

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**Stanovení 5-amino-6-nitrochinolinu  
pomocí HPLC s elektrochemickou  
detekcí**

*Bakalářská práce*

Lenka Němcová

*Praha 2006*

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Jiřího Zimy, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne.....*10.5.2006*.....

.....*Lenka Němcová*.....

podpis

Ráda bych poděkovala Doc. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc., za odborné vedení, cenné rady, připomínky a veškerou pomoc při vypracování mé bakalářské práce. Chtěla bych rovněž poděkovat všem členům katedry analytické chemie za pomoc a příjemné prostředí, které mi poskytovali v průběhu celé mé práce. Děkuji také své rodině za umožnění studia na vysoké škole a za podporu během celého studia.

**Klíčová hesla :**

HPLC – spektrofotometrická detekce

HPLC – elektrochemická detekce

HPLC – reverzní fáze

**Klíčová slova :**

HPLC

5-amino-6-nitrochinolin

uhlíková pastová elektroda

**Key Words plus :**

HPLC – spectrophotometric detection

HPLC – electrochemical detection

HPLC – RP

**Key Words :**

HPLC

5-amino-6-nitroquinoline

carbon paste electrode

# Obsah

<b>1. Teoretická část .....</b>	<b>8</b>
1.1 Cíl práce.....	8
1.2 PAH a jejich deriváty .....	8
1.3 Uhlíková pastová elektroda.....	10
<b>2. Experimentální část.....</b>	<b>12</b>
2.1 Použité chemikálie .....	12
2.2 Studovaná látka... ..	13
2.3 Použitá aparatura .....	14
2.4 Další používaná zařízení .....	14
2.5 Použité vzorce.....	15
2.6 Pracovní postupy .....	15
2.6.1 Optimalizace stanovení.....	15
2.6.2 HPLC stanovení 5-A6-NQ s ED.....	16
2.6.3 Kalibrační závislosti .....	17
2.7 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku studované látky.....	18
<b>3. Výsledky a diskuse .....</b>	<b>20</b>
3.1 Vliv pH mobilní fáze .....	20
3.2 Hydrodynamické voltamogramy .....	22
3.3 Kalibrační závislosti .....	24
3.3.1 Spektrofotometrická detekce .....	24
3.3.2 Elektrochemická detekce .....	27
3.4 Opakovatelnost měření .....	31
<b>4. Závěr.....</b>	<b>33</b>
<b>5. Literatura.....</b>	<b>34</b>

## Seznam použitých zkratk

5-A6-NQ	5-amino-6-nitrochinolin
$\alpha$	hladina významnosti
APAH	aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků
A	absorbance
<i>A</i>	plocha píku
AU,mAU	jednotky absorbance
<i>c</i>	koncentrace
CAS	Chemical Abstract Services
CPE(s)	uhlíková pastová elektroda (Carbon Paste Electrode(s))
ED	elektrochemická detekce
<i>h</i>	výška píku
h-APAH	aminoderiváty heterocyklických polyaromatických uhlovodíků
h-NPAH	nitroderiváty heterocyklických polyaromatických uhlovodíků
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IARC	the International Agency for Research on Cancer
IGC <sub>50</sub>	koncentrace způsobující 50% pokles růstu (50% inhibitory growth concentration)
<i>k</i>	retenční faktor
$\lambda$	vlnová délka
<i>L<sub>D</sub></i>	mez detekce
log <i>k</i>	dekadický logaritmus retenčního faktoru
MeOH	methanol
<i>M<sub>r</sub></i>	relativní molární hmotnost
<i>N</i>	počet teoretických pater kolony
NPAH	nitroderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků

NTP	the National Toxicology Program
OSHA	the Occupational Safety and Health Administration
p.a.	pro analýzu
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
pK	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
$\rho$	hustota
$R$	korelační koeficient
RP-18	reverzní fáze s chemicky vázaným oktadecylsilanem
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
$s$	směrodatná odchylka
$s_r$	relativní směrodatná odchylka
$t$	čas
$t_M$	mrtvý čas
$t_R$	retenční čas
$t_t$	teplota tání
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině jeho výšky

# 1. Teoretická část

## 1.1 Cíl práce

Předkládaná bakalářská práce se zabývá studiem chromatografického chování 5-amino-6-nitrochinolinu (5-A6-NQ) metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC).

Cílem této práce bylo prozkoumání podmínek pro stanovení studované látky amperometrickou detekcí na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) a jejich využití k dosažení co nejnižší meze detekce.

## 1.2 PAH a jejich deriváty

Nádorová onemocnění jsou v ekonomicky vyspělých státech druhou nejčastější příčinou úmrtí. Podle Národního onkologického registru bylo v České republice v roce 2000 nově hlášeno přes 56 tisíc nádorových onemocnění. Průměrně u nás tedy každý den na následky této diagnózy zemře okolo 76 pacientů (ročně přes 27 tisíc osob). Při vzniku zhoubných nádorů se uplatňují různé vnitřní a vnější faktory, z nichž vnější značně převažují. Zatímco při experimentální karcinogenezi u zvířat se používají vysoké dávky karcinogenních sloučenin, u lidí obvykle spolupůsobí více karcinogenních faktorů v malých množstvích po dlouhou dobu a jejich účinek se vzájemně sčítá nebo násobí<sup>1,2</sup>.

Studovaný 5-amino-6-nitrochinolin (5-A6-NQ) patří do skupiny nitro-aminoderivátů heterocyklických polyaromatických uhlovodíků (h-NPAH, h-APAH), obecně spadající pod polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH). U studované látky zatím nebyla prokázána karcinogenita ani mutagenita (není v seznamu IARC, NTP, OSHA)<sup>3,4</sup>. Byly však studovány její toxikologické vlastnosti na *Tetrahyena pyroformis* (IGC<sub>50</sub> - koncentrace způsobující 50% pokles růstu), které jsou srovnatelné s 3,5-dinitroanilinem<sup>5</sup>. Dále byla látka



použita pro syntézu některých radioligandů s využitím v pozitronové emisní tomografii<sup>6</sup> a dále na syntézu nových druhů lokálních anestetik<sup>7</sup>.

Obecně PAH představují skupinu perzistentních organických látek přítomných ve všech složkách a oblastech životního prostředí, jež vstupují do okolí nejčastěji jako důsledek spalování fosilních paliv nebo jako vedlejší produkty průmyslových procesů a během zpracování potravin<sup>8</sup>. Protože PAH jsou látky víceméně všudypřítomné, patří expozice těmto kancerogenům k realitě každodenního života<sup>9</sup>.

Zvýšený zájem o NPAH se projevil od doby, kdy se zjistilo, že PAH mohou reagovat s oxidy dusíku za vzniku NPAH za podmínek, které lze očekávat ve znečištěném ovzduší a při spalovacích procesech<sup>10</sup>, zvláště u dieselových motorů<sup>11,12</sup>. NPAH se metabolizují na APAH, které také patří mezi chemické karcinogeny s vysokým výskytem<sup>13</sup>.

Omezení výskytu těchto látek v životním či pracovním prostředí vyžaduje v první řadě jejich systematické a důsledné monitorování. Vzhledem ke své nízké těkavosti je většina karcinogenních PAH adsorbována na tuhé částice jemně rozptýlené v prostředí, které svou povahou mohou rovněž výrazně ovlivnit účinky PAH na lidský organismus, proto se analyzují i biologické tekutiny exponovaných jedinců<sup>14</sup>. PAH jsou nejčastěji stanovovány plynovou chromatografií ve spojení s hmotnostním spektrometrem popřípadě s jinými detektory a kapalinovou chromatografií s fluorescenčním, spektrometrickým nebo elektrochemickým detektorem<sup>11,15,16</sup>.

### 1.3 Uhlíková pastová elektroda

Uhlíkové pastové elektrody (Carbon Paste Electrodes, CPEs) byly objeveny již v roce 1958 R.N.Adamsem<sup>17</sup>. Hlavním důvodem, který přispěl k jejich zavedení, byla snaha nalézt elektrodu s obnovitelným povrchem, která je využitelná pro anodické oxidace. Měla se jí stát tzv. "kapající uhlíková elektroda", jakási disperze práškového uhlíku v organické kapalině, realizovaná pomocí kapiláry. Takováto kapající uhlíková elektroda se neosvědčila, avšak ukázalo se, že hustší směs práškového uhlíku s organickou kapalinou (uhlíková pasta) je vhodným materiálem pro konstrukci elektrod se zajímavými vlastnostmi<sup>18</sup>. Uhlíková pasta může být také modifikována různými látkami a ve srovnání s úpravou pevných elektrod je její modifikace mnohem jednodušší<sup>19</sup>.

CPEs patří do speciální skupiny heterogenních uhlíkových elektrod<sup>19</sup>. Skládají se z uhlíkové pasty, složené z uhlíkového prášku a pojiva, naplněné do elektrodového pouzdra (obr. 1.1). Jako pastová kapalina se používá nejčastěji chemicky inertní, elektrochemicky inaktivní a málo těkavé látky, nejčastěji organické kapaliny jako např. minerální nebo silikonový olej. Požadovanými vlastnostmi uhlíkového prášku je stejná velikost částic a nízká adsorpční schopnost. Chování řady připravených past se mnohdy ustálí až po určité době (asi 24 hodin), zřejmě v důsledku následné samovolné homogenizace u čerstvě připravené směsi. Naplněnou elektrodu není vhodné ponechávat příliš dlouho na vzduchu, neboť pasta zvolna vysychá, proto se přechovává ponořena koncovým otvorem v nádobce s destilovanou vodou<sup>18</sup>.

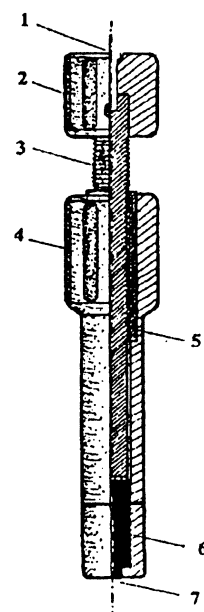
Šířka potenciálového okna CPE je srovnatelná s pevnými elektrodami (platinovými, běžné uhlíkové elektrody). V neutrálním prostředí se rozmezí potenciálů použitelných pro měření pohybuje mezi -1,3 až +1,4 V, v alkalických a kyselých prostředí se pak potenciálové okno posouvá o několik desetin voltu<sup>20</sup>. CPEs vykazují nezanedbatelný proud, způsobený elektrodovou redukcí rozpuštěného kyslíku v pastě. Signál se projevuje rušivě při používání CPEs pro sledování dějů v oblasti katodických potenciálů. Podobný efekt způsobuje

naadsorbovaný kyslík i u pevných elektrod, ale CPEs trpí přítomností kyslíku výrazněji. Mezi veliké přednosti CPEs patří velmi nízké hodnoty zbytkových proudů. Rozhodující roli hraje právě přítomnost pastové kapaliny, se snižovaným obsahem pastovací kapaliny se vlastnosti CPEs přibližují vlastnostem pevných elektrod a tedy vykazují vyšší zbytkové proudy. Používaný poměr závisí samozřejmě na konkrétních použitých materiálech, pohybuje se většinou kolem 0,4 ml pastovací kapaliny na jeden gram uhlíkového prášku<sup>18</sup>. Nižší stabilita pasty v roztocích s vysokým obsahem organického rozpouštědla lze vyřešit použitím kuliček skelného uhlíku<sup>21</sup>. Důležitou charakteristikou elektrody je také reprodukovatelnost její odezvy, která je vzhledem k hůře definovanému povrchu uhlíkové pasty nižší<sup>18</sup>.

Použití CPEs je poměrně široké např. pro stanovení anorganických i organických sloučenin, také biologicky důležitých látek. Nejvýznamnější místo pak zaujímají voltametrické metody, využívající nových senzorů na bázi chemicky modifikované uhlíkové pasty. Při analýzách složitých směsí organických látek separačními metodami se CPEs rovněž uplatnily při konstrukcích elektrochemických detektorů. U těchto detektorů jsou pozitivně hodnoceny hlavně mechanické vlastnosti pasty a jednoduchost, s jakou lze regenerovat její povrch<sup>22</sup>.

**Obr. 1.1** Pouzdro pro uhlíkovou pastovou elektrodu<sup>18</sup>

- 1) zdířka pro elektrický kontakt
- 2) teflonová hlava
- 3) píst se závitem
- 4) tělo elektrodového pouzdra
- 5) ocelová vložka se závitem
- 6) dutina naplněná uhlíkovou pastou
- 7) koncový otvor



## 2. Experimentální část

### 2.1 Použité chemikálie

Studovaná látka :

5-amino-6-nitrochinolin (97%, Aldrich)

Zásobní roztok o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v methanolu (p.a., Lach-Ner, Neratovice). Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku methanolem. Všechny roztoky byly uchovávány v temnu v chladničce při konstantní teplotě  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Pro přípravu mobilních fází byl použit methanol (Chromservis, Praha).

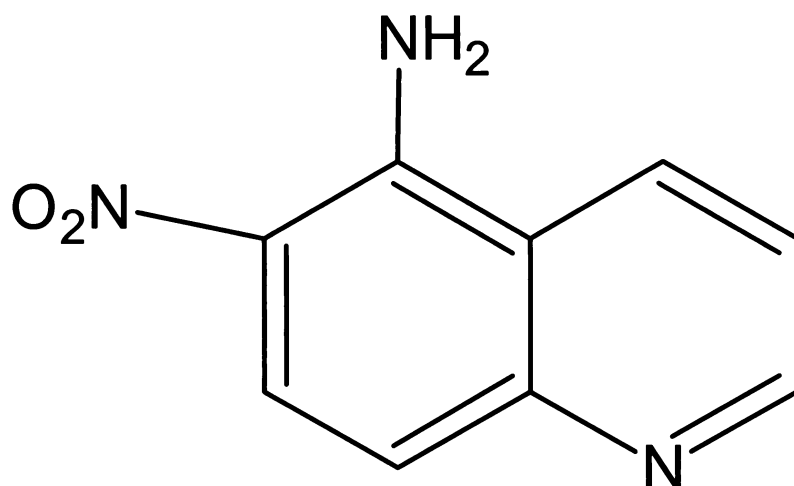
K přípravě vodných roztoků a mobilních fází byla použita deionizovaná voda (Millipore Q-plus System, Millipore, USA).

Brittonovy-Robinsonovy tlumivé roztoky<sup>23</sup> o příslušném pH byly připraveny smísením vodného roztoku hydroxidu sodného (p.a., Lachema Brno) o koncentraci  $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$  s roztokem obsahujícím kyselinu boritou (p.a., Lachema Brno), kyselinu fosforečnou (85%,  $\rho = 1,71 \text{ g.ml}^{-1}$ , p.a., Lachema Brno) a kyselinu octovou (98%,  $\rho = 1,06 \text{ g.ml}^{-1}$ , p.a., Lach-Ner, Neratovice), každou o koncentraci  $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ . Přesná hodnota pH byla měřena pH metrem.

Uhlíková pasta byla připravena smísením 250 mg mikrokuliček skelného uhlíku o průměru  $0,4 - 12 \text{ }\mu\text{m}$  (Alpha Aesar, USA) a  $90 \text{ }\mu\text{l}$  minerálního oleje (Fluka Biochemika, Švýcarsko).

## 2.2 Studovaná látka

### 5-amino-6-nitrochinolin<sup>3,24</sup>



C.A.S. Name : 5-amino-6-nitroquinoline

C.A.S. Registry number : [ 35975-00-9 ]

$C_9H_7N_3O_2$

$M_r = 189,17$

$t_f = 272 - 273^\circ\text{C}$

$pK_a = 3,81$  (při  $25^\circ\text{C}$  ve vodném prostředí)

fyzikální stav : okrově žlutý prášek

zkratka : 5-A6-NQ

## 2.3 Použitá aparatura

**Pumpa** : vysokotlaká pumpa HPP 5001 (Laboratorní přístroje, Praha)

**Dávkovač** : LCI 30 se smyčkou 20  $\mu$ l (Laboratorní přístroje, Praha), nástřík byl prováděn injekční stříkačkou

**Kolona** : Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 (5 $\mu$ m), 125 x 4 mm (LichroCART)

**Detektory** : UV/VIS detektor LCD 2040 (Laboratorní přístroje, Praha)

Amperometrický detektor ADLC 2 (Laboratorní přístroje, Praha)

- tělo pracovní elektrody bylo teflonové, s nerezovým pístem umožňujícím vytlačení pasty. Aktivní plocha byla kruhová o průměru 3 mm
- referenční elektroda byla nasycená argentschloridová elektroda s 3 mol. l<sup>-1</sup>
- pomocná elektroda byla platinová elektroda

**Programové vybavení** : CSW 1.7 (DataApex Ltd.), pracující v prostředí Windows 95 (Microsoft)

## 2.4 Další používaná zařízení

**Odstranění vzduchu z mobilní fáze** : ultrazvuková čistička PSO2000A (Powersonic, USA)

**pH metr** : digitální měřicí přístroj Conductivity and pH meter 4330 (Jenway, UK) s kombinovanou skleněnou elektrodou

**Spektrofotometr** : PU 8800 (Philips, UK), stanovení stálosti zásobního roztoku v křemenných kyvetách tloušťky 1,01 mm

## 2.5 Použité vzorce<sup>25</sup>

**Retenční faktor  $k$  :**

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

$t_R$  . . . retenční čas

$t_M$  . . . mrtvý čas

**Počet teoretických pater  $N$  :**

$$N = 5,545 \cdot \left( \frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

$t_R$  . . . retenční čas

$w_{1/2}$  . . . šířka píku v polovině jeho výšky

## 2.6 Pracovní postupy

### 2.6.1 Optimalizace stanovení

Zásobní roztok 5-amino-6-nitrochinolinu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v methanolu. Roztoky nižších koncentrací pak byly připravovány přesným ředěním zásobních roztoků methanolem. Stálost zásobního roztoku byla sledována spektrofotometricky, přičemž bylo zjištěno, že zásobní roztok je stálý po dobu minimálně čtyři měsíce při uchování ve tmě v chladničce za konstantní teploty  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Měření bylo provedeno na roztok dané látky o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Dávkováno bylo 20  $\mu\text{l}$  roztoku. Detekce probíhala při vlnové délce 295 nm, což je vlnová délka absorpčního maxima dané látky (viz obr. 2.2).

Mrtvý čas byl stanoven nástřikem vodného roztoku dusičnanu sodného o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  při vlnové délce 230 nm.

Mobilní fáze byly připraveny smíšením příslušných objemových dílů vodné složky a methanolu. Obsah organické složky byl vyjádřen v objemových procentech. Jelikož nebyla cílem práce separace směsí látek, ale pouze stanovení jedné látky, byla na základě výsledků HPLC stanovení nitro- a aminoderivátů chinolinu<sup>26</sup> za účelem dosažení co nejkratších retenčních časů zvolena mobilní fáze s 90% obsahem methanolu (připravena smíšením 90 objemových dílů methanolu s 10 objemovými díly vodné složky). pH mobilních fází bylo upravováno pomocí Brittonova-Robinsonova pufru změnou pH vodné složky mobilní fáze. V dalším textu uváděné hodnoty pH tudíž odpovídají pH vodné složky před jejím smísením s organickým modifikátorem.

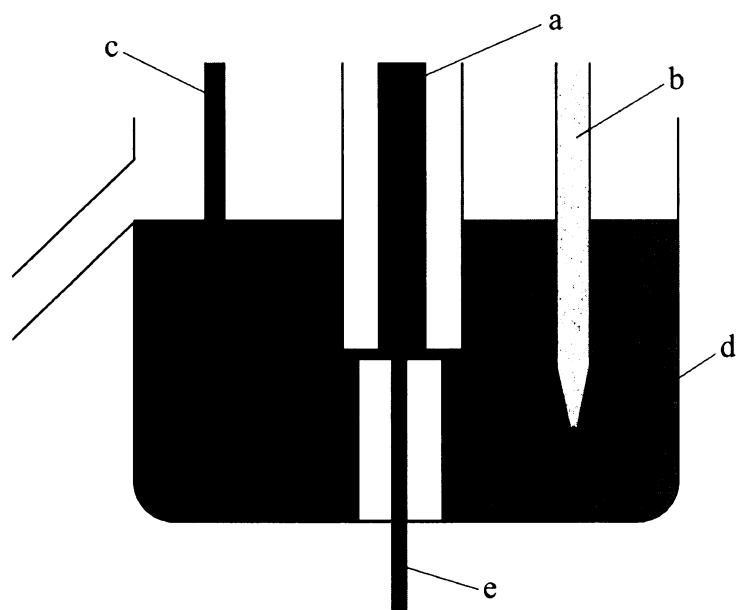
Měření bylo prováděno na neinterstatované koloně Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 (5 $\mu\text{m}$ ), 125 x 4 mm. průtok mobilní fáze byl 0,5 ml.min<sup>-1</sup>.

## 2.6.2 HPLC stanovení 5-A6-NQ s ED

Elektrochemický detektor typu wall-jet byl zapojen sériově za UV detektor. Pracoval ve tříelektrodovém zapojení s pracovní uhlíkovou pastovou elektrodou, referentní nasycenou argentchloridovou elektrodou a pomocnou platinovou elektrodou. Konec kapiláry byl přiveden k povrchu pracovní elektrody, jež byla spolu s pomocnou a referentní elektrodou umístěna v mobilní fázi (viz obr. 2.1).

Hydrodynamické voltamogramy byly proměřovány pomocí nástřiku dané látky o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Jako optimální podmínky stanovení byl určen potenciál +1,2 V, mobilní fáze tvořena Brittonovým-Robinsonovým pufrům o pH = 7 a methanolem v poměru 10 : 90 (v/v).





**Obr. 2.1** Schéma konstrukce elektrochemického detektoru:

- a) pracovní elektroda
- b) referentní elektroda
- c) pomocná elektroda
- d) mobilní fáze
- e) přívodní kapilára

### 2.6.3 Kalibrační závislosti

Kalibrační závislosti 5-amino-6-nitrochinolinu byly proměřeny v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}$  až  $2 \cdot 10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup>, byly zpracovány metodou lineární regrese. Meze detekce  $L_D$  (mol.l<sup>-1</sup>) byly stanoveny jako množství analytu poskytující signál, jehož výška je rovna trojnásobku absolutní hodnoty šumu. Získané hodnoty úseků kalibračních závislostí byly otestovány Studentovým  $t$ -testem<sup>27</sup>, zda se na hladině pravděpodobnosti  $\alpha = 0,05$  statisticky významně neliší od nuly.

## 2.7 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku studované látky

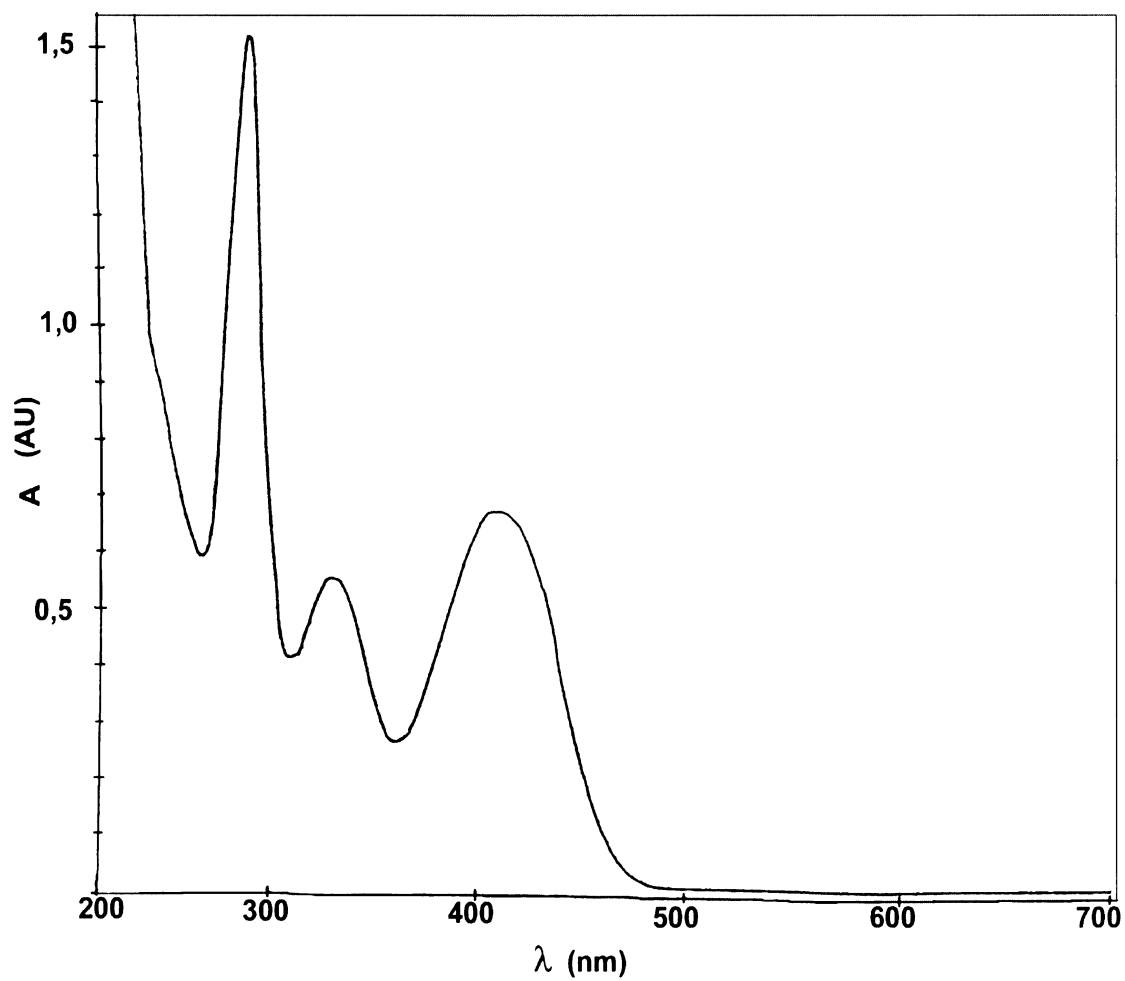
Stálost zásobního roztoku studované látky v methanolu byla studována spektrofotometricky.

Absorpční spektrum studované látky bylo proměřováno v zásobním roztoku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  proti methanolu v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1,01 mm v rozmezí vlnových délek 200 až 700 nm. Změřené spektrum je uvedené na obr. 2.2.

Sledovány byly absorbance při třech vlnových délkách v průběhu 4 měsíců, které jsou uvedeny v tab. 2.1. Z hodnot vyplývá, že zásobní roztok je při uchování ve tmě v chladničce při teplotě 5 °C stálý nejméně 4 měsíce.

**Tab. 2.1** Stálost zásobního roztoku 5-A6-NQ o  $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  v methanolu.

$t$ (dny)	$\lambda = 295 \text{ nm}$		$\lambda = 336 \text{ nm}$		$\lambda = 414 \text{ nm}$	
	A	%	A	%	A	%
0	1,546	100,0	0,566	100,0	0,686	100,0
3	1,538	99,5	0,561	99,1	0,679	99,0
10	1,539	99,5	0,565	99,8	0,681	99,3
26	1,532	99,1	0,561	99,1	0,677	98,7
51	1,547	100,1	0,568	100,4	0,688	100,3
120	1,533	99,2	0,569	100,5	0,695	101,3



**Obr. 2.2** UV-VIS spektrum 5-A6-NQ o  $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  v methanolu (měřeno v kyvetě o tloušťce 1,01 mm proti methanolu).

## 3. Výsledky a diskuse

### 3.1 Vliv pH mobilní fáze

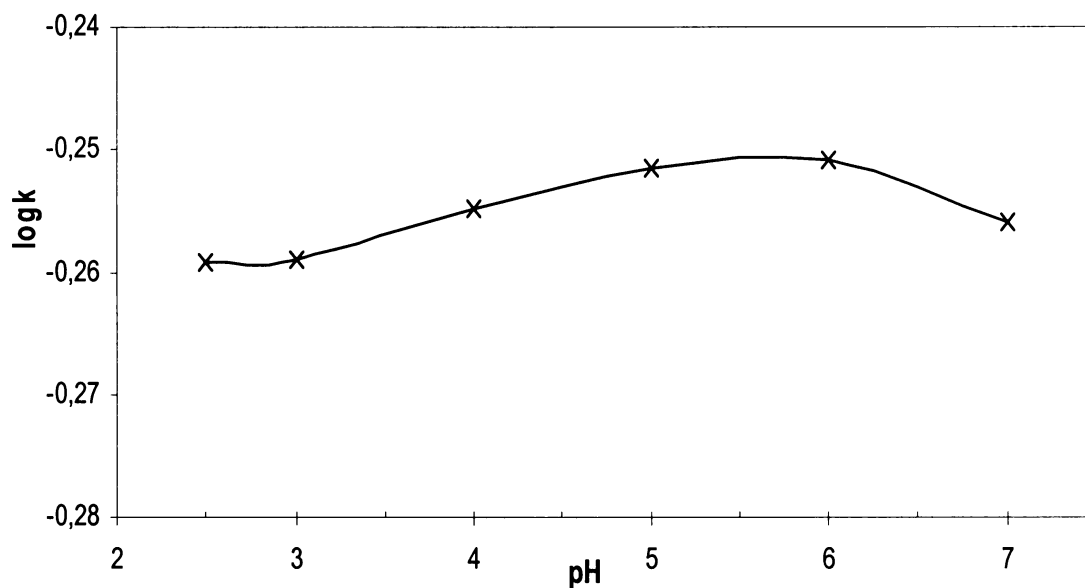
Proměřován byl rozsah pH 2,5 až 7, volba proměřovaného rozsahu pH byla založena na možnostech kolony, která neumožňuje použití v zásadité oblasti.

K nastavení pH byl použit Brittonův-Robinsonův pufr (viz kap. 2.1). Měření bylo prováděno v mobilní fázi o složení Brittonův-Robinsonův pufr o daném pH a methanol v poměru 10:90 (v/v). Koncentrace měřené látky byla  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  v methanolu, dávkovaný objem byl 20  $\mu\text{l}$ . Průtoková rychlost byla  $0,5 \text{ ml.min}^{-1}$ . K detekci byl použit UV/VIS detektor při vlnové délce 295 nm. Mrtvý čas byl určen nástřikem vodného roztoku  $\text{NaNO}_3$  o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ , detekováno při vlnové délce 230 nm.

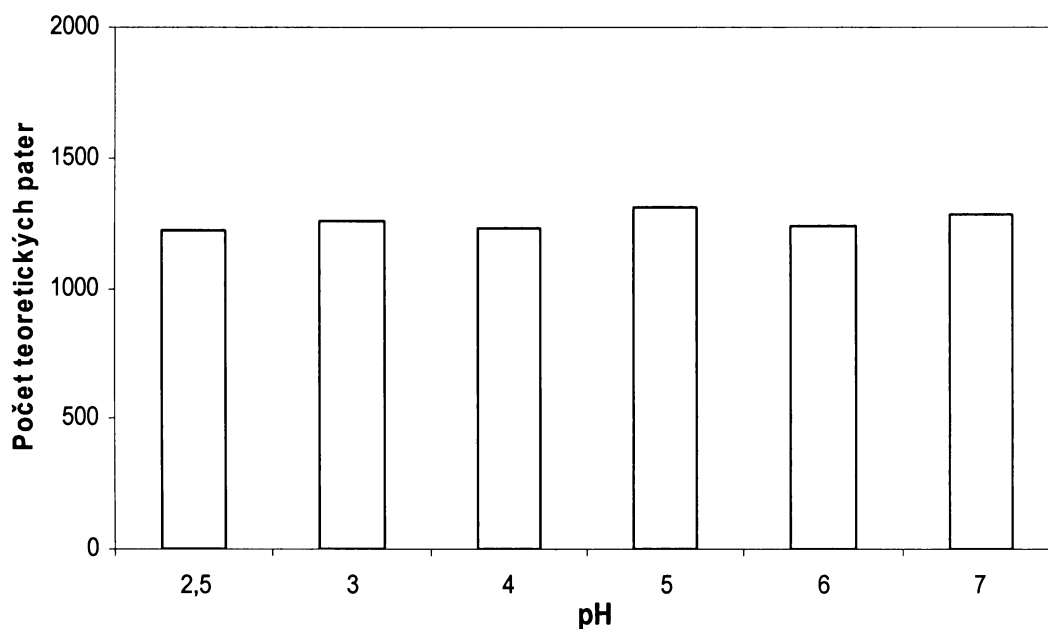
Získané výsledky měření jsou shrnuty v tabulce 3.1, grafickou závislost dekadického logaritmu retenčního faktoru na pH ukazuje obr. 3.1. Ze získaných výsledků je vidět, že chromatografické chování studované látky není při vysokém obsahu organického modifikátoru příliš ovlivněno pH mobilní fáze. Závislost účinnosti chromatografického systému při daném pH byla vyjádřena počtem teoretických pater kolony pro studovanou látku je na obr. 3.2. Získané počty teoretických pater jsou poměrně nízké, ale jelikož cílem práce nebyla separace, ale pouze studium detekce a stanovení jedné látky, nepředstavuje tato skutečnost žádný problém.

**Tab. 3.1** Vliv pH mobilní fáze na retenční charakteristiky 5-A6-NQ.

pH	2,5	3	4	5	6	7
$t_R$ (min)	2,525	2,526	2,534	2,541	2,543	2,532
$\log k$	-0,259	-0,259	-0,255	-0,251	-0,250	-0,256



**Obr. 3.1** Závislost logaritmu retenčního faktoru 5-A6-NQ na pH mobilní fáze (kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm, mobilní fáze Brittonův-Robinsonův pufr : methanol 10:90 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  v MeOH, UV detekce při 295 nm)



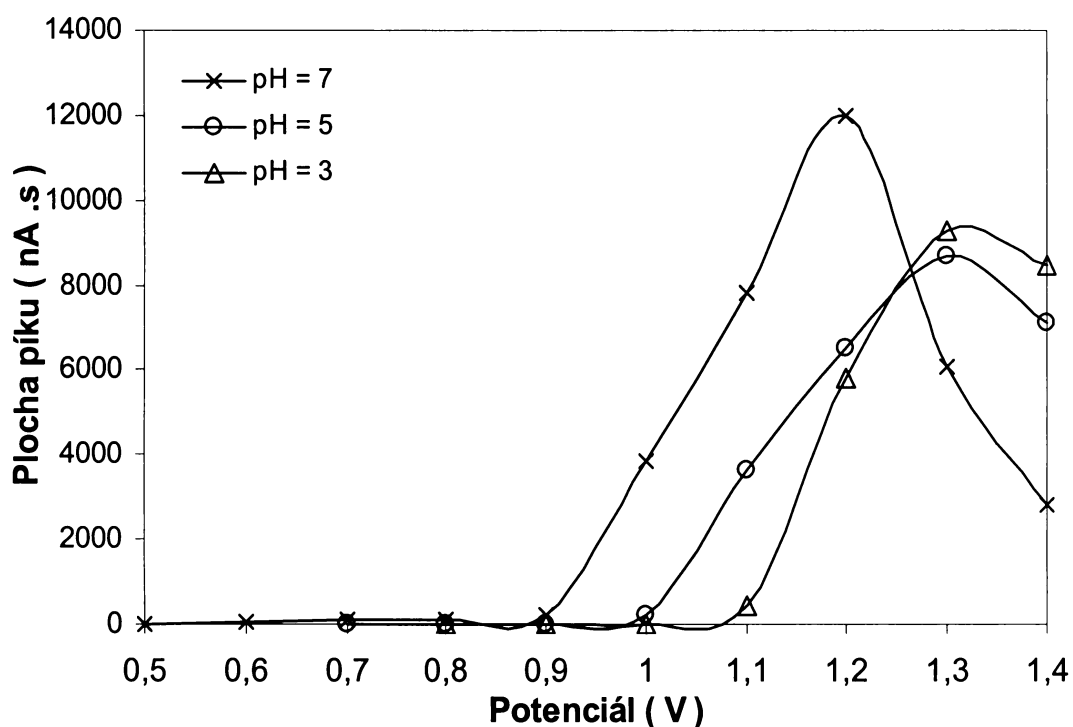
**Obr. 3.2** Závislost počtu teoretických pater kolony pro 5-A6-NQ na pH mobilní fáze (kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm, mobilní fáze Brittonův-Robinsonův pufr : methanol 10:90 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  v MeOH, UV detekce při 295 nm)

## 3.2 Hydrodynamické voltamogramy

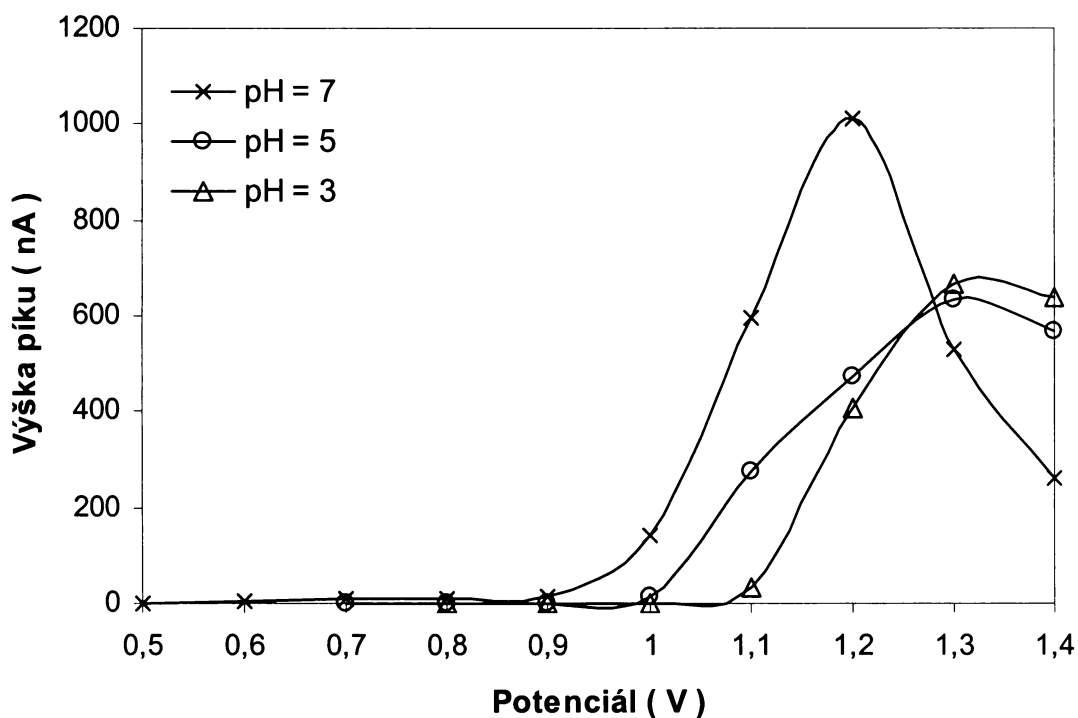
Citlivost použitého amperometrického detektoru výrazně závisí na jeho vlastnostech a uspořádání. Nejvýraznější je závislost odezvy na potenciálu pracovní elektrody. K určení optimálního potenciálu byly změřeny hydrodynamické voltamogramy studované látky, tedy závislost výšky (plochy) píku na potenciálu vkládaném na elektrodu.

Hydrodynamické voltamogramy byly proměřeny pro pH mobilní fáze 3, 5 a 7. Proměřovány byly hodnoty potenciálů v rozsahu +0,5 až +1,4 V.

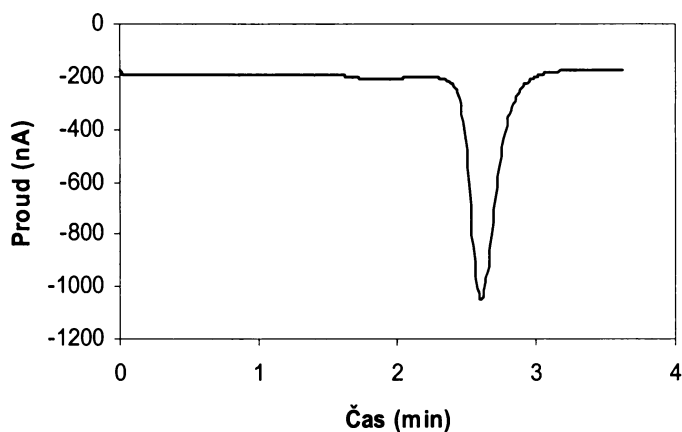
Získané hydrodynamické voltamogramy jsou znázorněny na obr. 3.3 a obr. 3.4. Jako optimální podmínky pro další měření byly zvoleny pH mobilní fáze 7 a potenciál +1,2 V, chromatogram při těchto podmínkách je uveden na obr. 3.5.



**Obr. 3.3** Hydrodynamické voltamogramy 5-A6-NQ vyhodnocené z ploch píků (kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm, mobilní fáze Brittonův-Robinsonův pufr o uvedeném pH : methanol 10:90 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  v MeOH)



**Obr. 3.4** Hydrodynamické voltamogramy 5-A6-NQ vyhodnocené z výšek píků (kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm, mobilní fáze Brittonův-Robinsonův pufr o uvedeném pH : methanol 10:90 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  v MeOH)



**Obr. 3.5** Chromatogram 5-A6-NQ. (Amperometrická detekce na CPE při potenciálu +1,2 V, kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm, mobilní fáze Brittonův-Robinsonův pufr o pH 7 : methanol 10:90 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  v MeOH)

### 3.3 Kalibrační závislosti

Zjištěné optimální podmínky byly využity pro změření kalibračních závislostí 5-amino-6-nitrochinolinu.

Podmínky měření kalibračních závislostí byly následující : kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 - 5  $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm, složení mobilní fáze Brittonův-Robinsonův pufr o pH 7 : methanol v poměru 10:90 (v/v). Dávkováno bylo 20  $\mu\text{l}$  roztoku studované látky v methanolu.

#### 3.3.1 Spektrofotometrická detekce

UV spektrometrická detekce probíhala při 295 nm. Proměřovány byly koncentrace v rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4}$   $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Získané parametry závislostí jsou uvedeny v tabulkách 3.2 a 3.3. Dosažený limit detekce  $L_D = 1,1 \cdot 10^{-7}$   $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  byl stanoven jako množství analytu poskytující pík, jehož výška se právě rovná trojnásobku absolutní hodnoty šumu. Na obr. 3.6 a 3.7 jsou uvedeny kalibrační přímky v nejnižším koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6}$ , na obr. 3.8 a 3.9 jsou uvedeny tytéž závislosti zpracované v logaritmické formě v celém kalibračním rozmezí.

Kalibrační závislosti jsou lineární v celé měřené oblasti koncentrací a korelační koeficienty se pohybují v intervalu 0,9998 až 0,9920. Linearitu závislostí potvrzují i směrnice logaritmických závislostí, jejichž hodnota je blízká jedné. Ze získaných parametrů kalibračních závislostí vyplývá, že je výhodnější použití plochy píku, což je důsledkem nesymetrie píků.



**Tab. 3.2** Parametry kalibračních závislostí 5-A6-NQ pro HPLC s UV spektrometrickou detekcí při 295 nm. Vyhodnoceno z ploch píků.

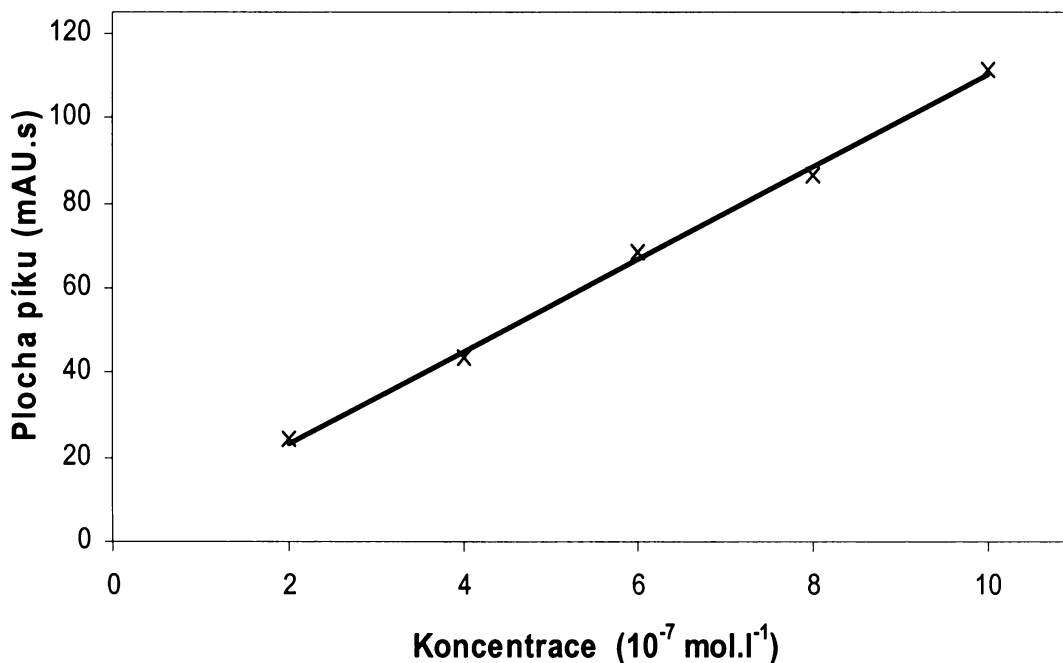
koncentrační rozmezí (mol.l <sup>-1</sup> )	směrnice (AU.s.mol <sup>-1</sup> .l)	úsek (mAU.s)	R <sup>2</sup>
1.10 <sup>-5</sup> – 1.10 <sup>-4</sup>	102610	-2,3	0,9996
1.10 <sup>-6</sup> – 1.10 <sup>-5</sup>	105590	-2,3	0,9998
2.10 <sup>-7</sup> – 1.10 <sup>-6</sup>	108790	1,5	0,9977
2.10 <sup>-7</sup> – 1.10 <sup>-4</sup>	102520	3,8	0,9998

Závislost log *A* na log *c* : směrnice : 0,98 ; úsek : 7,9 ; R<sup>2</sup> : 0,9997

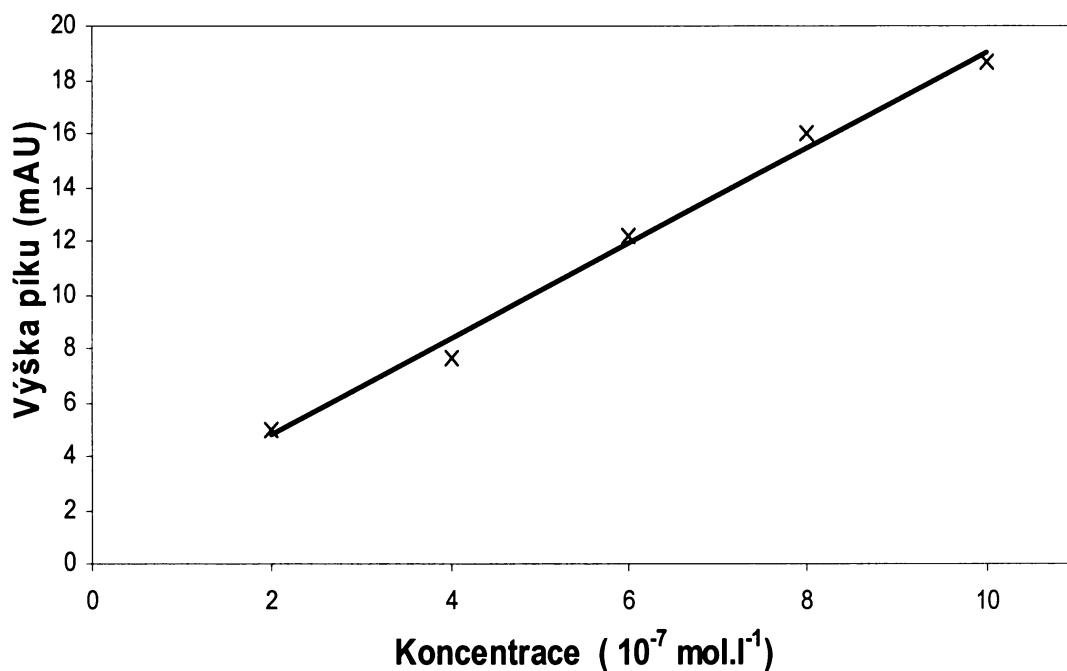
**Tab. 3.3** Parametry kalibračních závislostí 5-A6-NQ pro HPLC s UV spektrometrickou detekcí při 295 nm. Vyhodnoceno z výšek píků.

koncentrační rozmezí (mol.l <sup>-1</sup> )	směrnice (AU.mol <sup>-1</sup> .l)	úsek (mAU)	R <sup>2</sup>
1.10 <sup>-5</sup> – 1.10 <sup>-4</sup>	13386	-0,5	0,9993
1.10 <sup>-6</sup> – 1.10 <sup>-5</sup>	13529	4,7	0,9998
2.10 <sup>-7</sup> – 1.10 <sup>-6</sup>	17790	1,2	0,9920
2.10 <sup>-7</sup> – 1.10 <sup>-4</sup>	13333	3,3	0,9997

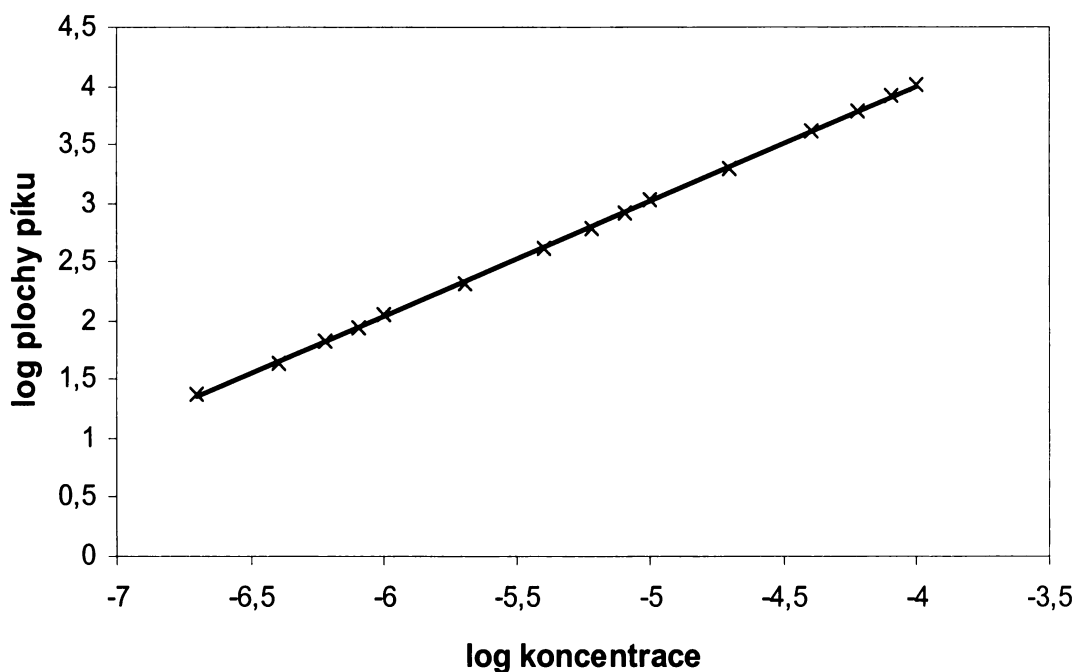
Závislost log *h* na log *c* : směrnice : 0,91 ; úsek : 6,7 ; R<sup>2</sup> : 0,9980



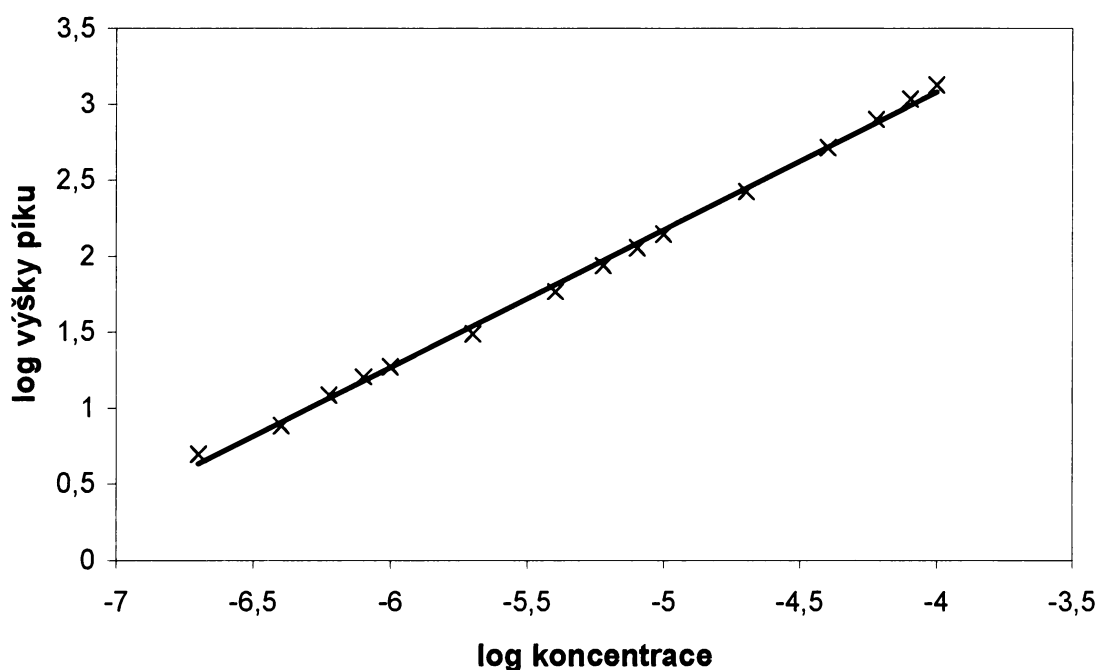
**Obr. 3.6** Kalibrační závislost 5-A6-NQ vyhodnocené z ploch píků v koncentračním rozmezí 2.10<sup>-7</sup> až 1.10<sup>-6</sup> mol.l<sup>-1</sup> (kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5 μm, 125 x 4 mm, mobilní fáze Brittonův-Robinsonův pufr o pH 7 : methanol 10:90 (v/v), dávkováno 20 μl roztoku látky v MeOH, UV detekce při 295 nm)



**Obr. 3.7** Kalibrační závislost 5-A6-NQ vyhodnocené z výšek píků v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm, mobilní fáze Brittonův-Robinsonův pufr o pH 7 : methanol 10:90 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku látky v MeOH, UV detekce při 295 nm)



**Obr. 3.8** Kalibrační závislost 5-A6-NQ v logaritmicke formě, vyhodnocené z ploch píků v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm, mobilní fáze Brittonův-Robinsonův pufr o pH 7 : methanol 10:90 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku látky v MeOH, UV detekce při 295 nm)



**Obr. 3.9** Kalibrační závislost 5-A6-NQ v logaritmické formě, vyhodnocené z výšek píků v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> (kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5 μm, 125 x 4 mm, mobilní fáze Brittonův-Robinsonův pufr o pH 7 : methanol 10:90 (v/v), dávkováno 20 μl roztoku látky v MeOH, UV detekce při 295 nm)

### 3.3.2 Elektrochemická detekce

Kalibrační závislosti byly měřeny za použití amperometrické detekce na uhlíkové pastové elektrodě při pracovním potenciálu +1,2 V. Proměřováno bylo koncentrační rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>. Závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Získané parametry závislostí jsou uvedeny v tabulkách 3.4 a 3.5. Dosažený limit detekce  $L_D = 1,6 \cdot 10^{-7}$  mol.l<sup>-1</sup> byl stanoven jako množství analytu poskytující pík, jehož výška se právě rovná trojnásobku absolutní hodnoty šumu. Na obr. 3.10 a 3.11 jsou uvedeny kalibrační přímky v nejnižším koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6}$ , na obr. 3.12 a 3.13 jsou uvedeny tytéž závislosti zpracované v logaritmické formě v celém kalibračním rozmezí.

Kalibrační závislosti jsou lineární v celé měřené oblasti koncentrací a korelační koeficienty se pohybují v intervalu 0,9998 až 0,9980. Linearitu závislosti potvrzují i směrnice logaritmických závislostí, jejichž hodnota je blízká jedné. Ze získaných parametrů kalibračních závislostí vyplývá, že je výhodnější použití plochy píku, což je důsledkem nesymetrie píků. Mez detekce je ve srovnání se spektrometrickou detekcí přibližně stejná.

**Tab. 3.4** Parametry kalibračních závislostí 5-A6-NQ pro HPLC s amperometrickou detekcí na CPE při potenciálu +1,2 V. Vyhodnoceno z ploch píků.

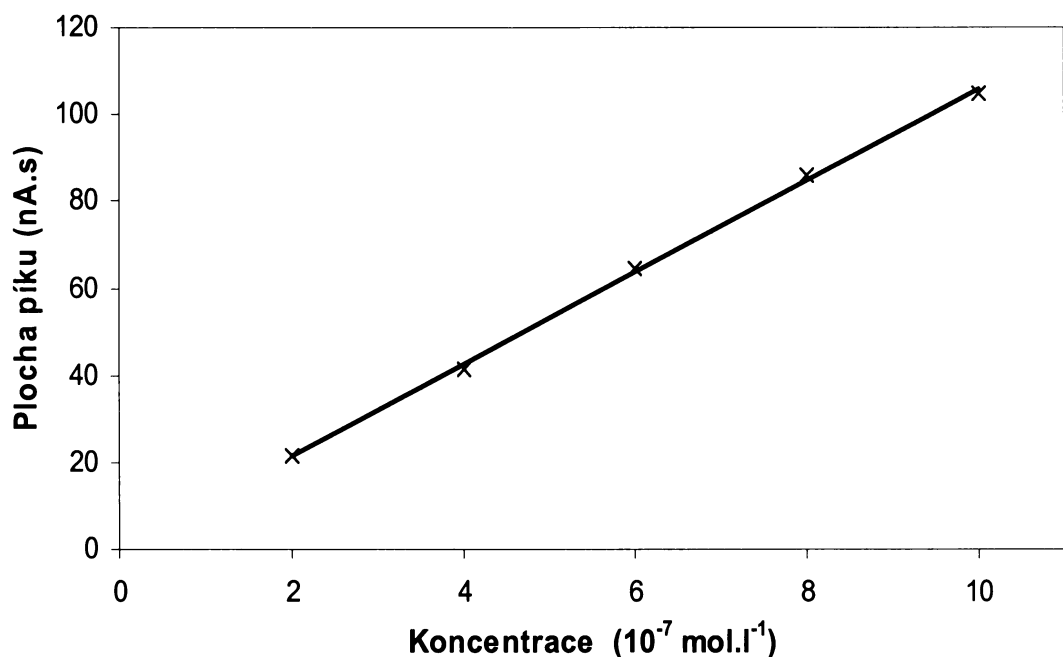
koncentrační rozmezí (mol.l <sup>-1</sup> )	směrnice (μA.s.mol <sup>-1</sup> .l)	úsek (nA.s)	R <sup>2</sup>
1.10 <sup>-5</sup> – 1.10 <sup>-4</sup>	102910	3,1	0,9994
1.10 <sup>-6</sup> – 1.10 <sup>-5</sup>	104170	1,1	0,9995
2.10 <sup>-7</sup> – 1.10 <sup>-6</sup>	105100	0,5	0,9991
2.10 <sup>-7</sup> – 1.10 <sup>-4</sup>	102920	1,8	0,9998

Závislost log *A* na log *c* : směrnice : 0,99 ; úsek : 8,0 ; R<sup>2</sup> : 0,9999

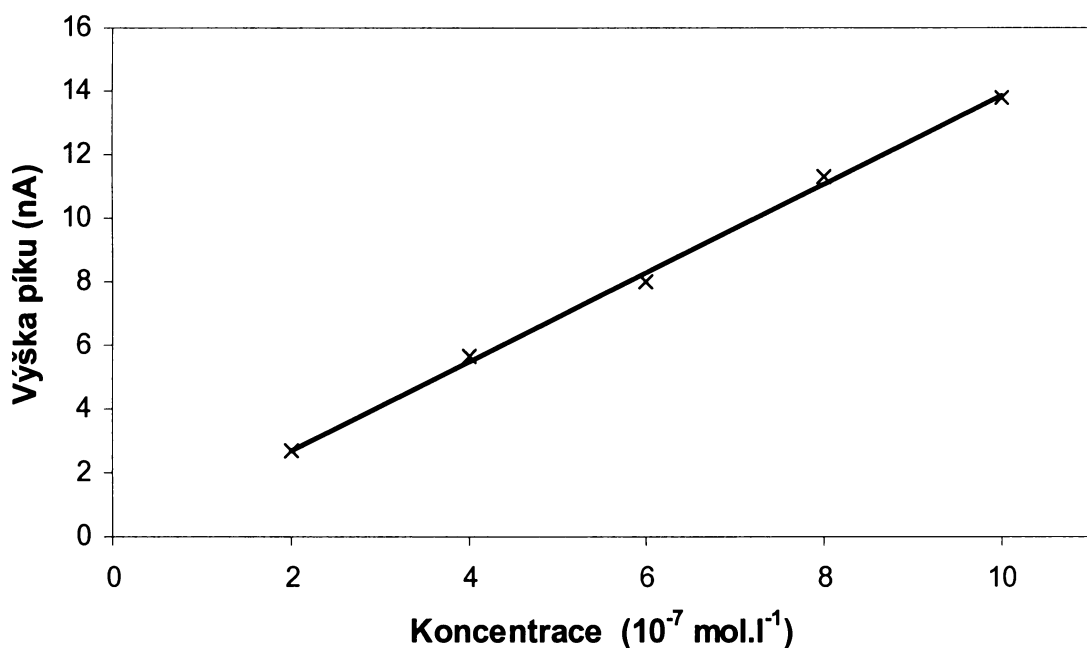
**Tab. 3.5** Parametry kalibračních závislostí 5-A6-NQ pro HPLC s amperometrickou detekcí na CPE při potenciálu +1,2 V. Vyhodnoceno z výšek píků.

koncentrační rozmezí (mol.l <sup>-1</sup> )	směrnice (μA.mol <sup>-1</sup> .l)	úsek (nA)	R <sup>2</sup>
1.10 <sup>-5</sup> – 1.10 <sup>-4</sup>	10137	0,1	0,9997
1.10 <sup>-6</sup> – 1.10 <sup>-5</sup>	10560	2,8	0,9995
2.10 <sup>-7</sup> – 1.10 <sup>-6</sup>	13965	-0,1	0,9980
2.10 <sup>-7</sup> – 1.10 <sup>-4</sup>	10102	2,8	0,9998

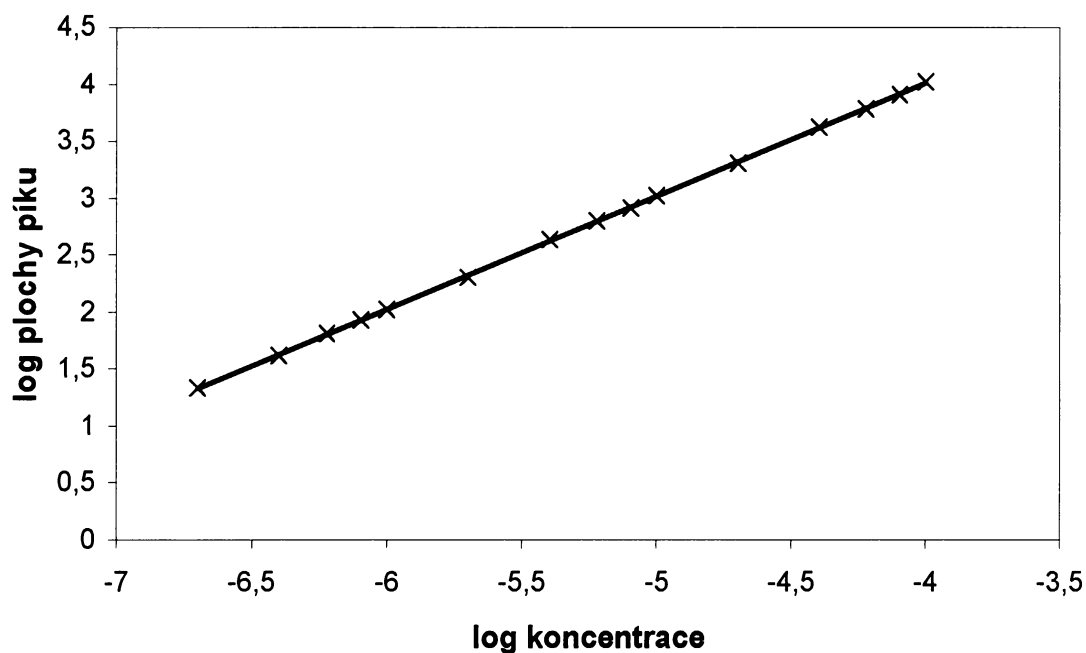
Závislost log *h* na log *c* : směrnice : 0,94 ; úsek : 6,7 ; R<sup>2</sup> : 0,9993



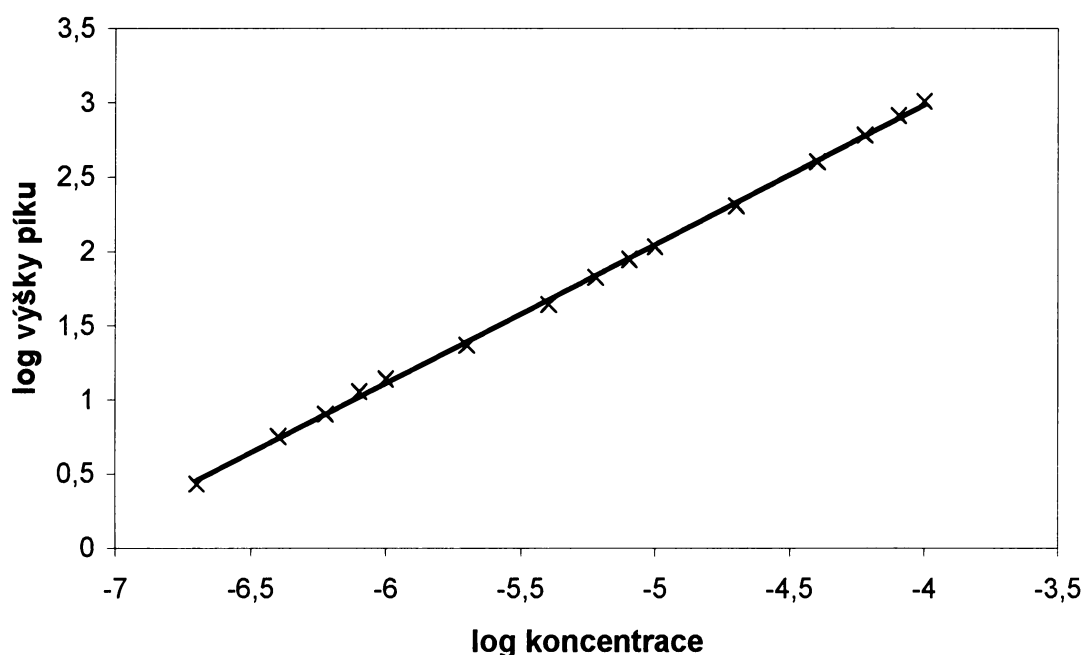
**Obr. 3.10** Kalibrační závislost 5-A6-NQ vyhodnocené z ploch píků v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm, mobilní fáze Brittonův-Robinsonův pufr o pH 7 : methanol 10:90 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku látky v MeOH, amperometrická detekce na CPE při potenciálu +1,2 V)



**Obr. 3.11** Kalibrační závislost 5-A6-NQ vyhodnocené z výšek píků v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm, mobilní fáze Brittonův-Robinsonův pufr o pH 7 : methanol 10:90 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku látky v MeOH, amperometrická detekce na CPE při potenciálu +1,2 V)



**Obr. 3.12** Kalibrační závislost 5-A6-NQ v logaritmické formě, vyhodnocené z ploch píků v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> (kolona Lichrospher® RP-18, 100 -5 μm, 125 x 4 mm, mobilní fáze Brittonův-Robinsonův pufr o pH 7 : methanol 10:90 (v/v), dávkováno 20 μl roztoku látky v MeOH, amperometrická detekce na CPE při potenciálu +1,2 V)



**Obr. 3.13** Kalibrační závislost 5-A6-NQ v logaritmické formě, vyhodnocené z výšek píků v koncentračním rozmezí  $2 \cdot 10^{-7}$  až  $1 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> (kolona Lichrospher® RP-18, 100 -5 μm, 125 x 4 mm, mobilní fáze Brittonův-Robinsonův pufr o pH 7 : methanol 10:90 (v/v), dávkováno 20 μl roztoku látky v MeOH, amperometrická detekce na CPE při potenciálu +1,2 V)

### 3.4 Opakovatelnost měření

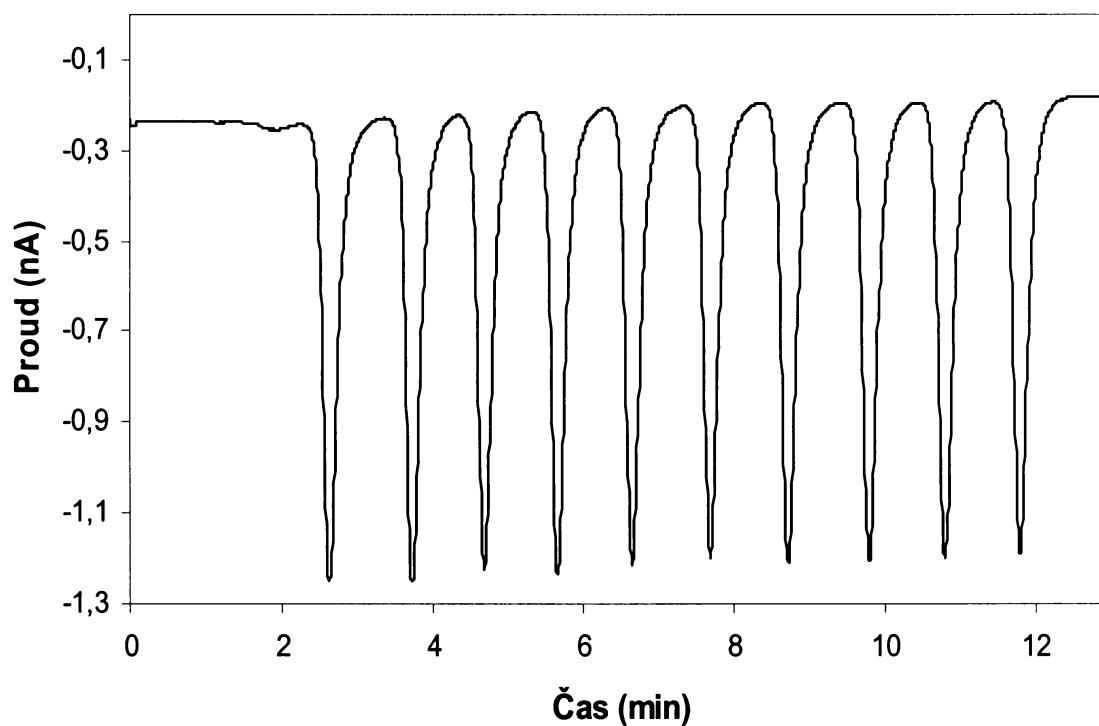
Opakovatelnost měření elektrochemické detekce byla zjištěna desetinásobným nadávkováním 20  $\mu\text{l}$  roztoku 5-A6-NQ o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  v methanolu v intervalech 1 minuty. Byly použity optimální podmínky měření tedy : kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm, mobilní fáze Britton-Robinsonův pufr o pH 7 : methanol 10:90 (v/v), potenciál CPE +1,2 V.

Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.6 a záznam chromatogramu na obr. 3.14. Naměřené plochy píků jsou vyšší v porovnání se získanými hodnotami pro měření kalibračních závislostí, což bylo pravděpodobně způsobeno použitím nové uhlíkové pasty. Stanovené relativní směrodatné odchylky jsou 1,2 % pro plochu píku a 0,8 % pro výšku píku.

**Tab. 3.6** Opakovatelnost měření elektrochemické detekce pro 5-A6-NQ na CPE při potenciálu +1,2 V (kolona Lichrospher<sup>®</sup> RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm, mobilní fáze Britton-Robinsonův pufr o pH 7 : methanol 10:90 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  v MeOH)

pík	Plocha píku (nA.s)	Výška píku (nA)
1	14839	1011
2	14889	1023
3	14465	1006
4	14753	1026
5	14758	1012
6	14470	1001
7	14980	1013
8	14946	1014
9	14947	1009
10	14825	1004

Průměr :           14790 nA.s           1012 nA  
s :                 180 nA.s            8 nA  
s<sub>r</sub> :                1,2 %                0,8 %



**Obr. 3.14** Chromatogram zjištění opakovatelnosti měření elektrochemické detekce pro 5-A6-NQ na CPE při potenciálu +1,2 V (kolona Lichrospher® RP-18, 100 -5  $\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm, mobilní fáze Brittonův-Robinsonův pufr o pH 7 : methanol 10:90 (v/v), dávkováno 20  $\mu\text{l}$  roztoku o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  v MeOH)



## 4. Závěr

Bylo prostudováno chromatografické chování 5-amino-6-nitrochinolinu v reverzním chromatografickém systému s chemicky vázaným oktadecylem s UV spektrometrickou a amperometrickou detekcí použitím uhlíkové pastové elektrody. Byla proměřena závislost retenčních charakteristik studované látky na pH mobilní fáze s využitím spektrometrické detekce při 295 nm.

Bylo prostudována závislost odezvy amperometrického detektoru s uhlíkovou pastovou elektrodou na vloženém potenciálu a pH mobilní fáze. Byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení studované látky: mobilní fáze tvořená Brittonovým-Robinsonovým pufrům o pH 7: methanol 10:90 (v/v), UV spektrometrická detekce při 295 nm, amperometrická detekce na CPE při potenciálu +1,2 V. Za těchto podmínek byly změřeny kalibrační závislosti studované látky a stanoveny meze detekce (viz tab. 7.1). Mez detekce s UV spektrometrickou detekcí a amperometrickou detekcí je přibližně stejná.

Byla zjištěna opakovatelnost měření elektrochemické detekce, stanovené relativní směrodatné odchylky jsou 1,2 % pro plochu píku a 0,8 % pro výšku píku.

**Tab. 7.1** Meze detekce 5-A6-NQ určené pomocí HPLC se spektrometrickou a elektrochemickou detekcí.

$L_D$ (mol.l <sup>-1</sup> ) spektrometrická detekce	$L_D$ (mol.l <sup>-1</sup> ) elektrochemická detekce
1,1.10 <sup>-7</sup>	1,6.10 <sup>-7</sup>

## 5. Literatura

1. Stratil, P.; Kubáň, V.: Princip karcinogeneze a přírodní karcinogenní sloučeniny v potravinách. *Chemické Listy* **98**, 379-387 (2004).
2. White, P.A.: The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in komplex mixtures. *Mutation Research* **515**, 85-98 (2002).
3. www.sigmaaldrich.com, staženo 8.3.2006.
4. www.osha.gov, ntp.nihs.gov, staženo 8.3.2006.
5. González, M.P.; Díaz, H.G.; Cabrera, M.A.; Ruiz, R.M.: A novel approach to predict a toxicological properte of aromatic compounds in the Tetrahymena pyroformis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12**, 735-744 (2004).
6. Karamkam, M.; Dollé, F.; Valette, H.; Basret, L.; Bromoullé, Y.; Hinnen, F.; Vaufrey, F.; Franclin, C.; Baur, S.; Coulon, Ch.; Ottaviani, M.; Delaforge, M.; Loc'h, Ch.; Bottlaender, M.; Crouzel, Ch.: Synthesi of flourine-18-labelled derivates of 6-nitroquipazine as a radioligand for the in vivo serotonin transporter imaging with PET. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **10**, 2611-2623 (2002).
7. Goda, F.E.; Aziz, A.; Ghoneim, H.A.: Synthesis and biological evaluation of novel 6-nitro-5-substitued aminoquinolines as local anesthetic and anti-arrhythmic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13**, 3175-3183 (2005).
8. Weisburger, J.H.: Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutation Research*, **506-507**, 9-20 (2002).
9. tomaniová, M.; Kocourek, V.; Hajšlová, J.: polycyklické aromatické uhlovodíky v potravinách. *Chemické Listy* **91**, 357-366 (1997).
10. Barek, J.; Bencko, V.; Cvačka, J.; Šuta, M.: Znečištění životního prostředí automobilovými emisemi. *Chemické Listy* **92**, 794-798 (1998).

11. Barek, J.; Cvačka, J.; Moreira, C.; Zima, J.: Metody stanovení genotoxických nitroderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků. *Chemické Listy* **90**, 805-817 (1996).
12. Stiborová, M.: Aromatické nitrosloučeniny: kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka. *Chemické Listy* **96**, 784-791 (2002).
13. Barek, J.; Cvačka, J.; Muck, A.; Quaiserová, V.; Zima, J.: Polarographic and voltammetric detection of carcinogenic nitro and amino derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Electroanalysis* **13**, 799-803 (2001).
14. Barek, J.; Mejstřík, V.; Švagrová, I.; Zima, J.: Měření expozice polycyklických aromatických uhlovodíků na základě monitorování jejich metabolitů v tělních tekutinách. *Chemické Listy* **88**, 341-352 (1994).
15. Barek, J.; Pumera, M.; Muck, A.; Kadeřábková, M.; Zima, J.: Polarographic and voltammetric determination of selected nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytica Chimica Acta* **393**, 141-146 (1999).
16. Zima, J.; Stoica, A.I.; Zitová, A.; Barek, J.: Voltammetric determination of selected aminoquinolines using carbon paste electrode. *Electroanalysis*, **18**, 158-162 (2005).
17. Barek, J.; Moreira, J.C.; Zima, J.: Modern electrochemical methods for monitoring of chemical carcinogens. *Sensors* **5**, 148-158 (2005).
18. Švancara, I.; Vytrás, K.: Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické Listy* **88**, 138-146 (1994).
19. Švancara, I.; Ogorevc, B.; Hočevar, S.B.; Vytrás, K.: Perspectives of carbon paste electrodes in stripping potentiometry. *Analytical Sciences* **18**, 301-305 (2002).
20. Švancara, I.; Schachl, K.: Testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemické Listy* **93**, 490-499 (1999).

21. German, N.; Armalis, S.; Zima, J.; Barek, J.: Voltammetric determination of fluoren-9-ol and 2-acetamidofluorene using carbon paste electrodes. *Collect. Czech. Chem. Commun* **70**, 292-304 (2005).
22. Vytřas, K.; Švancara, I.: Aplikace uhlíkových pastových elektrod v elektroanalýze. *Chemické Listy* **88**, 412-422 (1994).
23. Sýkora, V.; Zátka, V.: Příruční tabulky pro chemiky. *SNTL*, Praha (1967).
24. [www.chemfinder.com](http://www.chemfinder.com), Data z PhysProp Database, staženo 8.3.2006.
25. Štulík, K. a kol.: Analytické separační metody. *Karolinum*, Praha (2005).
26. Hříbal, Z.: HPLC separace chinolinu a jeho nitro- a aminoderivátů, *Diplomová práce*, UK, Praha (2001).
27. Vláčil, F. a kol.: Příklady z chemické a instrumentální analýzy, *Informatorium*, Praha (1991).