ale bylo vyvráceno opakovaným stanovením této přímo derivatizované směsi v průběhu několika týdnů, kde se tento trend nevyskytoval. Nejproblémovější látkou z této skupiny je 3,4-TDA. V potkaní moči dochází k jeho 100% ztrátám. V lidské moči a v destilované vodě jeho výsledky nejsou porovnatelné. Je tedy jednou z látek, které je třeba dále podrobněji studovat.

Naopak zvláště malé ztráty byly pozorovány u skupiny dvoukruhových aromatických aminů (1-NA, 2-NA, 3,3'-MDA a 4,4'-MDA) a u tříkruhových aminů 2-A-9-F a 2-AF.

U skupiny tří a čtyřkruhových aromatických aminů jsou výsledky podobné jako u skupiny jednokruhových aminů. Nejproblémovějšími látkami jsou 2-AA a 3-ABA, jejichž výsledky nevysvětlitelně kolísají.

U všech provedených stanovení byl jako vnitřní standard použit roztok 4-AB-HFB, ve kterém byl rozpuštěn konečný odparek látek po procesu derivatizace. Plochy píků 4-AB-HFB jsou v průběhu všech měření poměrně stabilní (Graf 5), což prokazuje, že kolísání ploch píků testovaných analytů souvisí se pouze se zpracováním vzorků a nikoli s chromatografickou analýzou.

5. Závěr

Byl testován zavedený postup stanovení aromatických aminů v moči. Při porovnání komplexně zpracovaných vzorků s hodnotami referenčních vzorků se ukázalo, že některé látky vykazují větší ztráty, než je vysvětlitelné ztrátami při extrakcích. Nejpravděpodobnější příčinou těchto ztrát je proces hydrolýzy. Je tedy potřeba u vybraných, problémových látek podrobně prostudovat jednotlivé kroky celého stanovení a zjistit proč a ve kterém kroku stanovení k takovým ztrátám dochází. To vše bude předmětem dalšího studia.

6. Seznam použité literatury

- 1) Mráz J., Stránský V. - *Biologické monitorování a biologické expoziční testy*, dostupné z URL: <<http://www.szu.cz/tema/pracovni-prostredi/biologicke-monitorovani-a-biologicke-expozicni-testy>> , [cit. 9.4.2012]
- 2) 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*, 4-47, (2001)
- 3) Angerer J., Schaller K. H. - *Analyses of Hazardous Substances in Biological Materials, Volume 4*, Weinheim, Federal Republic of Germany, VCH, Verlagsgesellschaft, (1994)
- 4) Svoboda J. a kolektiv - *Organická chemie I*, Česká republika, Praha, VŠCHT Praha, (2005)
- 5) Klinotová E., Smrček S. - *Přehled organické chemie pro posluchače Klinické a analytické toxikologie (KATA)*, Česká republika, Praha, Karolinum, (1999)
- 6) Trnka T., Klinotová E., Katora M., Sejbál J. - *Organická chemie pro posluchače nechemických oborů*, Česká republika, Praha, Karolinum, (2002)
- 7) Angerer J., Schaller K. H. - *Analyses of Hazardous Substances in Biological Materials, Volume 1*, Federal Republic of Germany, Weinheim VCH, Verlagsgesellschaft, (1985)
- 8) O'Neil M.J. - *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, Meck and Co., Whitehouse Station, (2006)
- 9) Parke D. V. - *The Biochemistry of Foreign Compounds*, Oxford: Pergamon Press, p. 224, (1968)
- 10) IARC - *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*. Geneva: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 1972 - present, S 7, p. 57, (1987), dostupné z URL: <<http://monographs.iarc.fr/index.php>>, [cit. 6. 5. 2012]
- 11) World Health Organization/International Programme on Chemical Safety - *Concise International Chemical Assessment Document No. 7. o-Toluidine*, p. 4, (1998)
- 12) Department of Health & Human Services, Centers for Disease Prevention & Control, National Institute for Occupational Safety & Health - NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards & Other Databases [CD-ROM], DHHS (NIOSH) Publication No. 151, (2005)
- 13) Organization for Economic Cooperation and Development - Screening Information Data Set for *m*-Toluidine (108-44-1), 96 - 97, (2000), dostupné z URL: <<http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECDSEIDS/sidspub.html>>, [cit. 6. 5. 2012]
- 14) American Conference of Governmental Industrial Hygienists TLVs and BEIs. - *Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices*, p. 58, (2010)
- 15) Department of Health & Human Services, Centers for Disease Prevention & Control, National Institute for Occupational Safety & Health - NIOSH Pocket Guide to Chemical

Hazards, DHHS (NIOSH) Publication No. 97 - 140, Government Printing Office, Washington D.C, U.S., (1997)

16) Gosselin R.E., Smith R.P., Hodge H.C - *Clinical Toxicology of Commercial Products*, 5th ed., Baltimore - Williams and Wilkins, (1984)

17) Brorson T., Skarping G., Sangö C. - Biological monitoring of isocyanates and related amines, 2,4- and 2,6-toluenediamine in hydrolysed plasma and urine after test - chamber exposure of humans to 2,4- and 2,6-toluene diisocyanate, *Occupational and Environmental Health*, 63, 253- 259, (1991)

18) Lewis R.J., *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*, 13th ed., John Wiley & Sons, New York, U.S., (1997)

19) dostupné z URL: <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~4E11r1:1:enex>>, [cit. 6.5.2012]

20) U. S. Department of Health & Human Services, Public Health Service, Center for Disease Control & Prevention NIOSH - *NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards & Other Databases*, [CD- ROM], DHHS (NIOSH) Publication No. 145, (2001)

21) Rom W. N. - *Environmental and Occupational Medicine*, 2nd ed., Little, Brown and Company, Boston, (1992)

22) *Journal of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 6, 2001, dostupné z URL: <<http://scialert.net/abstract/?doi=jpt.2011.234.248>>, [cit. 6.5.2012]

23) Karpinsky G., Rosenkranz H.; *Environ mutagen* 2, 1980, dostupné z URL: <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~aE29bS:1:metab>>, [cit. 6.5.2012]

24) dostupné z URL: <<http://chemicalland21.com/specialtychem/NH/2-AMINO-9-FLUORENONE.htm>>, [cit. 6.5.2012]

25) Balarezo A. L., Jones V. N., Yu H., Hwang H. - Influence of Humic Acid on 1-aminopyrene Ecotoxicity During Solar Photolysis Process , *International Journal of Molecular Sciences*, 1133- 1144, (2002)

26) Zhang Y., Hwang H., Ekunwe S. - *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 25;7, (2006), dostupné z URL: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/05-482R.1/abstract>> , [cit 6.5.2012]

27) Lind P., Dalene M., Skarping G., Hagmar L. - Toxicokinetics of 2,4- and 2,6-toluenediamine in hydrolysed urine and plasma after occupational exposure to 2,4- and 2,6-toluene diisocyanate, *Occupational and Environmental Medicine*, 53, 94-99, (1996)

28) Maitre A., Berode M., Perdrix A., Rozmarini S., Savolainen H. - Biological monitoring of occupational exposure to toluene diisocyanates, *Occupational and Environmental Health*, 65,97- 100, (1993)

- 29) Tichý M. - *Toxikologie pro chemiky, Toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativa*, Karolinum Praha, (2003)
- 30) Carbonnelle P., Boukourt S., Lison D., Buchet J. - Determination of Toluenediamines in Urine of Workers Occupationally Exposed to Isocyanates by High - performance Liquid Chromatography, *The Analyst*, Vol. 121, 663 - 669, (1996)
- 31) Sennbro C., Lindh Ch., Tinnerberg H., Gustavsson C., Littorin M., Welinder H., Jöhnson B. - Development, validation and characterization of an analytical method for the quantification of hydrolysable urinary metabolites and plasma protein adducts of 2,4- and 2,6-toluene diisocyanate and 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate, *Biomarkers, Vol. 8, Taylor & Francis health sciences*, 204 - 217, (2003)
- 32) Linhart I., Mráz J., Hanzlíková I., Šilhánová A., Frantík E., Himl M. - Carcinogenic 3-nitrobenzanthrone but not 2-nitrobenzathrone is metabolized to an unusual mercapturic acid in rats, *Toxicol*, 246 - 253, (2012)

