

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Hana Axmannová

CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ
NITROFENYLHYDRAZINŮ A JEJICH HYDRAZONŮ S
DUÁLNÍ AMPEROMETRICKOU DETEKČÍ

Chromatographic Determination of Nitrophenylhydrazines and
Their Hydrazones Using Dual Amperometric Detection

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Hana Dejmková, Ph.D.

Praha 2015

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (projekt P206/12/G151) a také Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (projekt 456214).

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 17. 8. 2015

Ráda bych poděkovala RNDr. Haně Dejmkové Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracovávání mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům z laboratoře 112, kteří vytvořili příjemné a přátelské prostředí. V neposlední řadě musím poděkovat svým rodičům, jelikož bez jejich finanční i psychické podpory bych nemohla studovat vysokou školu.

Klíčová slova

2-Nitrofenylhydrazin
2,4-Dinitrofenylhydrazin
Benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazon
Tenkovrstvá elektroda
Duální detekce
UV spektrofotometrická detekce
HPLC s elektrochemickou detekcí

Key words

2-Nitrophenylhydrazine
2,4-Dinitrophenylhydrazine
Benzaldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone
Thin-layer electrode
Dual detection
UV spectrophotometric detection
HPLC with electrochemical detection

Abstrakt

V této diplomové práci bylo optimalizováno stanovení nitrofenylhydrazinů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí na duální tenkovrstvé elektrodě. K porovnání byla použita spektrofotometrická detekce. Tato metoda byla dále testována ke stanovení hydrazonu vzniklého reakcí 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH) s benzaldehydem jako zástupcem látek obsahujících karbonylovou skupinu.

Optimalizovanými parametry bylo pH vodné složky mobilní fáze a zejména potenciál vkládaný na pracovní elektrody. Z hydrodynamických voltamogramů bylo vybráno prostředí o pH 3 a pracovní potenciály +1,0 V a -1,0 V. Za těchto podmínek byla zkoumána opakovatelnost měření.

Byly také proměřeny koncentrační závislosti, ze kterých byly určeny meze detekce. Mez detekce byla určena z výšky píku jak v anodické, tak v katodické oblasti. Pro 2-nitrofenylhydrazin (2-NPH) byly tyto meze $9,5 \cdot 10^{-8}$ mol/L a $6,2 \cdot 10^{-7}$ mol/L. Pro 2,4-dinitrofenylhydrazin pak $2,1 \cdot 10^{-8}$ mol/L a $1,8 \cdot 10^{-7}$ mol/L.

K výrobě hydrazonu byl použit jen DNPH, který měl lepší odezvu v katodické oblasti, a byl smíchán s benzaldehydem. Bylo zkoumáno elektrochemické chování vzniklého benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazonu v prostředí o pH 3. Z hydrodynamického voltamogramu byl vybrán pracovní potenciál -1,0 V. Dále byla zkoumána kvantitativnost reakce; bylo zjištěno, že ke správnému průběhu reakce je potřeba nejméně dvojnásobné koncentrace DNPH než benzaldehydu.

Abstract

This diploma thesis examines the optimization of the determination of nitrophenylhydrazines using high performance liquid chromatography with electrochemical detection on dual thin-layer electrode. The spectrophotometric detection was used for the comparison. The developed method was also tested for the determination of hydrazone produced by the reaction of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) with benzaldehyde as a member of substances containing carbonyl group.

The conditions for the determination of nitrophenylhydrazines were optimized; based on the hydrodynamic voltammograms, pH 3 of aqueous part of the mobile phase and potentials of +1,0 V and -1,0 V were chosen. Under these conditions, the repeatability was tested.

The concentration dependences were also measured and detection limits were obtained. The detection limits were obtained from the peak heights both in anodic and cathodic potential range. For 2-nitrophenylhydrazine these limits were $9,5 \cdot 10^{-8}$ mol/L for oxidation and $6,2 \cdot 10^{-7}$ mol/L for reduction. For 2,4-dinitrophenylhydrazine the limits were $2,1 \cdot 10^{-8}$ mol/L and $1,8 \cdot 10^{-7}$ mol/L for oxidation and for reduction, respectively.

For the preparation of hydrazone, DNPH was chosen due to its better cathodic response and it was mixed with benzaldehyde. The electrochemical behaviour of benzaldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone was examined in mobile phase with pH 3 of aqueous part. From the hydrodynamic voltammogram, working potential of -1,0 V was selected. The yield of the reaction was examined and it was found that at least double concentration of DNPH than benzaldehyde is needed.

Obsah

Klíčová slova	4
Abstrakt	5
Abstract.....	6
Seznam použitých zkratk	9
1. Teoretická část.....	10
1.1 Cíl práce	10
1.2 Studované látky.....	10
1.3 Stanovení karbonylových sloučenin pomocí derivatizace s DNPH	11
1.4 Tenkovrstvá duální elektroda.....	12
2. Experimentální část	14
2.1 Studovaná látka.....	14
2.2 Použité chemikálie	14
2.3 Použitá aparatura.....	15
2.4 Pracovní postupy.....	16
2.5 Úprava vzorků.....	16
3. Výsledky a diskuze.....	17
3.1 Optimalizace elektrochemické detekce pro stanovení 2-NPH a DNPH.....	17
3.2 Hydrodynamické voltamogramy	17
3.3 Opakovatelnost měření	22
3.4 Kalibrační závislost.....	26
3.4.1 Elektrochemická detekce - oxidace	26
3.4.2 Elektrochemická detekce - redukce.....	29
3.4.3 UV spektrofotometrická detekce	32
3.5 Optimalizace elektrochemické detekce benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazonu.....	35
3.5.1 Hydrodynamický voltamogram benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazonu	36

3.5.2	Výtěžek reakce	37
4.	Závěr.....	40
5.	Použitá literatura.....	41

Seznam použitých zkratek

2-NPH	2-nitrofenylhydrazin
A	absorbance
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
<i>E</i>	potenciál
h	výška píku
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-ED	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
HPLC-UV	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí
HYD	benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazon
I_p	elektrický proud pozadí
λ	vlnová délka
LOD	mez detekce
p.a.	pro analýzu
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
R	korelační koeficient
RSD	relativní směrodatná odchylka
S	směrodatná odchylka
<i>t</i>	čas

1. Teoretická část

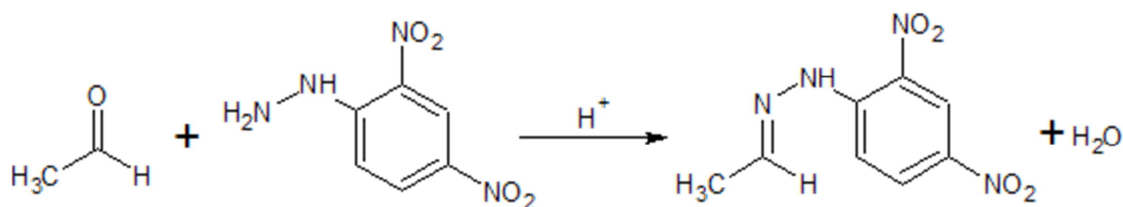
1.1 Cíl práce

Tato diplomová práce se zabývá nalezením optimálních podmínek ke stanovení vybraných nitrofenylhydrazinů (2-nitrofenylhydrazin a 2,4-dinitrofenylhydrazin) a následně i benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazonu pomocí HPLC s elektrochemickou duální detekcí a spektrofotometrickou detekcí v UV oblasti.

1.2 Studované látky

Ke stanovení karbonylových sloučenin je možné s výhodou využít reakce s 2,4-dinitrofenylhydrazinem. Bradyho činidlo, jak se také 2,4-dinitrofenylhydrazinu říká, reaguje s karbonylovou skupinou za vzniku žlutých, oranžových či červených dinitrofenylhydrazonů. V případě aromatické karbonylové sloučeniny vzniká červené zabarvení, oproti tomu alifatická karbonylová sloučenina dá vzniknout spíše nažloutlému produktu. Velkou výhodou této reakce je relativně velká molární hmotnost hydrazinu, která umožňuje vznik rozumného množství příslušného derivátu z malého množství aldehydu či ketonu. Ostatní sloučeniny obsahující karbonylovou skupinu, jako jsou například karboxylové kyseliny, amidy a estery, s Bradyho činidlem nereagují. [1,2]

Tuto důkazovou reakci můžeme chápat jako reakci kondenzační, kdy zároveň dochází ke spojení dvou molekul a k odštěpení vody nebo také jako nukleofilní adici aminoskupiny na karbonylovou skupinu následovanou odštěpením vody. Schéma reakce acetaldehydu s 2,4-dinitrofenylhydrazinem je zobrazeno na obr. 1. [1,3]



Obr. 1

Schéma reakce acetaldehydu s 2,4-dinitrofenylhydrazinem.

1.3 Stanovení karbonylových sloučenin pomocí derivatizace s DNPH

Kromě stabilizace labilních látek se derivatizací převádějí zvolené látky na sloučeniny s výhodnějšími vlastnostmi, například elektroinaktivní látky na sloučeniny, které lze elektrochemicky oxidovat nebo redukovat, či bezbarvé látky na látky, které absorbují světlo ve viditelné oblasti. [4]

Analyty derivatizované s použitím 2,4-dinitrofenylhydrazinu jsou nejčastěji separovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a dále detekovány elektrochemicky [5], spektrofotometricky [6,7], nebo pomocí ultrafialové spektrometrie [3,8,9]. V některých případech však separace není nutná a využívá se jen spektrofotometrické detekce [1,10].

Karbonylové sloučeniny patří k nejintenzivněji sledovaným látkám, proto se stanovují v různých matricích od vzduchu a vzduchových částic [11,12], cigaretového kouře [8,13] přes pivo [14] až k bazénové vodě [7].

V případě stanovení karbonylových sloučenin generovaných E-cigaretami byly k derivatizaci cigaretového kouře použity křemenné patrony plněné hydrochinonem a 2,4-dinitrofenylhydrazinem. Vzniklé hydrazony byly separovány pomocí HPLC a detekovány ultrafialovou spektroskopií. [8] Jiná skupina autorů použila ke stanovení karbonylových sloučenin v cigaretovém kouři ultravysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (UHPLC) ve spojení s hmotnostním detektorem, který na rozdíl od ultrafialového spektrometru zlepšuje selektivitu a sensitivitu a k tomu i zrychluje dobu analýzy. [13]

Metoda, při které bylo využito kombinace HPLC s elektrochemickou detekcí, byla zaměřena na stanovení aldehydů a ketonů v palivovém etanolu. Derivatizované karbonylové sloučeniny byly separované na koloně Shimadzu Shim-pack C18 (150 x 6 mm, vnitřní průměr částic 5 μm) a detekovány Varian ProStar 370 elektrochemickým detektorem ve wall-jet uspořádání s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku, operující při potenciálu +1,0 V, referentní argentchloridovou elektrodou a platinovým drátem jako pomocnou elektrodou. Mobilní fáze byla směs metanol:LiCrO₄ ($1 \cdot 10^{-3}$ mol/L) v poměru 80:20 (V/V). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1,1 ml/min.[5]

1.4 Tenkovrstvá duální elektroda

Existují tři nejběžnější typy uspořádání cel s tuhými elektrodami, které se liší umístěním pracovní elektrody vzhledem k toku mobilní fáze. Tenkovrstvá elektroda je jedním takovým typem; pracovní elektroda je zde umístěna rovnoběžně s tokem mobilní fáze. Dalšími typy jsou pak wall-jet, kdy je pracovní elektroda umístěna kolmo na tok a tubulární uspořádání, kdy tok mobilní fáze protéká trubicí, která obsahuje pracovní elektrodu. [15]

Tenkovrstvý detektor bývá složen ze dvou kusů, které jsou k sobě pevně přitisknuty, mezi nimi je jen tenká distanční fólie. Hlavními částmi jsou oddíly pro pracovní, referentní a pomocnou elektrodu a vstupní a výstupní otvory pro mobilní fázi. [16]

Klasické uspořádání tenkovrstvého elektrochemického detektoru založeno na práci Kissingera [17] má nevýhodu ve velké vzdálenosti mezi pracovní elektrodou a oddělením obsahující referentní a pomocnou elektrodu. Z tohoto důvodu je vhodnějším uspořádáním cela navržená Štulíkem [18]. Při porovnávání těchto dvou uspořádání bylo zjištěno, že elektrický odpor mezi pracovní a pomocnou elektrodou je nižší v druhém případě, tedy kdy jsou si tyto elektrody blíže. [19]

V této práci byla použita elektrochemická cela, kde dolní díl obsahoval pracovní elektrody ze skelného uhlíku zapuštěné do bloku z polyetherketonu, které byly umístěny 2 mm od vstupního otvoru. Kromě skelného uhlíku může být pracovní elektroda i z jiného materiálu, např. zlata, niklu, platiny, mědi nebo stříbrného amalgámu. Horní díl pak obsahoval oddělení pro referentní a pomocnou elektrodu. [20]

Ve speciálních případech je možné použít více pracovních elektrod na jeden elektrodový blok, například dvě nebo čtyři elektrody. Použitím vícenásobné elektrody je možné optimalizovat detekci více analytů. [16,20]

První duální voltametrický detektor byl popsán v roce 1976 [21]. Velkou výhodou tohoto detektoru je zlepšení selektivity detekce a také snadnější identifikace analytů, často také dojde ke zlepšení meze detekce. [22]

Dvě pracovní elektrody v tenkovrstvém uspořádání je možné zapojit třemi způsoby: vedle sebe, za sebou a proti sobě. Uspořádání vedle sebe umožňuje odlišit analyty, jejichž zóny nejsou dostatečně odděleny, pokud elektrodová reakce každého

analytu probíhá při jiném potenciálu. Někdy lze zlepšit poměr signálu k šumu, pokud se tento systém použije pro diferenční měření, kdy studovaná látka vede podél jedné elektrody a čistá nosná kapalina podél elektrody druhé [23].

Uspořádání za sebou má tři hlavní důvody. Prvním důvodem k takovému uspořádání je sledování reverzibilního analytu, který podstupuje elektrodovou reakci při vysokém potenciálu, kde je také zvýšen zbytkový proud a šum. Takovéto látky mohou konvertovat na první elektrodě při daném vysokém potenciálu a poté rekonvertovat na druhé elektrodě při nižším potenciálu, kde je příznivý poměr signálu k šumu [24]. Druhý důvod k uspořádání za sebou je možnost použít první elektrodu jako filtr, který odstraní interferenty, čímž se usnadní jak úprava vzorku, tak i jeho následná identifikace a stanovení. Toto použití je umožněno z toho důvodu, že na elektrodě umístěné po proudu lze elektrochemicky rekonvertovat jen systémy s rychlými elektrodovými reakcemi, tím pádem je signál na této elektrodě jednodušší než signál na první elektrodě. Třetí možností je pak použití stejného potenciálu na obou elektrodách k dosažení úplné konverze analytu na první elektrodě, druhou elektrodou pak prochází pouze zbytkový proud. Tohoto uspořádání se využívá hlavně při použití gradientové eluce v HPLC, protože tak může být potlačen posun základní linie [25]. Efektivní fungování uspořádání za sebou vyžaduje vysoký stupeň konverze analytu na první elektrodě a vysokou sběrnou účinnost na druhé elektrodě, toho lze dosáhnout kombinací velké první elektrody s menší druhou elektrodou. Tyto cely mohou mít ale moc velké objemy, které omezují použitelnost například ve spojení s HPLC.

Uspořádání dvou pracovních elektrod proti sobě umožňuje zesílit signál detektoru u reverzibilních systémů pomocí vícenásobné reoxidace a reredukce látky během průchodu mezi elektrodami. Aby byl vliv zesílení pozorovatelný, musí být elektrody velké, cela tenká a průtok kapaliny malý. [26]

2. Experimentální část

2.1 Studovaná látka

C.A.S. název: 2-Nitrofenylhydrazin

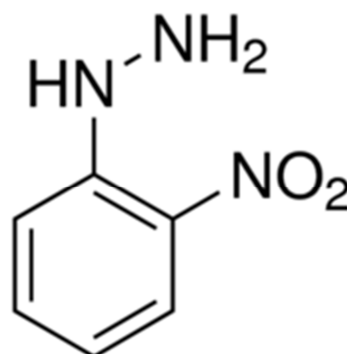
C.A.S. číslo: 3034-19-3

Sumární vzorec: $C_6H_7N_3O_2$

Molární hmotnost: 153,14 g/mol

Bod tání: 91 - 93 °C

Zkratka: 2-NPH



C.A.S. název: 2,4-Dinitrofenylhydrazin

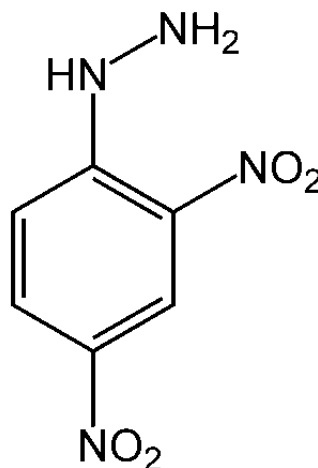
C.A.S. číslo: 119-26-6

Sumární vzorec: $C_6H_6N_4O_4$

Molární hmotnost: 198,14 g/mol

Bod tání: 197 - 200 °C

Zkratka: DNPH



2.2 Použité chemikálie

Zásobní roztoky 2-nitrofenylhydrazinu a 2,4-dinitrofenylhydrazinu (obě Sigma-Aldrich) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l byly připraveny rozpuštěním přesně odváženého množství látky v metanolu. Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány pipetováním přesného objemu zásobního roztoku a jeho následného ředění mobilní fází. Roztok 3mmol/L DNPH byl připraven rozpuštěním potřebného množství látky v acetonitrilu. Zásobní roztoky byly uchovány v chladu a temnu.

Benzaldehyd (Sigma-Aldrich) potřebný k výrobě benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazonu byl naředěn acetonitrilem na koncentraci 1,5 mmol/L.

Acetáto-fosfátový pufr byl připraven smícháním dvou základních složek, složky kyselá se zásaditou. Zásaditou složku tvořil vodný roztok hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika) o koncentraci 0,2 mol/L. Druhým základním roztokem byla kyselá složka připravená smícháním kyseliny octové (99%, p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika) s kyselinou fosforečnou (85%, p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika), každá o koncentraci 0,04 mol/L.

K přípravě mobilní fáze byl použit methanol (LiChrosolv® Gradient grade, Merck, Německo), k přípravě vodných roztoků byla použita destilovaná voda (Millipore Q-plus Systém, Millipore, USA).

2.3 Použitá aparatura

Ke stanovení metodou RP-HPLC byla použita sestava, ve které byla k pohánění mobilní fáze do systému použita gradientová pumpa Beta 10 (Ecom, Praha, Česká republika) a k odplynění mobilní fáze byl použit degasser DG 4014 (Ecom, Česká republika). Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1 ml/min. Dávkování probíhalo pomocí dávkovače se smyčkou o objemu 20 μ l (Ecom, Česká republika). Stanovení probíhalo na koloně Kromasil C18, 150 mm x 4,6 mm s částicemi o průměru 7 μ m (Ecom, Česká republika), chráněno předkolumnou C18, 4x3 mm (Phenomenex, USA). Analyt byl detekován jak UV-VIS spektrofotometrickým detektorem Sapphire 880 (Ecom, Česká republika), tak elektrochemickým detektorem CHI 802B (CH Instruments, Austin TX, USA). Cella amperometrického detektoru byla zapojena sériově za UV detektor a pracovala v tříelektrodovém zapojení; pracovní elektrody MF-1000 byly ze skelného uhlíku a jako referentní elektroda byla použita argentchloridová elektroda RE-4 s 3 mol/L NaCl (vše BASi, USA). Data byla sbírána programem Clarity Chromatography Station (DataApex, Praha, Česká republika) a programem CHI 14.05 (CH Instruments, Austin TX, USA) pracujícím v prostředí Windows XP (Microsoft, USA).

Hodnoty pH byly kontrolovány na digitálním pH-metru (Jenway, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (PCH 2411).

2.4 Pracovní postupy

Mobilní fáze byla připravena smísením příslušných objemů methanolu a acetát-fosfátového pufru. Uvedené hodnoty pH mobilní fáze se vždy vztahují k hodnotě pH pufru.

Během optimalizace měření byl používán roztok směsi 2-NPH a DNPH o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l každé složky.

Kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Hodnoty výšek píků byly vypočítány jako průměrná hodnota ze tří měření. Meze detekce (LOD) byly určeny jako množství analytu poskytující signál odpovídající trojnásobku absolutní hodnoty šumu základní linie.

2.5 Úprava vzorků

Všechny vzorky pro stanovení 2-NPH a DNPH byly připravovány pipetováním přesně stanoveného objemu obou analytů do 10ml odměrné baňky a doplněny mobilní fází po rysku. Takto připravené vzorky byly nejméně 5 minut probublávány dusíkem k odstranění kyslíku z roztoku.

Vzorky ke stanovení benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazonu byly připraveny smícháním 1,5mmol/L roztoku benzaldehydu s 3mmol/L roztokem DNPH v potřebném poměru a byly ponechány nejméně 30 minut v temnu při pokojové teplotě, aby došlo k řádnému zreagování.

3. Výsledky a diskuze

3.1 Optimalizace elektrochemické detekce pro stanovení 2-NPH a DNPH

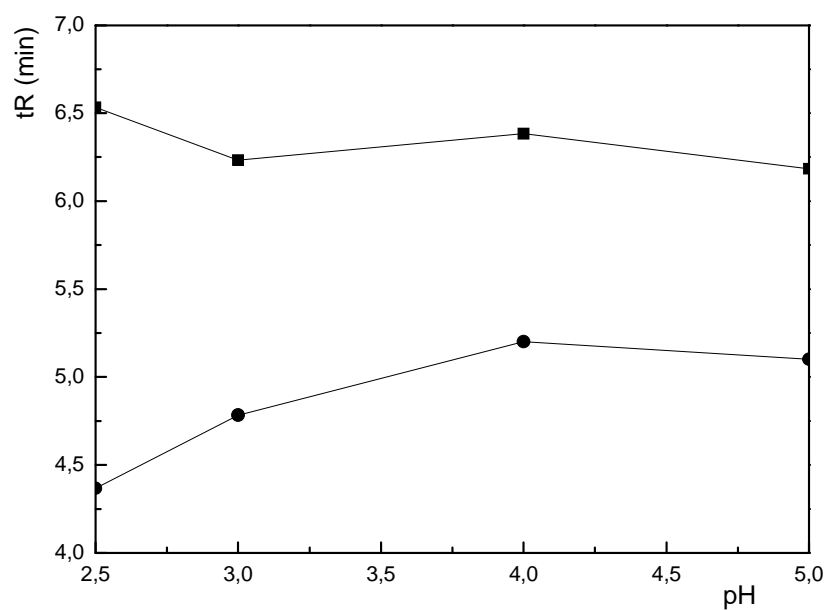
První částí práce bylo studium vlivu podmínek stanovení na chromatografické i elektrochemické chování 2-NPH a DNPH. Sledovanými parametry byly hodnota pH vodné složky mobilní fáze, poměr složek mobilní fáze a potenciály vkládané na pracovní elektrody.

3.2 Hydrodynamické voltamogramy

K určení optimálního potenciálu vkládaného na pracovní elektrody byly proměřeny hydrodynamické voltamogramy, tzn. závislost výšky píku na potenciálu vloženém na pracovní elektrodu. Měření hydrodynamických voltamogramů v anodické oblasti potenciálů probíhala v mobilní fázi složené z pufru o pH 3, 5 a 7 a methanolu v poměru 50:50 (V/V) pro potenciály v rozsahu od 0,3 V do 1,2 V s krokem po 0,1 V. Pro katodické potenciály od -0,7 V do -1,2 V byla použita mobilní fáze složená z pufru o pH 2,5, 3, 4 a 5 a methanolu v poměru 60:40 (V/V). Při aplikaci záporných potenciálů dochází k redukci kyslíku, který je i přes probublávání dusíkem obsažen v mobilní fázi i vzorku, proto bylo důležité najít podmínky, kdy byl pík kyslíku dostatečně oddělený od píků analytů a současně kdy bylo proudové pozadí nejnižší.

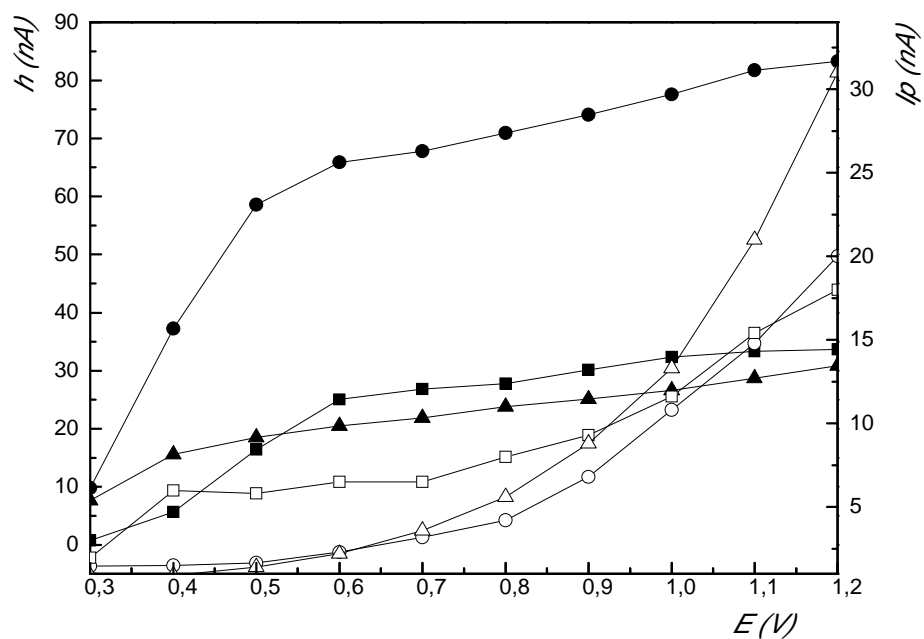
Závislost retenčních časů obou analytů na pH je znázorněna na obr. 2. Je patrné, že zatímco retenční čas DNPH je při všech zmíněných hodnotách pH víceméně neměnný, tak retenční čas 2-NPH se v kyselější oblasti zkracuje. Jako optimální pH bylo zvoleno pH 3 a jako vhodné potenciály +1,0 V a -1,0 V, při kterých byly píky obou látek nejvyšší.

Hydrodynamické voltamogramy získané vyhodnocením výšek píků jednotlivých látek při různých hodnotách pH jsou znázorněny na obr. 3 a obr. 5 pro 2-NPH, pro DNPH pak na obr. 4 a obr. 6.



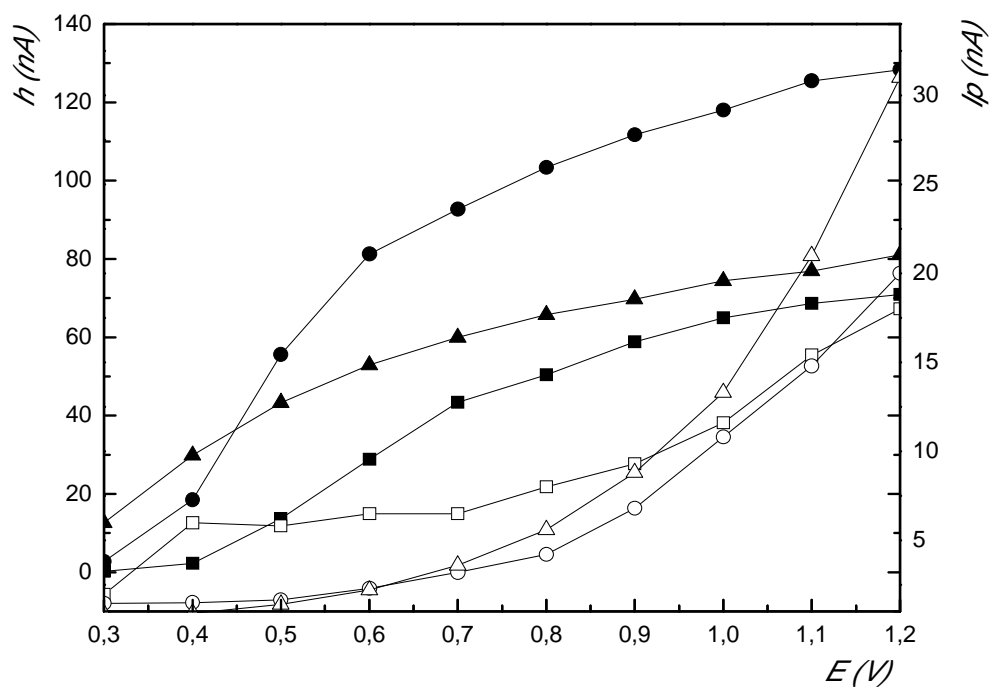
Obr. 2

Závislost retenčních časů 2-NPH (●) a DNPH (■) na pH. Měřeno metodou HPLC-ED, kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl , koncentrace obou složek $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Mobilní fáze methanol:acetáto-fosfátový pufr (40:60 V/V), průtok mobilní fáze 1 ml/min.



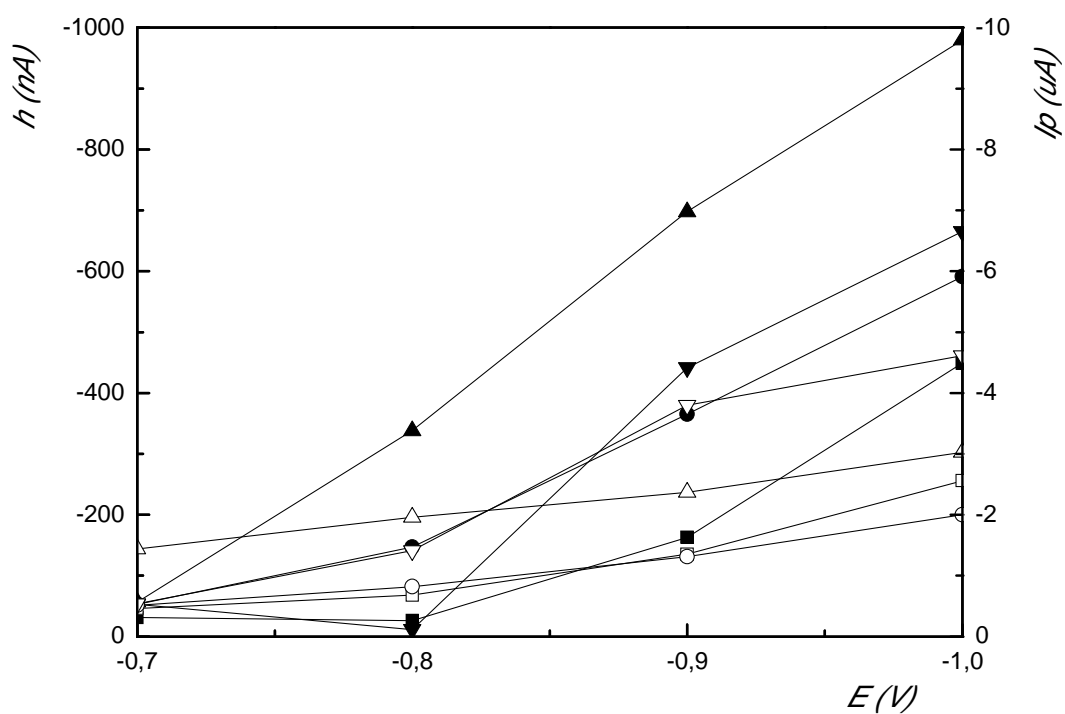
Obr. 3

Hydrodynamické voltamogramy pro 2-NPH při pH 3(■), 5(●) a 7(▲), proud pozadí při pH 3(□), 5(○), a 7 (△). Měřeno metodou HPLC-ED, kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl , koncentrace 2-NPH $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Mobilní fáze methanol:acetáto-fosfátový pufr (50:50 V/V), průtok mobilní fáze 1 ml/min.



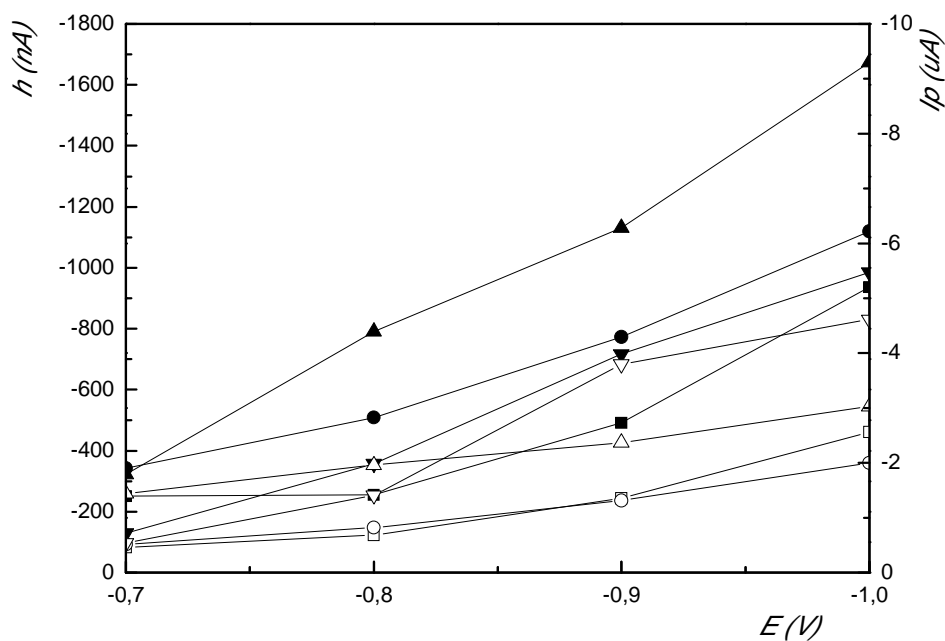
Obr. 4

Hydrodynamické voltamogramy pro DNPH při pH 3 (■), 5 (●) a 7 (▲), proud pozadí při pH 3 (□), 5 (○), a 7 (△). Měřeno metodou HPLC-ED, kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl , koncentrace DNPH $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Mobilní fáze methanol:acetáto-fosfátový pufr (50:50 V/V), průtok mobilní fáze 1 ml/min.



Obr. 5

Hydrodynamické voltamogramy pro 2-NPH při pH 2,5(\blacksquare), 3(\bullet), 4(\blacktriangle), a 5(\blacktriangledown), proud pozadí při pH 2,5(\square), 3(\circ), 4 (\triangle) a 5 (\triangledown). Měřeno metodou HPLC-ED, kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l, koncentrace 2-NPH $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Mobilní fáze methanol:acetáto-fosfátový pufr (40:60 V/V), průtok mobilní fáze 1 ml/min.



Obr. 6

Hydrodynamické voltamogramy pro DNPH při pH 2,5(■), 3(●), 4(▲), a 5(▼), proud pozadí při pH 2,5(□), 3(○), 4 (Δ) a 5 (▽). Měřeno metodou HPLC-ED, kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl , koncentrace DNPH $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Mobilní fáze methanol:acetáto-fosfátový pufr (50:50 V/V), průtok mobilní fáze 1 ml/min.

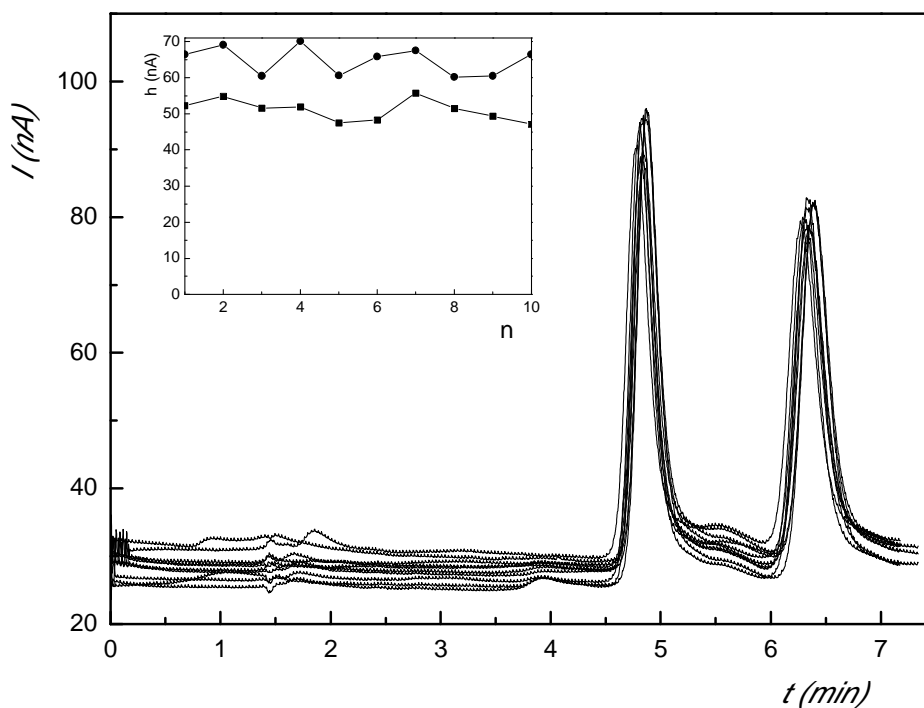
3.3 Opakovatelnost měření

Za optimálních podmínek stanovení, tedy v mobilní fázi složené z methanolu a acetáto-fosfátového pufru o pH 3 (40:60, V/V) a detekčních potenciálech +1,0 V a -1,0 V byla studována opakovatelnost měření. Detekce probíhala současně na obou elektrodách, je tedy možné při jednom měření získat anodickou i katodickou odezvu.

Sady deseti chromatogramů spolu se závislostí výšky píku 2-NPH a DNPH na počtu měření jsou zobrazeny na obr. 7 a obr. 8. Série deseti měření byla také sledována UV detektorem při vlnové délce 270 nm, tato série je zobrazena na obr. 9. Relativní

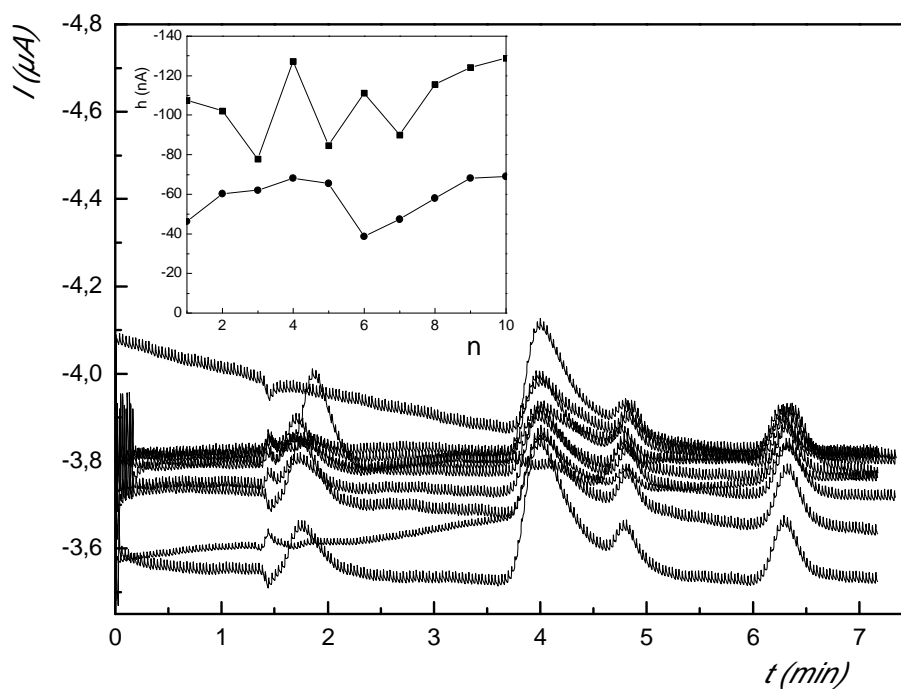
směrodatné odchyly (RSD) jak pro elektrochemickou, tak i UV detekci jsou zobrazeny v tab. 1.

Z těchto relativních směrodatných odchylek je patrné, že nejpřesnější je měření s použitím UV detektoru, trochu horší přesnosti bylo dosaženo při měření v anodické oblasti. Nejhorší opakovatelnosti bylo dosaženo s použitím elektrochemické detekce v katodické oblasti, tam RSD dosahovaly až k 16,5 % v případě DNPH a 17,4 % pro 2-NPH. Tyto vysoké relativní směrodatné odchyly byly pravděpodobně způsobeny kyslíkem, který ovlivnil šum měření a tím pádem i znesnadnil vyhodnocování.



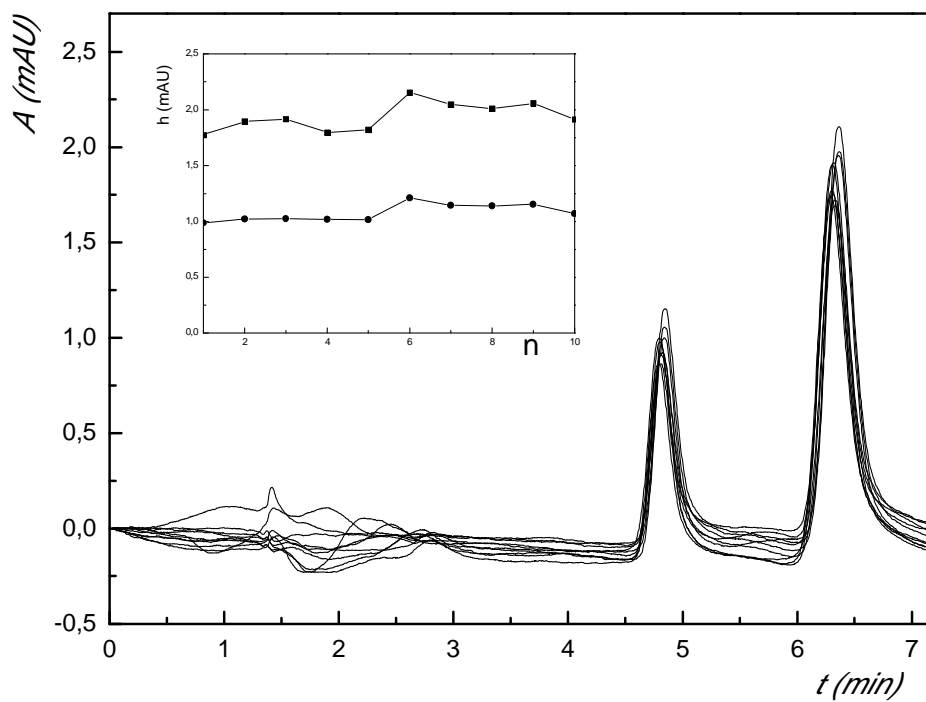
Obr. 7

Série deseti chromatogramů. Měřeno metodou HPLC-ED při potenciálu +1,0 V. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl , koncentrace obou složek $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Mobilní fáze methanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 (40:60 V/V), průtok mobilní fáze 1 ml/min. Vložený graf: Závislost výšky píku 2-NPH (●) a DNPH (■) na počtu měření.



Obr. 8

Série deseti chromatogramů. Měřeno metodou HPLC-ED při potenciálu -1,0 V. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl , koncentrace obou složek $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Mobilní fáze methanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 (40:60 V/V), průtok mobilní fáze 1 ml/min. Vložený graf: Závislost výšky píku 2-NPH (●) a DNPH (■) na počtu měření.



Obr. 9

Série deseti chromatogramů. Měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 270 nm. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl , koncentrace obou složek $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Mobilní fáze methanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 (40:60 V/V), průtok mobilní fáze 1 ml/min. Vložený graf: Závislost výšky píku 2-NPH (●) a DNPH (■) na počtu měření.

Tab. 1

Parametry opakovatelnosti měření 2-NPH a DNPH, měřeno metodou HPLC-ED a HPLC-UV při optimálních podmínkách (n=10).

	Analyt	Medián (nA)	Rozpětí (nA)	S (nA)	RSD (%)
Oxidace	2-NPH	66,14	9,86	3,89	5,9
	DNPH	51,58	8,64	2,93	5,7
Redukce	2-NPH	61,25	30,27	10,65	17,4
	DNPH	109,40	51,03	18,05	16,5

	Analyt	Medián (mAU)	Rozpětí (mAU)	S (mAU)	RSD (%)
UV detekce	2-NPH	1,04	0,05	0,02	1,5
	DNPH	1,92	0,14	0,05	2,5

3.4 Kalibrační závislost

Kalibrační závislosti byly měřeny metodou HPLC s elektrochemickou detekcí, pro porovnání byla vedle elektrochemické detekce použita i UV spektrofotometrická detekce při vlnové délce 270 nm. Za optimálních podmínek, tedy pH 3 mobilní fáze a detekčních potenciálech měření +1,0 V a -1,0 V, byly zjištěny meze detekce (LOD) pro obě látky, tedy 2-NPH a DNPH. Byla použita mobilní fáze ve složení metanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 v poměru 40:60 (V/V), aby se odstranil překryv píku kyslíku s píkem 2-NPH.

3.4.1 Elektrochemická detekce - oxidace

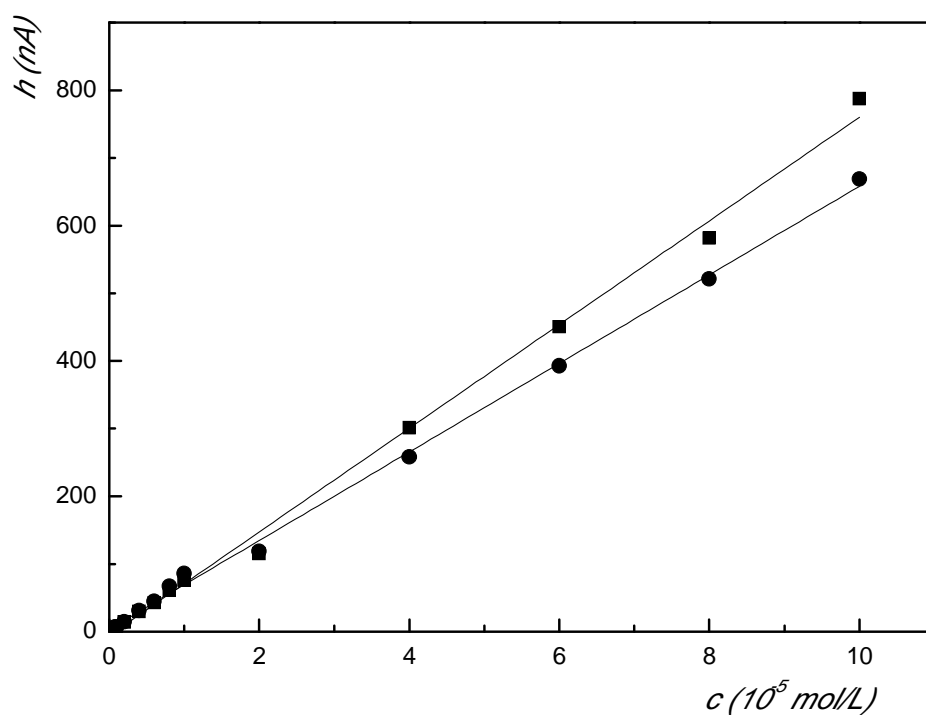
Kalibrační závislosti 2-NPH a DNPH v anodické oblasti byly naměřeny v rozsahu koncentrací $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Parametry jednotlivých kalibračních křivek

získané vyhodnocením výšek píků z naměřených chromatogramů jsou uvedeny v tab. 2. Kalibrační závislosti jsou lineární v celém rozsahu měření, jak pro 2-NPH, tak pro DNPH. Závislosti výšky píků na koncentraci analytů jsou znázorněny na obr. 10. Naměřené chromatogramy jsou znázorněny na obr. 11. Z kalibračních závislostí byly vypočítány meze detekce; pro 2-NPH byla $9,5 \cdot 10^{-8}$ mol/L a pro DNPH byla $2,1 \cdot 10^{-8}$ mol/L.

Tab. 2

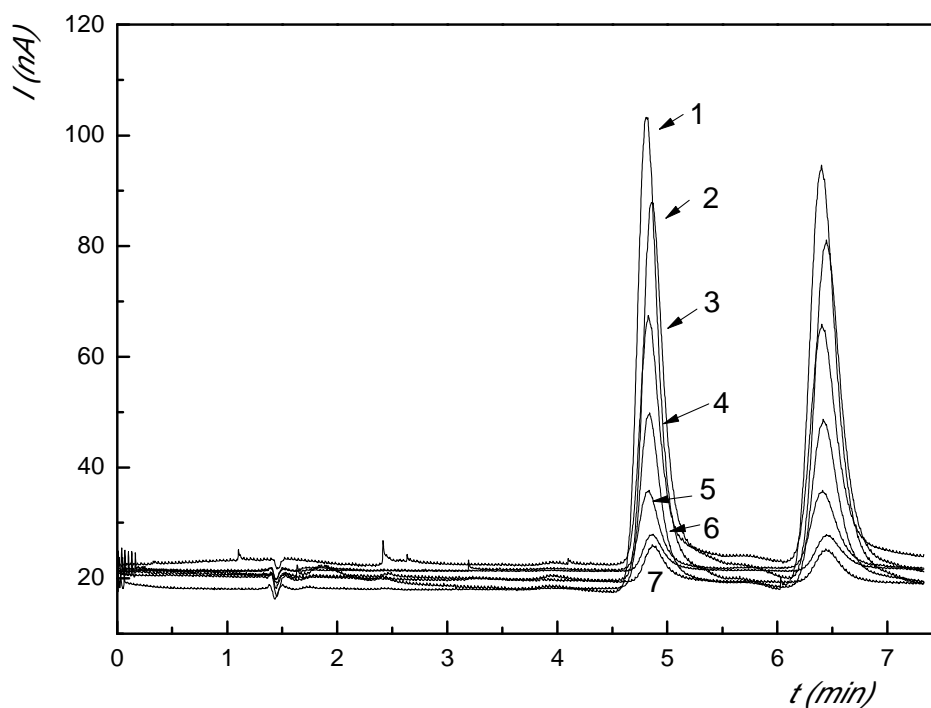
Parametry kalibrační závislosti 2-NPH a DNPH, měřeno metodou HPLC-ED při potenciálu +1,0 V. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl , mobilní fáze o pH 3, průtok mobilní fáze 1 ml/min.

analyt	Směrnice mA·L/mol	Úsek nA	R²	LOD mol/L
2-NPH	6,55	3,62	0,9984	$9,5 \cdot 10^{-8}$
DNPH	7,66	-5,99	0,9966	$2,1 \cdot 10^{-8}$



Obr. 10

Kalibrační křivky 2-NPH (●) a DNPH (■) vyhodnocené z výšek píků v rozmezí koncentrací $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$, měřeno metodou HPLC-ED při potenciálu +1,0 V. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl , mobilní fáze methanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 (40:60 V/V), průtok mobilní fáze 1 ml/min.



Obr. 11

Vybrané chromatogramy 2-NPH a DNPH o koncentracích $1 \cdot 10^{-5}$ (1), $8 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $4 \cdot 10^{-6}$ (4), $2 \cdot 10^{-6}$ (5), $1 \cdot 10^{-6}$ (6) a $8 \cdot 10^{-7}$ (7) mol/L, měřeno metodou HPLC-ED při potenciálu +1,0 V. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl , mobilní fáze methanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 (40:60 V/V), průtok mobilní fáze 1 ml/min.

3.4.2 Elektrochemická detekce - redukce

Kalibrační závislosti 2-NPH a DNPH za použití elektrochemické detekce byly naměřeny v rozsahu koncentrací $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L.

U redukce je patrný pík kyslíku v čase 4 minuty, a to i přes snahu o jeho vytěsnění jak z mobilní fáze, tak ze vzorku. Tento pík navíc znesnadňuje vyhodnocení píku 2-NPH, který se nachází v jeho blízkosti. Přítomnost kyslíku v mobilní fázi rovněž patrně zapříčiňuje velký a proměnlivý proud pozadí a s ním spojený šum.

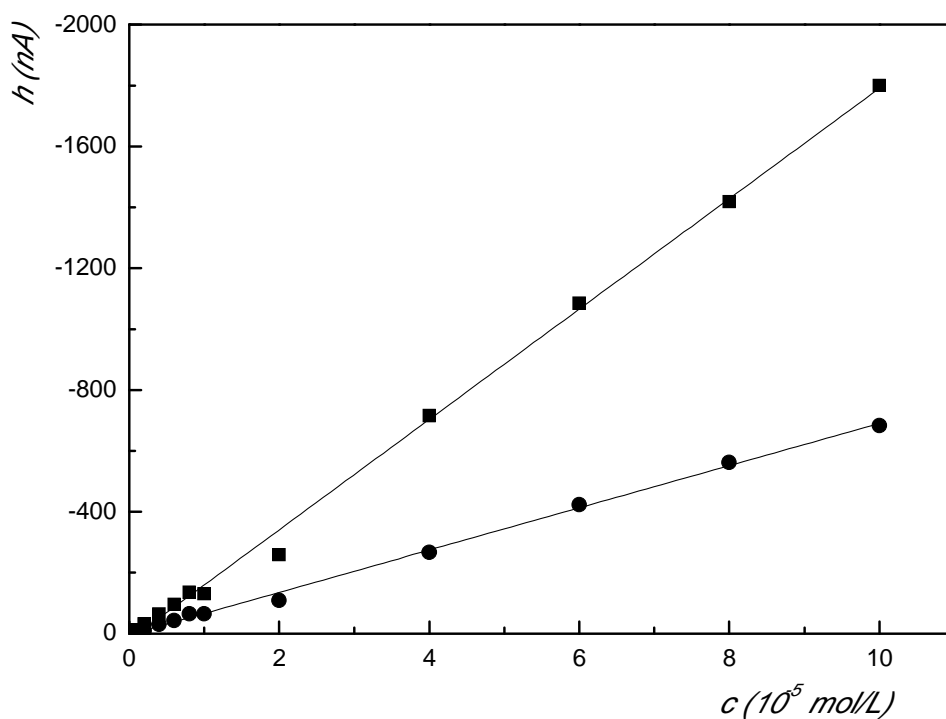
Parametry jednotlivých kalibračních křivek získané vyhodnocením výšek píků z naměřených chromatogramů jsou uvedeny v tab. 3. Kalibrační závislosti jsou lineární v celém rozsahu měření, jak pro 2-NPH, tak pro DNPH. Závislosti výšky píků na koncentraci analytů jsou znázorněny na obr. 12. Naměřené chromatogramy jsou znázorněny na obr. 13. Z kalibračních závislostí byly vypočítány meze detekce; pro 2-NPH byla $6,2 \cdot 10^{-7}$ mol/L a pro DNPH byla $1,8 \cdot 10^{-7}$ mol/L.

Z kalibračních závislostí jasně vyplývá, že při stanovení samotných derivátů hydrazinu je detekce za použití pracovního potenciálu +1,0 V vhodnější než použití pracovního potenciálu -1,0 V, protože při oxidacích bylo dosaženo lepších mezí detekce pro obě látky.

Tab. 3

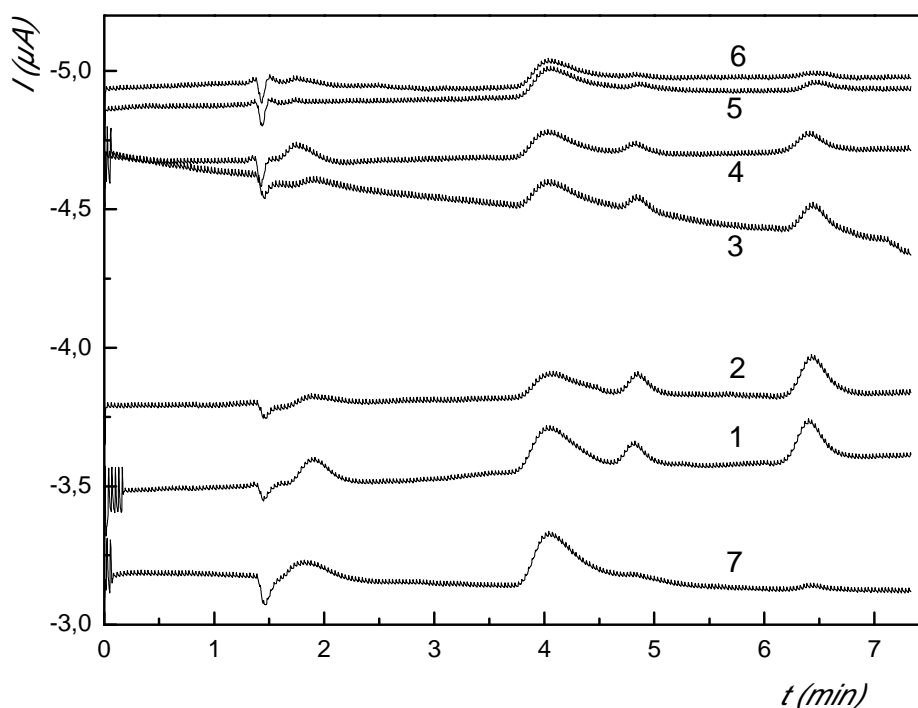
Parametry kalibrační závislosti 2-NPH a DNPH, měřeno metodou HPLC-ED při potenciálu -1,0 V. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl , mobilní fáze methanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 (40:60 V/V), průtok mobilní fáze 1 ml/min.

Analyt	Směrnice mA·L/mol	Úsek nA	R²	LOD mol/L
2-NPH	6,93	-3,09	0,9981	$6,2 \cdot 10^{-7}$
DNPH	18,13	-21,76	0,9978	$1,8 \cdot 10^{-7}$



Obr. 12

Kalibrační křivky 2-NPH (●) a DNPH (■) vyhodnocené z výšek píků v rozmezí koncentrací $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L, měřeno metodou HPLC-ED při potenciálu -1,0 V. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l, mobilní fáze methanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 (40:60 V/V), průtok mobilní fáze 1 ml/min.



Obr. 13

Vybrané chromatogramy 2-NPH a DNPH o koncentracích $1 \cdot 10^{-5}$ (1), $8 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $4 \cdot 10^{-6}$ (4), $2 \cdot 10^{-6}$ (5), $1 \cdot 10^{-6}$ (6) a $8 \cdot 10^{-7}$ (7) mol/L, měřeno metodou HPLC-ED při potenciálu -1,0 V. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl , mobilní fáze methanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 (40:60 V/V), průtok mobilní fáze 1 ml/min.

3.4.3 UV spektrofotometrická detekce

Kalibrační závislosti 2-NPH a DNPH za použití UV detekce byly naměřeny v rozsahu koncentrací obou látek $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol/L za nalezených optimálních podmínek, tedy pH 3 mobilní fáze. Tento UV detektor byl zapojen sériově před elektrochemický detektor, detekce probíhala při vlnové délce 270 nm.

Parametry kalibračních křivek pro oba analyty získané vyhodnocením výšek píků naměřených chromatogramů jsou uvedeny v tab. 4. Kalibrační závislosti jsou lineární v celém rozsahu měření. Závislosti výšky píků na koncentraci analytů

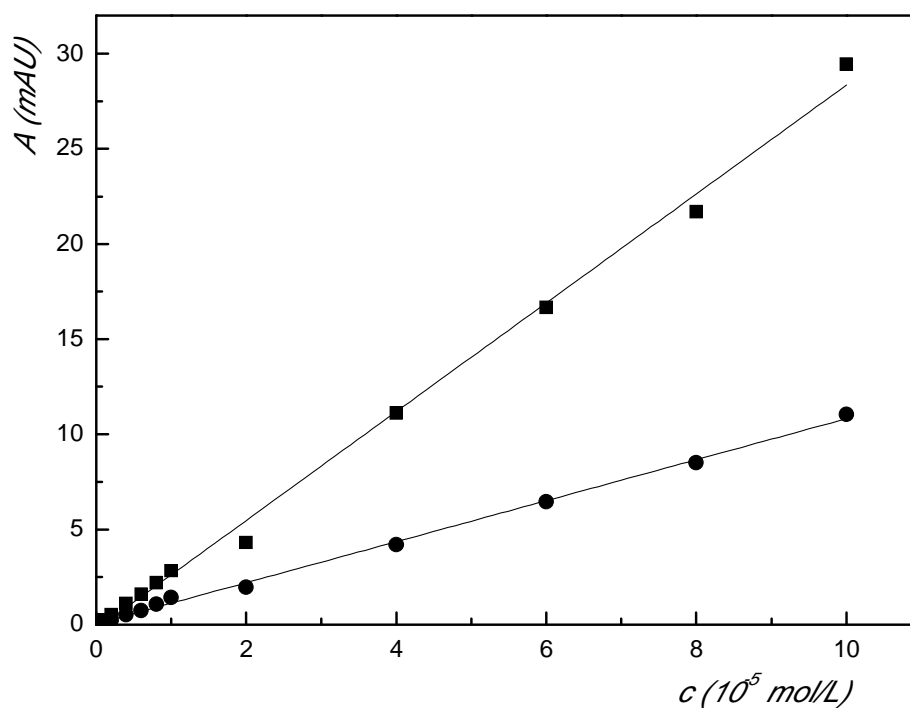
v nejnižším řádu koncentrací jsou znázorněny na obr. 14. Série chromatogramů je znázorněna na obr. 15.

Mez detekce pro 2-NPH byla $1,5 \cdot 10^{-7}$ mol/L a pro DNPH byla $6,1 \cdot 10^{-8}$ mol/L, jsou tedy vyšší než u elektrochemické detekce v anodické oblasti, ale nižší než v katodické oblasti.

Tab. 4

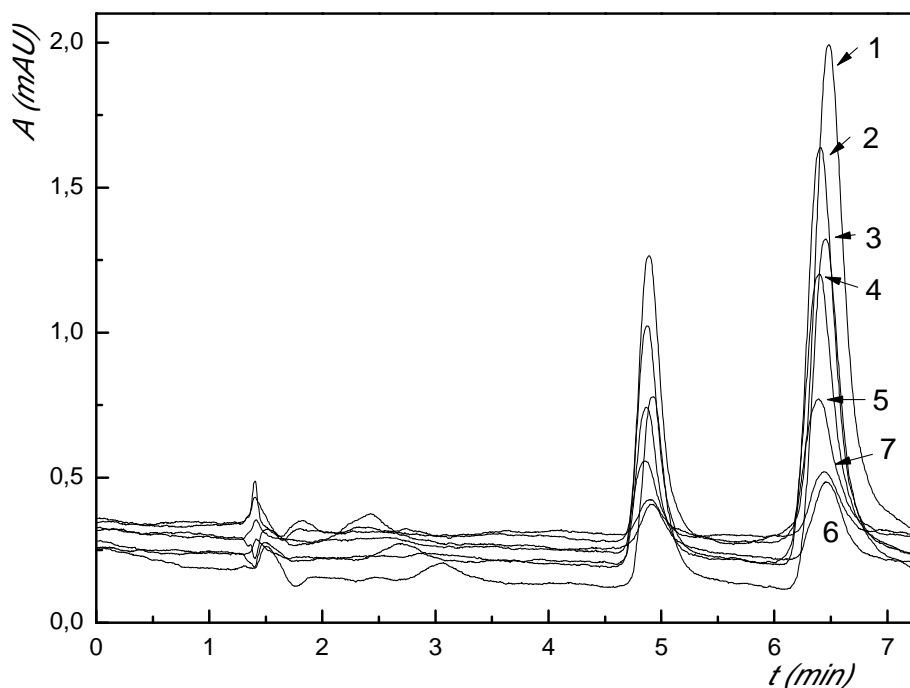
Parametry kalibračních závislostí 2-NPH a DNPH, měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 270 nm. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl , mobilní fáze methanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 (40:60 V/V), průtok mobilní fáze 1 ml/min.

Analyt	Směrnice AU·L/mol	Úsek mAU	R²	LOD mol/L
2-NPH	108	0,048	0,9981	$1,5 \cdot 10^{-7}$
DNPH	286	-0,248	0,9965	$6,1 \cdot 10^{-8}$



Obr. 14

Kalibrační závislosti 2-NPH (●) a DNPH (■) vyhodnocené z výšek píků v rozmezí koncentrací $8 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 270 nm. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l, mobilní fáze methanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 (40:60 V/V), průtok mobilní fáze 1 ml/min.



Obr. 15

Vybrané chromatogramy 2-NPH a DNPH o koncentracích $1 \cdot 10^{-5}$ (1), $8 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $4 \cdot 10^{-6}$ (4), $2 \cdot 10^{-6}$ (5), $1 \cdot 10^{-6}$ (6) a $8 \cdot 10^{-7}$ (7) mol/L, měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 270 nm. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl , mobilní fáze methanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 (40:60 V/V), průtok mobilní fáze 1 ml/min.

3.5 Optimalizace elektrochemické detekce benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazonu

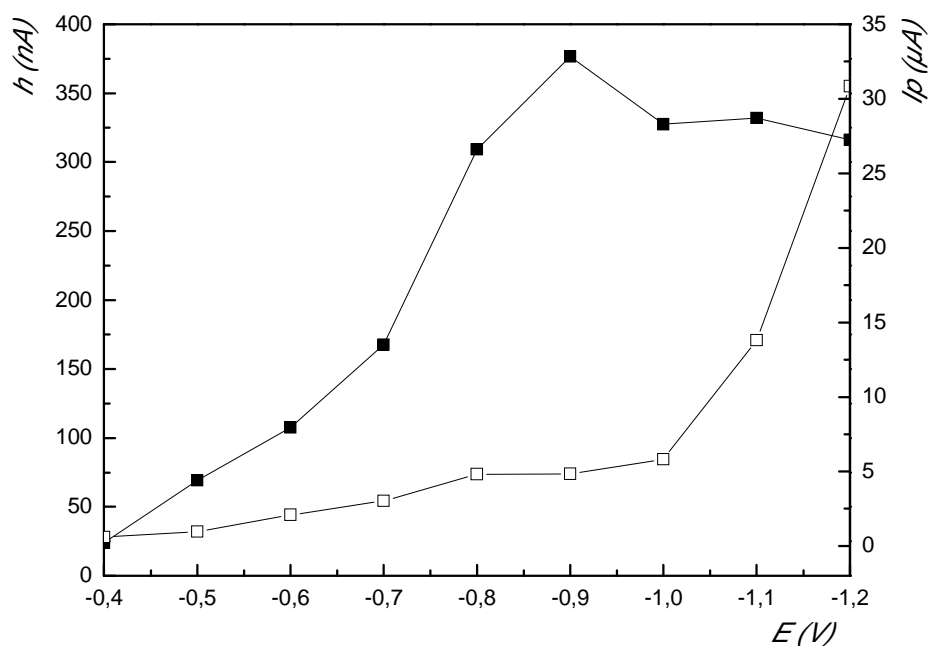
K měření hydrodynamických voltamogramů byl z předchozích analytů vybrán jen 2,4-dinitrofenylhydrazin, protože odezva elektrochemického detektoru v katodické oblasti byla lepší než odezva 2-nitrofenylhydrazinu. Elektrochemická detekce probíhala současně jak v redukční tak i v oxidační oblasti, a to z důvodu kontroly výšky píku DNPH.

3.5.1 Hydrodynamický voltamogram benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazonu

K určení optimálního pracovního potenciálu vkládaného na pracovní elektrody byl proměřen hydrodynamický voltamogram i pro benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazon. Reakce, kterou tato látka vzniká, probíhá v kyselém prostředí a navíc se dá předpokládat obdobné elektrochemické chování jako u DNPH, z tohoto důvodu bylo pro stanovení zvoleno pH 3. Benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazon vznikl smícháním 1 ml 1,5mmol/L roztoku benzaldehydu s 5 ml 3mmol/L DNPH. Měření hydrodynamických voltamogramů probíhala s použitím gradientové eluce, z počátečního stavu mobilní fáze ve složení methanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 (40:60 V/V), bylo zvyšováno procentuální zastoupení methanolu ve směsi až na 70 %, a to v čase 8 minut. Potenciály vkládané na pracovní elektrodu byly v rozsahu od -0,4 V do -1,2 V s krokem po 0,1 V.

Hydrodynamický voltamogram benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazonu získaný vyhodnocením výšek píků při různých hodnotách pracovního potenciálu je znázorněn na obr. 16.

Z obr. 16 je patrné, že nejvhodnější pracovní potenciál k elektrochemickému stanovení benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazonu je -0,9 V, pro další měření byl ale vybrán pracovní potenciál -1,0 V, protože chování analytu je při tomto potenciálu podobné jako při potenciálu -0,9 V, navíc byl při tomto potenciálu stanovován i DNPH.



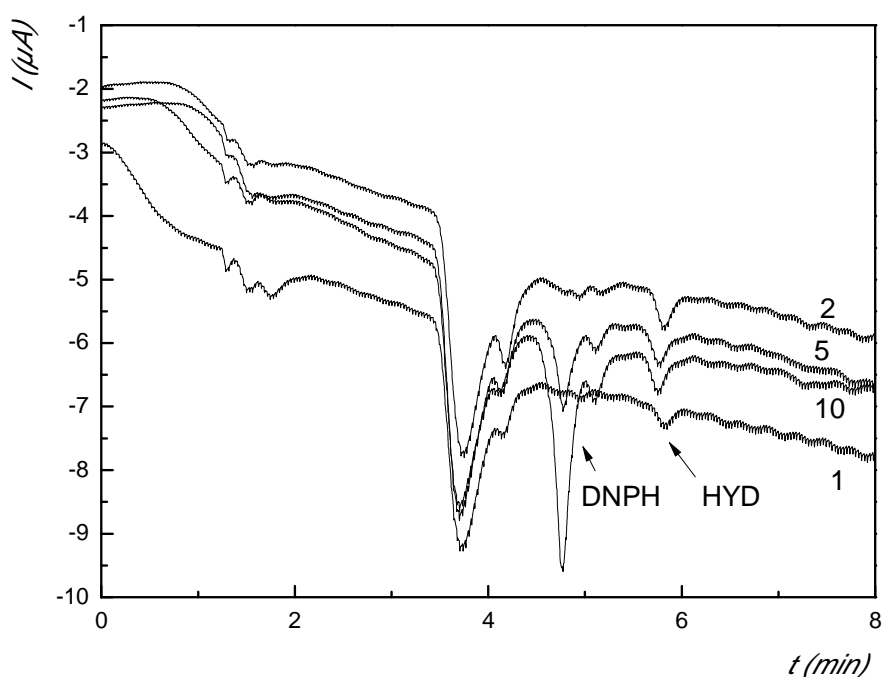
Obr. 16

Hydrodynamický voltamogram pro benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazon při pH 3 (■) spolu s proudem pozadí (□). Měřeno metodou HPLC-ED, kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l. Gradient methanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 z poměru 40:60 (V/V) na 70:30 (V/V) za 8 minut, průtok mobilní fáze 1 ml/min.

3.5.2 Výtěžek reakce

Pro ověření kvantitativnosti reakce byl testován průběh reakce vzniku benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazonu. Nadbytek DNPH byl z desetinásobku snižován až na koncentraci shodnou s koncentrací benzaldehydu, vše bylo acetonitrem naředěno na objem 10 ml. Měření probíhala současně při pracovních potenciálech +1,0 V a -1,0 V a gradientové eluci mobilní fáze methanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 z poměru 40:60 (V/V) na poměr 70:30 (V/V) za 8 minut. Naměřené chromatogramy jsou zobrazeny na obr. 17.

Z obr. 17 je vidět, že při použití nadbytku DNPH v reakční směsi je výška píku vzniklého benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazonu prakticky shodná. Výška píku samotného DNPH pak klesá poměrně k jeho koncentraci, tedy v poměru 9:4:1, protože jeden díl byl spotřebován reakcí. Zvláštní případ tvoří nejnižše položená křivka, kde byla k reakci použita stejná koncentrace DNPH jako benzaldehydu. Pík vzniklého benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazonu je zde nižší než v předešlých případech. Ke správnému průběhu reakce je tedy zapotřebí nadbytek DNPH vůči benzaldehydu. Pro názornost jsou výšky obou redukčních píků uvedeny v tab. 5.



Obr. 17

Chromatogramy znázorňující různé zastoupení DNPH v reakci: desetinásobek (10), pětinasobek (5), dvojnásobek (2) a stejná koncentrace jako benzaldehyd (1). Měřeno metodou HPLC-ED, kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl . Gradient methanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 z poměru 40:60 (V/V) na 70:30 (V/V) za 8 minut, průtok mobilní fáze 1 ml/min.

Tab. 5

Výšky píků DNPH i vzniklého benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazonu v katodické oblasti. Měřeno metodou HPLC-ED, kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl . Gradient methanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 z poměru 40:60 (V/V) na 70:30 (V/V) za 8 minut, průtok mobilní fáze 1 ml/min.

Nadbytek DNPH	h_p DNPH (μA)	h_p benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazon (μA)
10x	3,27	0,54
5x	1,36	0,60
2x	0,31	0,61
1x	0,18	0,27

4. Závěr

V této diplomové práci bylo optimalizováno stanovení nitrofenylhydrazinů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí na duální tenkovrstvé elektrodě. K porovnání byla použita spektrofotometrická detekce. Tato metoda byla dále testována ke stanovení hydrazonů vzniklých reakcí 2,4-dinitrofenylhydrazinu s benzaldehydem jako zástupcem látek obsahujících karbonylovou skupinu.

Optimalizovanými parametry bylo pH vodné složky mobilní fáze a zejména potenciál vkládaný na pracovní elektrody. Z hydrodynamických voltamogramů bylo vybráno prostředí o pH 3, tedy mobilní fáze methanol:acetáto fosfátový pufr o pH 3 (40:60, V/V) a pracovní potenciály +1,0 V a -1,0 V.

Za optimálních podmínek byla zkoumána opakovatelnost měření. Zatímco relativní směrodatné odchylky v anodické oblasti byly okolo 5 %, v katodické oblasti dosahovaly až 17 % pro obě látky. S použitím spektrofotometrické detekce bylo dosaženo mnohem lepší opakovatelnosti, a to s relativní směrodatnou odchylkou okolo 2 % pro obě látky.

Byly také proměřeny koncentrační závislosti, ze kterých byly určeny meze detekce. Mez detekce byla určena z výšky píku jak v anodické tak v katodické oblasti. Pro 2-nitrofenylhydrazin (2-NPH) byly tyto meze $9,5 \cdot 10^{-8}$ mol/L a $6,2 \cdot 10^{-7}$ mol/L. Pro 2,4-dinitrofenylhydrazin pak $2,1 \cdot 10^{-8}$ mol/L a $1,8 \cdot 10^{-7}$ mol/L. S použitím spektrofotometrické detekce bylo dosaženo těchto mezí detekce: $1,5 \cdot 10^{-7}$ mol/L pro 2-NPH a $6,1 \cdot 10^{-8}$ mol/L pro DNPH.

K výrobě hydrazonu byl použit jen DNPH, který měl lepší odezvu v katodické oblasti, a byl smíchán s benzaldehydem. Bylo zkoumáno elektrochemické chování vzniklého benzaldehyd-2,4-dinitrofenylhydrazonu v prostředí o pH 3. Pro tato měření byla použita gradientová eluce, kdy mobilní fáze o složení methanol:acetáto-fosfátový pufr o pH 3 byla měněna z poměru 40:60 (V/V) na 70:30 (V/V) za 8 minut. Z hydrodynamického voltamogramu byl vybrán pracovní potenciál -1,0 V. Dále byla zkoumána kvantitativnost reakce, opět za použití gradientové eluce uvedené výše. Bylo zjištěno, že ke správnému průběhu reakce je potřeba nadbytek DNPH ve srovnání s benzaldehydem.

5. Použitá literatura

- [1] Pesez M.: 2,4-Dinitrophenylhydrazine, a suitable reagent for the colorimetric determination of carbonyl compounds. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **11**, 475-476 (1959).
- [2] Brady O. L., Elsmie G. V.: The Use of 2,4-dinitrophenylhydrazine as a reagent for aldehydes and ketones. *Analyst* **51**, 77-78 (1926).
- [3] Barman B. N.: Accurate determination of aldehydes in amine catalysts or amines by 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization. *Journal of Chromatography A*, **1327**, 19-26 (2014).
- [4] Kissinger P. T., Bratin K., Davis G. C.: Potential utility of pre-column and post-column chemical-reactions with electrochemical detection in liquid-chromatography. *Journal of chromatographic sciences* **17**, 137-146 (1979).
- [5] Saczk A. A., Okumura L. L., de Oliveira M. F., Zanoni M. V. B., Stradiotto N. R.: Determination of aldehydes and ketones in fuel ethanol by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Chromatographia* **63**, 45-51 (2006).
- [6] Medvedev V. S., Troitsky A. V., Bystrova T. N., Shkurupiy V. A.: Method for determining the number of aldehydes in dextran polyaldehyde using 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **46**, 573-577 (2012).
- [7] Fernández-Molina J. M., Silva M.: Simple and sensitive determination of low-molecular-mass aromatic aldehydes in swimming pool water by LC-diode array detector. *Journal of Separation Science* **34**, 2832-2738 (2011).

- [8] Uchiyama S., Ohta K., Inaba Y., Kunugita N.: Determination of carbonyl compounds generated from the E-cigarette using coupled silica cartridges impregnated with hydroquinone and 2,4-dinitrophenylhydrazine, followed by high-performance liquid chromatography. *Analytical Sciences* **29**, 1219-1222 (2013).
- [9] Uchiyama S., Inaba Y., Kunugita N.: Derivatization of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* **879**, 1282-1289 (2011).
- [10] Mesquita C. S., Oliveira R., Bento F., Geraldo D., Rodrigues J. V., Marcos J. C.: Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical Biochemistry* **458**, 69-71 (2014).
- [11] Szulejko J. E., Kim K.: Derivatization techniques for determination of carbonyls in air. *Trends in Analytical Chemistry* **64**, 29-41 (2015).
- [12] Mu C., Feng Y., Zhai J., Xiong B., Zou T.: Determination of dicarbonyl compounds in ambient fine particles by liquid chromatography after 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **38**, 1573-1577 (2010).
- [13] Miller J. H., Gardner W. P., Gonzalez R. R.: UHPLC separation with MS analysis for eight carbonyl compounds in mainstream tobacco smoke. *Journal of Chromatographic Science* **48**, 12-17 (2010).
- [14] Karabín M., Dostálek P., Šindelářová J.: HLPC – nová cesta pro stanovení karbonylů v pivu. *Kvasný průmysl* **53**, 35-37 (2007).

- [15] Štulík K., Pacáková V.: Electrochemical detection techniques in high-performance liquid chromatography. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **129**, 1-24 (1981).
- [16] Štulík K., Pacáková V.: Elektroanalytická měření v proudících kapalinách. Nakladatelství technické literatury, Praha 1989.
- [17] Kissinger P. T., Refshaug C., Dreiling R., Adams R. N.: Electrochemical detector for liquid chromatography with picogram sensitivity. *Analytical Letters* **6**, 465-477 (1973).
- [18] Štulík K., Pacáková V., Stárková B.: Carbon pastes for voltammetric detectors in high-performance liquid-chromatography. *Journal of Chromatography* **213**, 41-46 (1981).
- [19] Štulík K., Pacáková V.: Comparison of several voltammetric detectors for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **208**, 269-278 (1981).
- [20] BASi: <http://basinc.com/products/ec/working.php> (staženo 20. 4. 2015)
- [21] Blank C. L.: Dual electrochemical detector for liquid-chromatography. *Journal of Chromatography* **117**, 35-46 (1976).
- [22] Lunte C. E., Kissinger P. T.: Difference mode detection with thin-layer dual-electrode liquid chromatography/electrochemistry. *Analytical Chemistry* **57**, 1541-1546 (1985).
- [23] Mayer G. S., Shoup R. E.: Simultaneous multiple electrode liquid-chromatographic electrochemical assay for catecholamines, indoleamines and metabolites in brain-tissue. *Journal of Chromatography* **255**, 533-544 (1983).

- [24] MacCrehan W. A., Durst R. A.: Dual-electrode, liquid-chromatographic detector for the determination of analytes with high redox potentials. *Analytical Chemistry* **53**, 1700-1704 (1981).
- [25] Tjaden U. R., Dejong J., Valkenburg C. F. M. V.: Gradient elution of biogenic-amines and derivatives in reversed phase ion-pair partition chromatography with electrochemical and fluorometric detection. *Journal of Liquid Chromatography* **6**, 2255-2274 (1983).
- [26] Doyle M.J., Halsall H.B., Heineman W.R.: Heterogeneous immunoassay for serum-proteins by differential pulse anodic-stripping voltammetry. *Analytical Chemistry* **54**, 2318-2322 (1982).