

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Markéta Krejčová

OPTIMALIZACE ELEKTROCHEMICKÉHO STANOVENÍ
AMINODERIVÁTŮ POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH
UHLOVODÍKŮ POMOCÍ CHEMOMETRICKÝCH METOD

Optimization of electrochemical determination of
aminoderivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons using
chemometric methods

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Hana Dejmková

Praha 2013

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 26. května 2013.

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Haně Dejmkové za skvělé vedení, cenné rady a především za trpělivost a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat celému osazenstvu laboratoře č. 112, které mi zpříjemňovalo práci a vytvářelo skvělou atmosféru. Velké díky samozřejmě patří i mým rodičům, kteří mi umožnili studium na vysoké škole a kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Abstrakt

V této práci byly optimalizovány separační podmínky směsi aminoderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků (APAH) metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s amperometrickou detekcí. Pro účel porovnání byl do série k elektrochemickému detektoru zapojen i detektor spektrofotometrický. K amperometrickému stanovení byl zvolen tříelektrodový systém zapojený ve wall-jet uspořádání s uhlíkovou pastovou pracovní elektrodou.

Pro účel optimalizace byla využita metoda experimentálního plánu, konkrétně Boxův-Behnkenův plán využívající tři úrovně hodnot jednotlivých parametrů. Zkoumanými parametry byly pH acetátofosfátového pufru, počáteční podíl methanolu v mobilní fázi a jeho gradient. Pro vyhodnocení optimálního kompromisu mezi celkovou dobou separace a rozlišením dvou sousedních píků byla použita Derringerova funkce vhodnosti.

Pomocí amperometrického detektoru byly získány přibližně desetkrát nižší meze detekce než s použitím detektoru spektrofotometrického. Po zakoncentrování směsi látek v říční vodě pomocí extrakce na tuhé fázi bylo nejnižší meze detekce dosaženo u 2-aminobifenyly ($2 \cdot 10^{-10}$ g ml⁻¹), nejvyšší u 2-aminofluorenu ($1 \cdot 10^{-9}$ g ml⁻¹).

Abstract

In this work, separation conditions of aminoderivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons (APAH) mixture were optimized by high performance liquid chromatography with amperometric detection. For the purpose of comparison, the spectrophotometric detector was connected in series with the electrochemical detector. Three-electrode system in the wall-jet arrangement with carbon paste working electrode was chosen for amperometric determination.

For the purpose of the optimization, design of experiment was employed, specifically Box-Behnken Design which uses three levels of values of each parameter. Studied parameters were pH of acetate-phosphate buffer, initial percentage of the methanol in mobile phase and its gradient. Derringer's desirability function was applied to evaluate the compromise between the analysis time and the resolution of neighbouring peaks.

Using the amperometric detection, ten times lower limits of detection were achieved in comparison with spectrophotometric detection. After preconcentration of the mixture of analytes in the river water by the solid phase extraction, the lowest limit of detection was gained for 2-aminobiphenyl ($2 \cdot 10^{-10}$ g ml⁻¹) and the highest for 2-aminofluorene ($1 \cdot 10^{-9}$ g ml⁻¹).

Klíčová slova

Aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Extrakce na tuhé fázi

Amperometrická detekce

Uhlíková pastová elektroda

Plánování experimentu

Boxův-Behnkenův design

Key words

Aminoderivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons

High performance liquid chromatography

Solid phase extraction

Amperometric detection

Carbon paste electrode

Design of experiment

Box-Behnken design

Obsah

Seznam použitých zkratek	8
1. Úvod	10
1.1. Cíl práce	10
1.2. Aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků	11
1.3. Amperometrická detekce s wall-jet uspořádáním	12
1.4. Optimalizace pomocí plánování experimentu	14
2. Experimentální část	17
2.1. Použité chemikálie	17
2.1.1. Studované látky	17
2.2. Aparatura	19
2.2.1. Sestava pro HPLC	19
2.2.2. Extrakce na tuhé fázi	19
2.2.3. Další přístroje a programy	19
2.3. Pracovní postupy	20
2.3.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou a amperometrickou detekcí	20
2.3.2. Extrakce na tuhé fázi	22
2.3.3. Kalibrační závislosti	22
3. Výsledky a diskuze	23
3.1. Optimalizace separace	23
3.1.1. Plánování experimentu	23
3.2. Optimalizace podmínek detekce	26
3.3. Optimalizace extrakce na tuhé fázi	28
3.4. Kalibrační závislosti	29
3.4.1. Kalibrační závislosti bez předchozího zakoncentrování analytu	29
3.4.2. Kalibrační závislosti po zakoncentrování směsi pomocí SPE	38
4. Závěr	42
5. Literatura	43

Seznam použitých zkratk

A	anilin
2-AA	2-aminoantracen
2-AB	2-aminobifenyl
4-AB	4-aminobifenyl
ED	elektrochemická detekce
2-AF	2-aminofluoren
1-AN	1-aminonaftalen
2-AN	2-aminonaftalen
ANOVA	analýza rozptylu
APAH	aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků
EA	ethylanilin
2-NA	2-nitroanilin
<i>c</i>	koncentrace
C. A. S.	Chemical Abstract Services
CE	kapilární elektroforéza
CCD	středově složený plán (Central Composite Design)
CPE	uhlíková pastová elektroda
CRF	chromatografická odezвовá plocha (Chromatography Response Surface)
DME	kapající rtuťová elektroda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOE	plánování experimentu (Design of Experiment)

<i>E</i>	potenciál
FIA	průtoková injekční analýza
GC-MS	plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-ED	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
<i>I</i>	proud
λ	vlnová délka
MF	mobilní fáze
NPAH	nitroderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi
OVAT	jedna proměnná v čase (One-Variable-At-Time)
p.a.	pro analýzu
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
RSM	metodologie odezvové plochy (Response Surface Methodology)
SPE	extrakce na tuhé fázi
T	<i>o</i> -toluidin
t_R	retenční čas
UV	spektrofotometrická detekce

1. Úvod

1.1. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je vyvinout metodu stanovení směsi deseti aminoderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenou fází (RP-HPLC) za použití amperometrické detekce v porovnání s detekcí spektrofotometrickou. Dalším záměrem této práce je ověření funkčnosti vyvinuté metody pro povrchové vody a zjištění mezí detekce jednotlivých látek. Pro účel optimalizace podmínek separace je v této práci použita statistická metoda plánování experimentu.

1.2. Aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků

Všechny stanovované analyty patří do skupiny aminoderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků (APAH), které jsou známými chemickými mutageny a karcinogeny, ať už prokázanými nebo podezřelými. 4-Aminobifenyl, 2-aminonaftalen a *o*-toluidin jsou podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) klasifikovány jako látky prokazatelně karcinogenní pro člověka ^[1]. Anilin a 1-aminonaftalen patří podle klasifikace IARC do skupiny 3 (látky, které není možno klasifikovat jako karcinogenní pro člověka) ^[1]. Mutagenita 2-aminobifenyly prokázána nebyla ^[2], zatímco 4-aminobifenyl je kromě své prokázané karcinogenity i vysoce mutagenní ^[3]. APAH jsou v lidském těle aktivovány různými enzymy, kovalentně se vážou na některé báze DNA a vytváří tak komplexy zodpovědné za mutace vedoucí k různým druhům rakoviny – zejména rakoviny močového měchýře ^[4, 5].

Tyto aromatické aminy se často vyskytují jak v pracovním, tak v životním prostředí, a je prakticky nemožné se jejich expozici vyhnout. Navíc jsou APAH metabolity neméně nebezpečných nitroderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků, vznikají jejich redukcí za nepřístupu kyslíku. Díky této metabolické přeměně je možné APAH využít jako biomarkery pro sledování expozice nitrovaným PAH ^[6]. Mutagenní a karcinogenní projevy obou těchto skupin mohou být ještě umocněny přítomností původních PAH ^[7, 8, 9].

APAH se v životním prostředí vyskytují především v důsledku vlivu antropogenní činnosti jako meziprodukty v nejrůznějších výrobních procesech, například při výrobě barviv, pesticidů, polymerů nebo průmyslových chemikálií. Tyto látky se do okolního prostředí dostávají zejména díky své vysoké polaritě. Přítomnost APAH v potravinářských barvivech, barvách na vlasy, výparech zahříváných kuchyňských olejů a palivech vede k přímé expozici člověka a je tedy nutné využívání těchto látek monitorovat a regulovat ^[10, 11].

S tímto faktem je spojena vysoká poptávka po metodách stanovení schopných spolehlivě detekovat stopová množství APAH. Pro tento účel jsou používány především chromatografické metody, jako plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickým detektorem (GC-MS) ^[12] nebo HPLC s fluorimetrickou ^[13] či spektrofotometrickou detekcí ^[14]. Nevýhodou využití plynové chromatografie pro toto stanovení je vzhledem k polárnímu charakteru aromatických aminů nutnost jejich předchozí derivatizace. Často

bývají APAH stanovovány také pomocí HPLC ^[15], kapilární elektroforézy (CE) ^[16] nebo průtokové injekční analýzy (FIA) ^[17] s elektrochemickou detekcí. Užitečnou alternativou pro stanovení těchto látek jsou elektroanalytické metody, jako je diferenční pulzní voltametrie, diferenční pulzní polarografie nebo anodická voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě ^[18]. Stanovení na uhlíkové pastové elektrodě je pro tento druh látek vhodné zejména díky jejich snadné anodické oxidaci ^[9, 19].

1.3. Amperometrická detekce s wall-jet uspořádáním

Všechny detektory by měly splňovat požadavky jako je vysoká citlivost a nízká úroveň šumu, linearita odezvy, stabilita signálu, reprodukovatelnost, selektivita a robustnost vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty. Amperometrický detektor patří do skupiny elektrochemických detektorů, které se v průtokových metodách využívají díky nízké pořizovací ceně a svým výhodným vlastnostem, jako je jejich vysoká citlivost, selektivita a rychlost odezvy, nevýhodou je naopak pasivace elektrod a tedy i potřeba jejich čištění. Amperometrickým detektorem je měřena proudová odezva (závislá na celkové koncentraci analytu) za konstantního potenciálu vloženého na pracovní elektrodu.

Amperometrická detekce je v současné době čím dál častěji používaná ve spojení s HPLC jak s normálními, tak s obrácenými fázemi. Pro některé látky je tento druh stanovení mnohem vhodnější než použití HPLC s klasickým UV nebo fluorescenčním detektorem ^[20].

Wall-jet uspořádání bylo poprvé popsáno Matsudou ^[21] a později bylo aplikováno i na průtokové metody. Oproti jiným uspořádáním elektrochemické detekce umožňuje wall-jet uspořádání ponechat velký objem průtokové cely, díky kterému je usnadněna samotná konstrukce; měřicím prostorem je přitom jen prostor mezi průtokovou kapilárou a pracovní elektrodou, který může být minimální a zabraňuje rozmývání píků v důsledku konvektivní difúze ^[22]. Amperometrické detekce právě s wall-jet uspořádáním bývá často používáno v průtokových metodách. ^[11, 23, 24]

Jako pracovní elektrodu je při HPLC-ED možno použít uhlíkovou pastovou elektrodu (CPE) ^[8, 9, 11, 25]. Uhlíková pastová elektroda byla vynalezena a popsána v roce 1958 Ralphem Adamsem. Záměrem jeho výzkumu však nebyla tato konkrétní elektroda, ale příprava obnovitelné uhlíkové elektrody, která by byla alternativou ke kapající rtuťové

elektrodě (DME) pro anodickou oxidaci organických složek, kde DME není možné využít [26].

Uhlíková pasta je vytvořena smícháním práškového uhlíku a pastovací kapaliny, která zajišťuje spojení jednotlivých mikročástic uhlíku. Nejčastěji používaný je spektroskopický grafit (5 – 20 μm), dalšími možnostmi jsou skelný uhlík s kulatými částicemi nebo uhlíkové nanotrubičky [27]. Mezi hojně využívané pastovací kapaliny patří minerální oleje, alifatické i aromatické uhlovodíky [26] a jejich halogenderiváty, silikonové oleje [26] nebo anorganické kyseliny [28]. Pasta je připravována nejčastěji v poměru 1 g práškového uhlíku ku 0,5 – 1 ml pastovací kapaliny [29].

Uhlíkové pasty je možné modifikovat pomocí nejrůznějších látek – chemických sloučenin, měničů iontů, i substrátů z živých organismů (řasy, bakterie). Modifikátor může být přímo rozpuštěn v pastovací kapalině nebo se přimíchává do pasty při její homogenizaci. Obvykle bývá k modifikaci používána jedna látka, ale je možné uhlíkovou pastu upravovat i pomocí více složek. Příkladem vícesložkových modifikátorů jsou uhlíkové pasty používané jako biosenzory, které obsahují enzymy s příslušnými mediátory. V důsledku modifikace uhlíkových pastových elektrod bylo značně rozšířeno jejich analytické využití [30].

Výhodou CPE je nízký proud pozadí, široké potenciálové okno, snadná obnova povrchu elektrody, nízká pořizovací cena, jednoduchá příprava uhlíkové pasty a možnost využití pro širokou škálu analytů. Nevýhodou je například obtížnost měření v katodické oblasti potenciálu nebo menší mechanická odolnost CPE při vyšších průtokových rychlostech. Jednou z dalších nevýhod CPE v případě průtokových metod je vymývání pastovací kapaliny z uhlíkové pasty v důsledku vysoké koncentrace organických složek (například methanolu, acetonitrilu) v mobilní fázi [24].

1.4. Optimalizace pomocí plánování experimentu

Optimalizace v analytické chemii se často provádí metodou OVAT (One-variable-at-time), kdy je sledován vliv jedné proměnné na požadovanou odpověď, zatímco další parametry jsou udržovány na konstantní hodnotě. Takto zjištěné optimum v sobě nezahrnuje vliv interakcí mezi jednotlivými optimalizovanými parametry. Nevýhodný je také vysoký počet experimentů nutných pro zjištění požadovaných podmínek stanovení, v důsledku čehož rostou náklady a časová náročnost provedení. Z těchto důvodů jsou v dnešní době stále více používány multifaktorové statistické metody. Pomocí metod plánování experimentu (Design of Experiment, DOE) je možné, na rozdíl od OVAT, získat informace o celé doméně, ve které je experiment prováděn ^[31].

Nejčastěji používaným přístupem k plánování experimentu je pro účel modelování plánu a optimalizace metodologie odezvy plochy (Response Surface Methodology, RSM), která je kombinací matematických a statistických postupů založených na použití polynomiální rovnice na experimentální data. Tuto metodu je výhodné použít, pokud je požadovaná odpověď ovlivněna několika různými parametry. Cílem RSM je tyto parametry souběžně optimalizovat pro dosažení co nejlepších výsledků ^[31, 32, 33].

Pro použití DOE je nejprve nutné stanovit cíl experimentu, tedy určit požadovanou odpověď, jako je např. plocha, výška, poměr signál / šum, dále pak vybrat parametry, které by mohly mít na odpověď nějaký vliv, a stanovit jejich hodnotové rozmezí. Tyto parametry mohou mít jak kvalitativní (např. druh chemikálie), tak kvantitativní (např. tlak, teplota) podobu. Použití jednoho experimentálního plánu často nevede k vyřešení daného problému, pokud je tomu tak, je třeba problém přeformulovat (odstranit parametry, které nemají statistický vliv na experiment, modifikovat model experimentu, ...) ^[33].

Rozhodujícím krokem optimalizace je modelování, tedy samotné nalezení polynomiální rovnice, ze které je pak možné pomocí ANOVA testů zjistit optimální hodnoty studovaných parametrů. Jako podklad pro modelování slouží výsledky experimentů, které byly vybrány daným experimentálním plánem. Pro naplánování těchto experimentů je důležité vybrat vhodný typ experimentálního plánu. Příkladem může být dvou-úrovňový (2^k) nebo tří-úrovňový (3^k) faktoriální plán, Boxův-Behnkenův, Doehlertův nebo středově složený (central composite design, CCD) plán ^[31].

V případě velkého množství parametrů je výhodné provést před samotným modelováním orientační (screeningové) modelování s omezeným počtem hodnot jednotlivých parametrů a případně jednodušším experimentálním plánem, pomocí kterého jsou určeny statisticky nevýznamné parametry, které potom nemusí být při optimalizaci brány v úvahu.

Faktoriální design, typicky 2^k a 3^k faktoriální, je jedním z nejjednodušších experimentálních plánů, pro který je počet parametrů roven a^k , kde a je počet hodnot parametrů a k počet studovaných parametrů. Nevýhodou 2^k a 3^k plánu je omezená možnost použití v RSM při počtu parametrů vyšším než dva, v tomto případě je nutné provést větší počet experimentů a tím tyto experimentální plány ztrácí svoji účinnost. Pokud je ovšem třeba optimalizovat dva parametry, je 3^k plán srovnatelně efektivní s CCD. V případě Boxova-Behnkenova plánu je možné optimalizovat více faktorů současně s větší účinností a ekonomičtěji než je schopen odpovídající 3^k plán. Hodnoty všech faktorů musí být upraveny na tři hladiny, mezi nimiž je rozmezí hodnot vždy stejné. Zatímco CCD je v analytické chemii rozšířenou metodou optimalizace, Boxův-Behnkenův plán je používán méně. CCD je experimentální plán složený ze dvou druhů plánů a centrálního bodu. Jedním z těchto plánů je úplný nebo částečný faktoriální plán, druhým hvězdicový plán, studované parametry CCD mají hodnoty uspořádané na pěti hladinách. Posledním jmenovaným je Doehlertův plán, který je v porovnání s dalšími zmiňovanými plány mnohem praktičtější a účinnější. Jednou z výhod tohoto plánu je potřeba menšího množství experimentálních bodů. Každý parametr je možné optimalizovat na jiném počtu hladin. Doehlertův plán je v posledních letech čím dál více používaný právě kvůli jeho efektivitě v porovnání s ostatními experimentálními plány^[31, 33].

Pokud je třeba optimalizovat více odpovědí najednou, je vhodné použít Derringerovu funkci vhodnosti, která je nejdůležitější a nejpoužívanější optimalizační multikriteriální metodou analytických postupů. Základem této metody je vytvoření funkce vhodnosti pro každou odpověď zvlášť. Každý měřený parametr spojený s každou optimalizovanou odpovědí musí být převeden na bezrozměrnou proměnnou na stupnici vhodnosti. Funkce vhodnosti nabývá hodnot 0 a 1, kde 0 značí nepřijatelnou hodnotu a 1 hodnotu žádanou. Dalším krokem je výpočet celkové kvality vynásobením jednotlivých hodnot vhodnosti získaných pro dané parametry. Pokud má jeden parametr Derringerovy funkce nepřijatelnou hodnotu, má nepřijatelnou hodnotu i celkový produkt. Výhodou aplikace Derringerovy funkce vhodnosti v analytické chemii je její vysoká účinnost

a ekonomičnost ^[31, 34]. Ve spojení s HPLC se Derringerova funkce využívá často pro zjištění optimálního kompromisu mezi dobou analýzy a rozlišením sousedních píků [34, 35, 36, 37].

2. Experimentální část

2.1. Použité chemikálie

2.1.1. Studované látky

Anilin

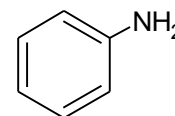
C.A.S. Name: Benzenamine

C.A.S. Registry Number: 62-53-3

C_6H_7N

zkratka: A

čistota 99,5 %; Sigma Aldrich



2-Aminoantracen

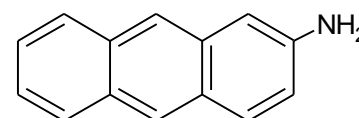
C.A.S. Name: 2-Anthracenamine

C.A.S. Registry Number: 613-13-8

$C_{14}H_{11}N$

zkratka: 2-AA

čistota 96 %; Sigma-Aldrich



2-Aminobifenylyl

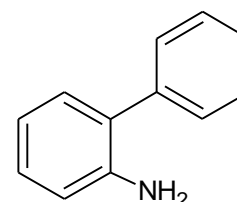
C.A.S. Name: 2-Aminobiphenyl

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

$C_{12}H_{11}N$

zkratka: 2-AB

čistota 97 %; Sigma-Aldrich



4-Aminobifenylyl

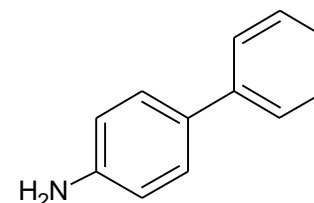
C.A.S. Name: 4-Aminobiphenyl

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

$C_{12}H_{11}N$

zkratka: 4-AB

čistota 98 %; Sigma-Aldrich



2-Aminofluoren

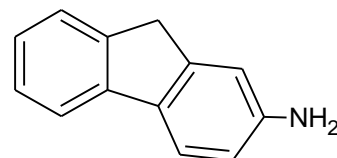
C.A.S. Name: Fluoren-2-amine

C.A.S. Registry Number: 153-78-6

$C_{13} H_{11} N$

zkratka: 2-AF

čistota 98 % Sigma-Aldrich



1-Aminonaftalen

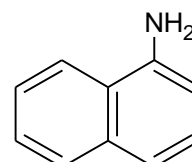
C.A.S. Name: 1-Naphthalenamine

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

$C_{10} H_9 N$

zkratka: 1-AN

čistota 99 %; Sigma-Aldrich



2-Aminonaftalen

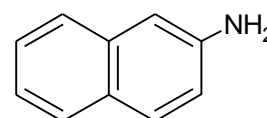
C.A.S. Name: 2-Naphthalenamine

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

$C_{10} H_9 N$

zkratka: 2-AN

čistota 99 %; Sigma-Aldrich



2-Ethylanilin

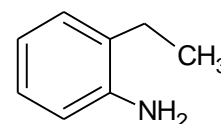
C.A.S. Name: 2-Ethylbenzenamine

C.A.S. Registry Number: 578-54-1

$C_8 H_{11} N$

zkratka: 2-EA

čistota 98 %; Sigma-Aldrich



2-Nitroanilin

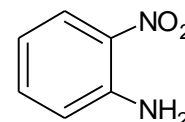
C.A.S. Name: 2-Nitrobenzenamine

C.A.S. Registry Number: 88-74-4

$C_6 H_6 N_2 O_2$

zkratka: 2-AN

čistota 98 %; Sigma-Aldrich



***o*-Toluidin**

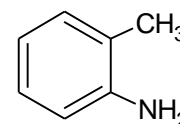
C.A.S. Name: 2-Methylbenzenamine

C.A.S. Registry Number: 95-53-4

C₇ H₉ N

zkratka: T

čistota 99 %; Sigma-Aldrich



2.2. Aparatura

2.2.1. Sestava pro HPLC

- gradientová pumpa Beta 10 (Ecom, Česká republika)
- degasser DG 4014 (Ecom, Česká republika)
- dávkovač se smyčkou o objemu 20 µl (Ecom, Česká republika)
- předkolonka LiChroCART[®] 4-4 Purospher RP-18 (Merck, Německo)
- kolona LiChroCART[®] 250-4 Purospher RP-18 (5µm) (Merck, Německo)
- UV-VIS spektrofotometrický detektor Sapphire 600 (Ecom, Česká republika)
- amperometrický detektor ADLC 2 (Laboratorní přístroje, Praha, Česká republika)
- počítačový program Clarity Chromatography Station (DataApex, Praha, Česká republika) pracující v prostředí Windows XP (Microsoft, USA)

2.2.2. Extrakce na tuhé fázi

- extrakční kolonky LiChrolut[®] EN 200 mg/3 ml (Merck, Německo) na bázi poly(styren-divinylbenzenu)
- dvanáctimístný vakuový extrakční rozvod

2.2.3. Další přístroje a programy

- spektrofotometr Agilent Technologies 8453
- pH metr – Conductivity and pH meter 3510 (Jenway, UK) s kombinovanou skleněnou elektrodou
- magnetická míchačka – Magnetic Stirrer MS 3000 (Jenway, UK)
- optimalizační program Minitab 16 (Minitab Inc., USA)

2.3. Pracovní postupy

2.3.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou a amperometrickou detekcí

Roztoky A, 2-AA, 2-AB, 4-AB, 2-AF, 1-AN, 2-AN, EA, 2-NA a T o koncentraci 1 mg ml^{-1} byly připraveny rozpuštěním daného množství pevné látky v 10 ml acetonitrilu (gradient grade for liquid chromatography, LiChrosolv®, Merck, Německo).

Zásobní roztok (směs látek o koncentraci $100 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) byl připraven smísením 500 μl každého zásobního roztoku jednotlivých látek. Pro nástřik do kolony byl používán desetkrát zředěný roztok. Pro ředění byla použita směs methanolu (gradient grade for liquid chromatography, LiChrosolv®, Merck, Německo) a deionizované vody (Millipore Q-plus systém, Millipore, USA) v poměru 1:1. Pro identifikaci jednotlivých látek byly připraveny roztoky těchto látek o odpovídající koncentraci.

Acetátosfátový pufr představovala směs kyseliny octové (99%, čistota p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika) a kyseliny *o*-fosforečné (85%, čistota p.a., Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika), každá o koncentraci 50 mmol dm^{-3} . Pro úpravu pH pufru na požadovanou hodnotu byl používán roztok hydroxidu sodného (čistota p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika) o koncentraci 100 mmol dm^{-3} . Každý den bylo pH acetátosfátového pufru, který se v HPLC sestavě mísil s methanolem, kontrolováno a upravováno na přesnou hodnotu, pH metr byl denně kalibrován.

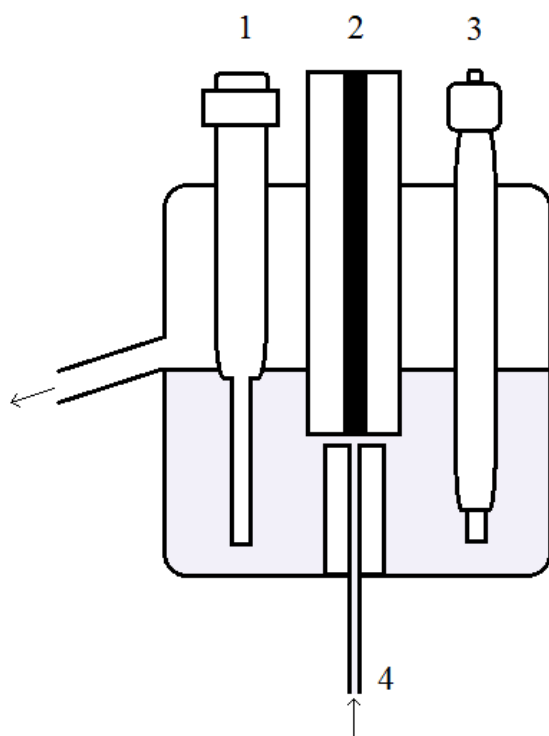
Pro separaci analytů byly používány následující optimální podmínky: průtoková rychlost mobilní fáze $0,5 \text{ ml min}^{-1}$; vlnová délka spektrofotometrického detektoru 235 nm; pH acetátosfátového pufru 2,5.

Pro optimální rozdělení látek a zároveň přijatelnou dobu separace byl použit gradient. Na počátku byl podíl methanolu v mobilní fázi 30 % a na této hodnotě byl udržován po dobu 6 min. Dále byl podíl methanolu během 24 min zvýšen na 90 %. Poměr methanolu a acetátosfátového pufru se po ukončení analýzy navrátil na původní hodnotu. Poté byla kolona promývána mobilní fází v tomto složení do ustálení základní linie amperometrického detektoru.

Amperometrický detektor byl zapojen za detektor spektrofotometrický. K amperometrické detekci byl použit tří-elektrodový systém složený z pracovní uhlíkové pastové elektrody (CPE), referenční argentchloridové elektrody s 3 mol dm^{-3} KCl

(ETP CZ R-008-05, Monokrystaly, Česká Republika) a pomocné platinové elektrody. Elektrody byly umístěny ve skleněné cele ve wall-jet uspořádání (Obr. 2.1).

Pasta pro CPE byla připravena smísením 250 mg skelného uhlíku (mikrokuličky skelného uhlíku o průměru 0,4 – 12 μm ; Alfa Aesar, USA) a 100 μl minerálního oleje (Sigma-Aldrich) ve třecí misce a plněna do teflonového těla elektrody (vnitřní průměr 2 mm). Uhlíkovou pastu bylo nutné před každým měřením otřít, z důvodu vysokého podílu methanolu v mobilní fázi, který způsoboval vymývání minerálního oleje. Bez častého otírání pasty docházelo k nežádoucímu šumu a velmi pomalému ustalování základní linie.



Obr. 2.1 Schéma „wall-jet“ uspořádání elektrod, 1 – pomocná platinová elektroda, 2 – pracovní uhlíková pastová elektroda, 3 – referenční argentschloridová elektroda, 4 – vstupní kapilára

2.3.2. Extrakce na tuhé fázi

Analyzovaný vzorek byl připraven přidavkem odpovídajícího množství zásobního roztoku do 100 ml deionizované nebo říční vody. Deionizovaná i říční voda byla předtím upravena hydroxidem sodným o koncentraci 100 mmol dm^{-3} na pH 9.

Před použitím byla každá extrakční kolonka aktivována postupným promytím 3 ml ethylacetátu (čistota p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika), 3 ml methanolu a 3 ml deionizované vody (Millipore Q-plus systém, Millipore, USA) bez použití podtlaku. Dále bylo na kolonku přivedeno 100 ml analyzovaného vzorku a překapáno rychlostí 1 ml min^{-1} za použití podtlaku. Poté byla kolonka promyta 3 ml deionizované vody a vysušena prosáváním vzduchu po dobu 1 min. Zachycené látky byly bez použití podtlaku eluovány 10 ml acetonitrilu.

2.3.3. Kalibrační závislosti

Pro zjištění parametrů kalibračních závislostí byla použita metoda lineární regrese. Mez detekce byla získána jako trojnásobek absolutní hodnoty šumu v poměru ke směrnici dané kalibrační přímkou.

3. Výsledky a diskuze

3.1. Optimalizace separace

3.1.1. Plánování experimentu

Pro optimalizaci byla využita metoda odezvové plochy. Jako významné byly vybrány tři parametry – pH acetátosfátového pufru, počáteční podíl methanolu v mobilní fázi a jeho gradient. Vzhledem k nízkému počtu parametrů byl vybrán Boxův-Behnkenův plán bez předchozího screeningu, hodnoty jednotlivých parametrů jsou uvedeny v Tab. 3.1.

Jako sledovaná odpověď byla zvolena chromatografická odezvová plocha (CRF), pomocí které byly nalezeny takové hodnoty parametrů, aby byly jednotlivé analyty dostatečně rozlišeny a zároveň doba separace nebyla příliš dlouhá. CRF byla vypočtena pomocí následujících vzorců:

$$CRF(f, g) = f \times g$$
$$f = \left(\prod_{p=1}^{n-1} S^{p,p+1} \right)^{\frac{1}{n-1}}$$
$$S^{p,p+1} = \frac{1}{1 + \exp(-b_0 \times R^{p,p+1} + b_1)}$$
$$g = \frac{1}{1 + \exp(b_2 \times t + b_3)}$$

kde f je hodnota vhodnosti rozlišení, g je hodnota vhodnosti času analýzy, $S^{p,p+1}$ je hodnota rozlišení píku převedená na hodnotu vhodnosti, $R^{p,p+1}$ je rozlišení dvou sousedních píků, p je počet píků ($p = 1, 2 \dots n-1$), t je doba analýzy, b_0 a b_1 jsou parametry rovnice definované limitními hodnotami $S^{p,p+1}$, b_2 a b_3 jsou parametry rovnice definované limitními hodnotami g [34].

Boxův-Behnkenův plán, který byl použit pro účel modelování, je založen na sérii měření, která kombinuje jednotlivé hodnoty optimalizovaných parametrů. Plán série těchto měření byl získán pomocí statistického programu Minitab 16, ve kterém byla následně naměřená data vyhodnocena za použití ANOVA testů. Výsledná matematická rovnice vyjadřuje vliv statisticky významných parametrů a jejich interakcí na CRF.

$$y = 0,014 - 0,072 \times B + 0,103 \times C + 0,130 \times B^2 + 0,111 \times C^2 + 0,090 \times B \times C$$

V této rovnici je y odpověď, B je počáteční podíl methanolu v mobilní fázi a C je gradient methanolu v mobilní fázi.

Z matematické rovnice je vidět, že významnými faktory jsou počáteční podíl a gradient methanolu v mobilní fázi, zatímco pH acetátosfátového pufru ani jeho interakce nemají statisticky významný vliv na odpověď CRF, což je pravděpodobně způsobeno tím, že tato závislost je v podstatné části svého rozsahu konstantní.

Z výsledků ANOVA testů byly zjištěny optimální podmínky separace, které jsou uvedeny v Tab. 3.2. Pomocí programu Minitab 16 byly vytvořeny plošné grafy vzájemné závislosti daných parametrů a CRF, hodnota jednoho z parametrů byla vždy konstantní. Graf závislosti CRF na počátečním podílu methanolu v mobilní fázi a jeho gradientu za konstantního pH je zobrazen na Obr. 3.1.

Tento způsob je ovšem schopen pracovat pouze v mezích zvolených podmínek a nepostihuje například modifikaci gradientu zalomením. Z tohoto důvodu byly pomocí dalších měření, vycházejících z programem získaných dat, vlastním úsudkem stanoveny takové optimální hodnoty, které pro lepší rozdělení prvních píků tuto variantu zahrnuly. Optimální podmínky separace směsi APAH tedy byly: průtoková rychlost mobilní fáze $0,5 \text{ ml min}^{-1}$; pH acetátosfátového pufru 2,5; počáteční podíl methanolu v mobilní fázi 30 %. Dále byl pro urychlení doby separace a optimální rozdělení látek použit modifikovaný gradient. Podíl methanolu v mobilní fázi byl prvních 6 min analýzy udržován na hodnotě 30 %. Následně byla tato hodnota během 24 min zvýšena na 90 %.

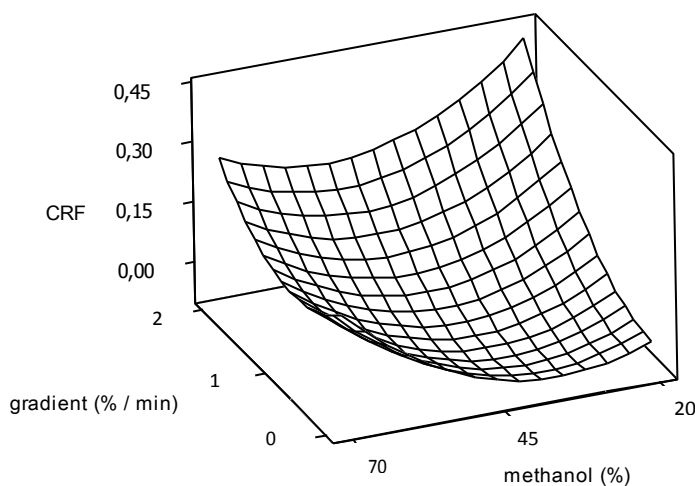
Píky jednotlivých analytů byly identifikovány na základě porovnání retenčních časů s retenčními časy píků jednotlivých látek (Tab. 3.3).

Tab. 3.1 Hodnoty optimalizovaných parametrů.

Parametr	1	0	-1
pH acetátosfátového pufru – A	2,5	4,5	6,5
podíl methanolu v MF – B	20%	45%	70%
gradient methanolu v MF – C	2 % / min	1 % / min	0 % / min

Tab. 3.2 Optimální hodnoty jednotlivých parametrů podle Boxova-Behnkenova plánu.

Parametr	A	B	C
Optimální hodnota	2,5	20 %	2 % / min



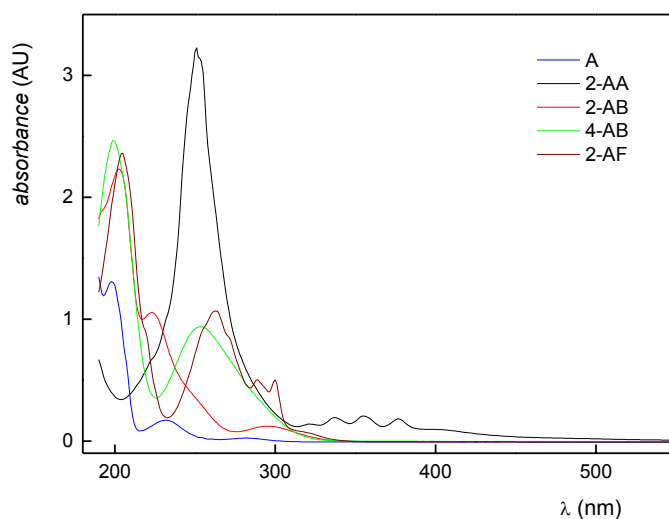
Obr. 3.1 Graf závislosti chromatografické odezvy plochy na počátečním podílu methanolu v mobilní fázi a jeho gradientu za konstantní hodnoty pH acetátového pufru (pH = 2,5).

Tab. 3.3 Identifikace analytů

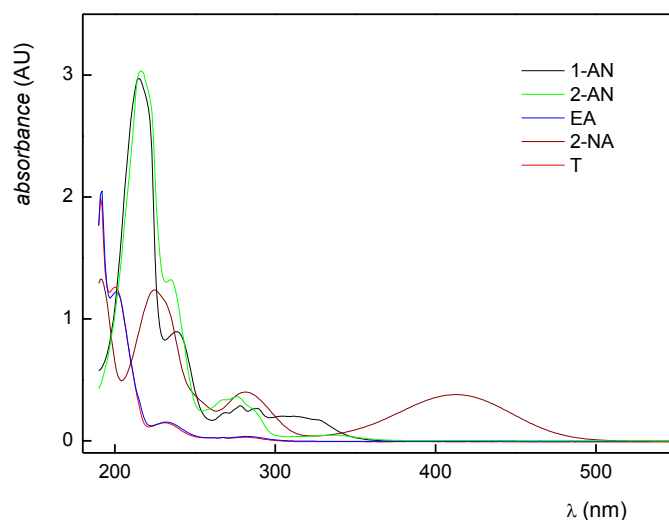
Číslo píku	Retenční čas, min	Analyt
1	3,94	A
2	4,96	T
3	7,14	EA
4	12,8	2-AN
5	16,3	1-AN
6	18,6	2-AF
7	19,7	4-AB
8	21,0	2-NA
9	24,1	2-AB
10	26,3	2-AA

3.2. Optimalizace podmínek detekce

Vhodná vlnová délka pro spektrofotometrickou detekci byla zjištěna ze spekter stanovovaných látek v prostředí směsi methanolu s acetátosfátovým pufrem (pH 2,5) v poměru 1:1 (Obr. 3.2 a Obr. 3.3). Spektra jednotlivých látek se od sebe výrazně liší a oblasti jejich absorpčních maxim se nepřekrývají; absorbance A, EA a T je kromě toho nízká i v těchto oblastech. Jako optimální kompromis byla zvolena vlnová délka 235 nm. Tato hodnota však není pro všechny analyty ideální a tento fakt se odráží i při spektrofotometrické detekci během stanovení směsi těchto látek.



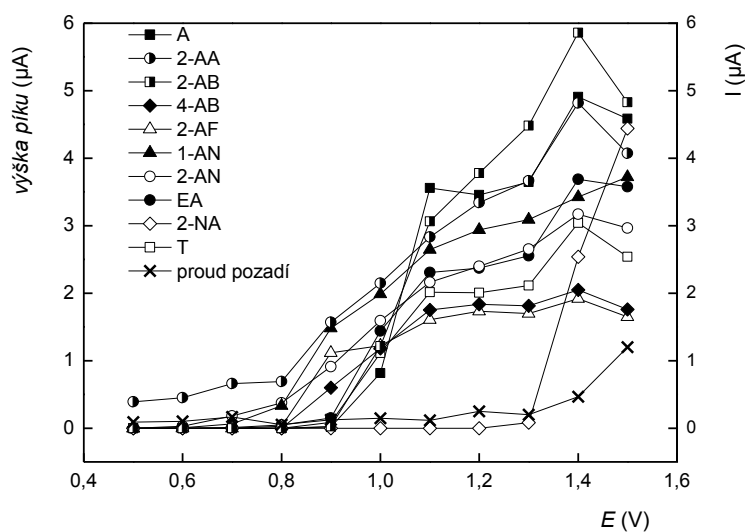
Obr. 3.2 Spektrum anilinu, 2-aminoanthracenu, 2-aminobifenyly, 4-aminobifenyly a 2-aminofluorenu měřené proti acetonitrilu. Roztoky jednotlivých látek o koncentraci $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve směsi methanolu a acetátosfátového pufru o pH 2,5.



Obr. 3.3 Spektrum 1-aminonaftalenu, 2-aminonaftalenu, ethylanilinu, 2-nitroanilinu a *o*-toluidinu měřené proti acetonitrilu. Roztoky jednotlivých látek o koncentraci $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve směsi methanolu a acetátofosfátového pufru o pH 2,5.

Pro zajištění vhodných podmínek stanovení bylo dále nutné zvolit vhodné podmínky amperometrické detekce, zejména potenciál pracovní elektrody. Optimální hodnota potenciálu pracovní elektrody byla získána proměřením hydrodynamických voltamogramů směsi analytů v rozmezí +0,5 V až +1,5 V za optimálních podmínek separace.

Hydrodynamické voltamogramy pro jednotlivé látky a naměřený proud pozadí jsou znázorněny na Obr. 3.4. Volba potenciálu +1,4 V jako pracovního potenciálu pro další měření byla vynucena potřebou detekce 2-NA; k detekci ostatních látek bylo možné použít nižší potenciál. Nevýhodou práce při vyšším potenciálu byl poměrně vysoký proud pozadí, s tím spojený šum, pomalejší ustalování základní linie a také větší drift základní linie spojený s použitím gradientové eluce.



Obr. 3.4 Hydrodynamické voltamogramy stanovovaných látek. Kolona LiChroCART[®] 250-4 Purospher RP-18 (5 μ m). Gradient (A: acetátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0. – 6. min: 30 % B, 30. min. 90 % B, průtok. rychlost 0,5 ml min⁻¹.

3.3. Optimalizace extrakce na tuhé fázi

Pro prekoncentraci a oddělení analytů od matrice byla použita extrakce na tuhé fázi.

Při volbě počátečních podmínek, tedy kolonek, elučního rozpouštědla a postupu extrakce, se vycházelo z diplomové práce J. Zavázalové^[38], která se zabývala stanovením aminoderivátů naftalenu a bifenyly v moči metodou HPLC-ED s využitím SPE.

Pro extrakci byly vybrány extrakční kolonky LiChrolut[®] EN 200 mg /3 ml, jejichž sorbent je tvořen kopolymerem ethylvinylbenzenu a divinylbenzenu, jako eluční činidlo byl použit acetonitril, jehož objem bylo nutné optimalizovat.

Celkový objem elučního rozpouštědla potřebný k eluci studovaných analytů byl stanoven zakoncentrováním 100 ml vzorku (směs analytů v deionizované vodě o koncentraci 0,1 μ g ml⁻¹) na kolonce a následnou extrakcí čtyřikrát 3,0 ml acetonitrilu. Následně byla každá frakce analyzována pomocí HPLC a z výšek píků byl vypočítán procentuální výtěžek jednotlivých látek a určen celkový objem acetonitrilu potřebný k eluci těchto látek z extrakční kolonky. Jelikož v poslední frakci již nebyly patrné stopy analytů, byl jako optimální zvolen objem acetonitrilu 10 ml. Procentuální výtěžky jednotlivých analytů po eluci 10 ml acetonitrilu (pro koncentrace 100 ng ml⁻¹ a 10 ng ml⁻¹) jsou pro oba druhy detekce uvedeny v Tab. 3.4.

Přestože bylo dosaženo dostatečného výtěžku prakticky u všech látek, výsledky A, T a EA (tedy prvních tří píků) byly značně ovlivněny interferencí matrice. Na výtěžnost jednotlivých analytů při spektrofotometrickém stanovení má vliv výrazný drift základní linie. Odečet výšek píků byl v důsledku driftu ztížen a u některých látek úplně znemožněn. V případě amperometrické detekce ztěžoval vyhodnocení šum.

Tab. 3.4 Výtěžky extrakce jednotlivých látek o koncentraci 100 ng ml^{-1} a 10 ng ml^{-1} pro amperometrickou a spektrofotometrickou detekci. Extrahováno vždy 100 ml roztoku, z SPE kolonky vymyto 10 ml acetonitrilu.

Analyt	Výtěžky extrakce, %			
	100 ng ml^{-1}		10 ng ml^{-1}	
	ED	UV	ED	UV
A	105	–	53	–
2-AA	79	79	59	116
2-AB	102	93	97	129
4-AB	106	99	84	–
2-AF	99	71	97	–
1-AN	123	116	75	–
2-AN	111	–	64	–
EA	101	–	55	–
2-NA	109	114	82	108
T	140	–	35	–

3.4. Kalibrační závislosti

Pro ověření linearity koncentrační závislosti byly za optimálních pracovních podmínek proměřeny kalibrační křivky pro A, 2-AA, 2-AB, 4-AB, 2-AF, 1-AN, 2-AN, EA, 2-NA, T. Přímým nástřikem byla změřena i koncentrační závislost směsi látek v matrici říční vody. Další kalibrační závislost byla získána proměřením směsi látek v říční vodě, které byly před stanovením zakoncentrovány extrakcí na tuhé fázi. K detekci byl ve všech případech použit amperometrický i spektrofotometrický detektor.

3.4.1. Kalibrační závislosti bez předchozího zakoncentrování analytu

Kalibrační závislosti byly u směsi analytů v deionizované vodě s methanolem (1:1) proměřeny v koncentračním rozmezí od $0,025 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ do $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, pro směs analytů

v říční vodě byly tyto závislosti měřeny v rozsahu koncentrací od $0,01 \mu\text{g ml}^{-1}$ do $1 \mu\text{g ml}^{-1}$. Z výšek píků jednotlivých látek vyhodnocených z naměřených chromatogramů, byly určeny parametry kalibračních závislostí (směrnice, úsek, korelační koeficient) a dále pak mez detekce a mez stanovitelnosti. Parametry kalibračních závislostí pro elektrochemickou a spektrofotometrickou detekci jsou uvedeny v tabulkách Tab. 3.5 a Tab. 3.6 pro stanovení v čistých rozpouštědlech a v Tab. 3.7 a Tab. 3.8 pro stanovení v říční vodě, meze detekce v tabulce Tab. 3.9.

Kalibrační křivky analytů v deionizované vodě s methanolem jsou pro amperometrickou detekci (Obr. 3.5) lineární do koncentrace $0,05 \mu\text{g ml}^{-1}$. Při nižší koncentraci ztěžoval vyhodnocení chromatogramu šum základní linie. U spektrofotometrické detekce (Obr. 3.6) byl i při měření nejvyšší koncentrace ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) znatelný drift základní linie, což u některých látek velmi brzy znemožnilo jejich vyhodnocení.

Situace při stanovení v říční vodě byla obdobná – pomocí amperometrické detekce (Obr. 3.7) bylo při měření kalibračních závislostí v říční vodě u většiny analytů dosaženo dobré linearity do koncentrace $0,05 \mu\text{g ml}^{-1}$, zatímco u spektrofotometrické detekce (Obr. 3.8) vykazovaly kalibrační závislosti stejný problém jako u stanovení v deionizované vodě s methanolem – tedy výrazný drift základní linie. Vzhledem k tomu nebylo možné u nižších koncentrací většinu látek vyhodnotit. Tento drift způsobil ztížené vyhodnocení píku 2-nitroanilinu i u vyšších koncentrací.

Při měření kalibračních závislostí analytů v deionizované vodě s methanolem se, u amperometrické detekce (Obr. 3.9), v sestupné části píku *o*-toluidinu objevuje překryv se systémovým píkem methanolu. Na chromatogramu spektrofotometrické detekce této směsi (Obr. 3.10) není možné pík *o*-toluidinu v důsledku překryvu tímto systémovým píkem vyhodnotit.

Při amperometrickém stanovení směsi látek v říční vodě (Obr. 3.11) nebyl na rozdíl od spektrofotometrické detekce podobný problém znatelný. V případě spektrofotometrické detekce nemohly být vyhodnoceny první ani druhý pík (anilin, *o*-toluidin), oba tyto píky byly překryty píkem matrice (Obr. 3.12). V důsledku interference matrice je také na tomto chromatogramu velmi špatně rozeznatelný pík ethylanilinu.

Na chromatogramech Obr. 3.11 a Obr. 3.12 je možné vidět výrazný drift základní linie při spektrofotometrickém i amperometrickém stanovení směsi látek v říční vodě. Tento drift je způsoben použitím gradientu mobilní fáze pro urychlení doby analýzy, roli hraje i použití nízké vlnové délky u spektrofotometrické detekce a vysokého detekčního potenciálu u detekce amperometrické, další příčinou driftu základní linie u amperometrického stanovení je vymývání pastovací kapaliny z uhlíkové pasty v důsledku vysokého podílu methanolu v mobilní fázi během analýzy. Přesto je zřejmé, že míra driftu je u obou způsobů detekce srovnatelná a nepotvrdily se obavy ze špatné kompatibility elektrochemické detekce a gradientové eluce.

Tab. 3.5 Parametry kalibračních závislostí jednotlivých analytů ve směsi v deionizované vodě s methanolem (1:1, V/V) pro HPLC s amperometrickou detekcí. Měřeno za optimálních podmínek.

Analyt	Směrnice, nA ng ⁻¹ ml	Úsek, nA	Korelační koeficient
A	0,48	-49,0	0,9970
2-AA	0,54	-2,9	0,9997
2-AB	0,62	11,5	0,9999
4-AB	0,23	-16,0	0,9987
2-AF	0,20	-17,3	0,9982
1-AN	0,42	-36,4	0,9986
2-AN	0,37	-44,6	0,9974
EA	0,36	-24,1	0,9980
2-NA	0,15	48,9	0,9929
T	0,31	-17,7	0,9981

Tab. 3.6 Parametry kalibračních závislostí jednotlivých analytů ve směsi v deionizované vodě s methanolem (1:1, V/V) pro HPLC se spektrometrickou detekcí. Měřeno za optimálních podmínek.

Analyt	Směrnice, mAU μg^{-1} ml	Úsek, mAU	Korelační koeficient
A	0,2	-0,01	0,9977
2-AA	8,8	-0,28	0,9984
2-AB	7,0	-0,03	0,9983
4-AB	3,5	-0,08	0,9991
2-AF	1,5	-0,10	0,9990
1-AN	4,4	-0,44	0,9981
2-AN	2,8	-0,94	0,9981
EA	0,3	-0,07	0,9927
2-NA	11,1	0,10	0,9988
T	-	-	-

Tab. 3.7 Parametry kalibračních závislostí jednotlivých analytů ve směsi v říční vodě pro HPLC s amperometrickou detekcí. Měřeno za optimálních podmínek.

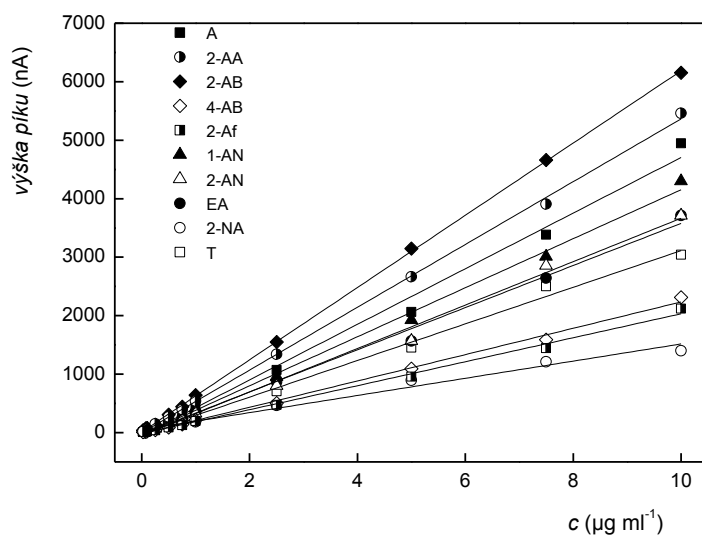
Analyt	Směrnice, nA ng^{-1} ml	Úsek, nA	Korelační koeficient
A	0,63	18,3	0,9957
2-AA	0,53	-29,2	0,9534
2-AB	1,04	41,7	0,9471
4-AB	0,34	-2,7	0,9910
2-AF	0,32	-6,6	0,9906
1-AN	0,62	-10,8	0,9920
2-AN	0,54	-10,3	0,9901
EA	0,73	-4,0	0,9987
2-NA	0,62	0,3	0,9999
T	0,57	6,7	0,9973

Tab. 3.8 Parametry kalibračních závislostí jednotlivých analytů ve směsi v říční vodě pro HPLC se spektrofotometrickou detekcí. Měřeno za optimálních podmínek.

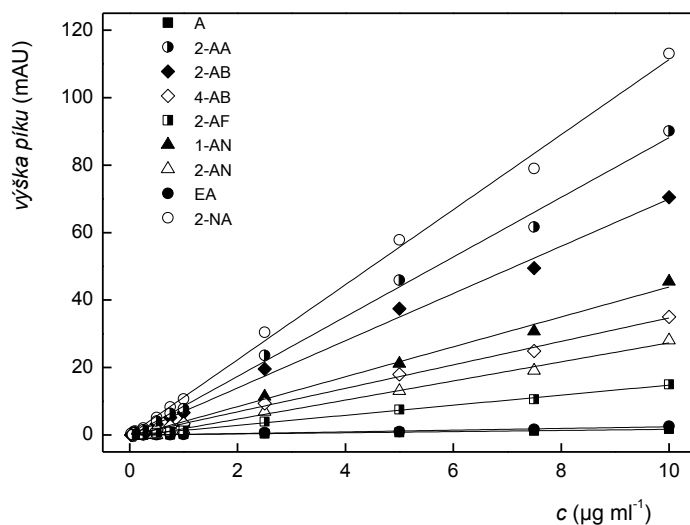
Analyt	Směrnice, mAU μg^{-1} ml	Úsek, mAU	Korelační koeficient
A	–	–	–
2-AA	7,8	–0,39	0,9994
2-AB	8,3	0,21	0,9861
4-AB	4,1	–0,09	0,9978
2-AF	1,8	–0,19	0,9923
1-AN	3,9	–0,22	0,9923
2-AN	2,9	–0,97	0,9496
EA	0,2	–0,01	0,9854
2-NA	13,4	–0,10	0,9999
T	–	–	–

Tab. 3.9 Meze detekce jednotlivých analytů v obou maticích pro HPLC s amperometrickou a spektrofotometrickou detekcí. Měřeno za optimálních podmínek.

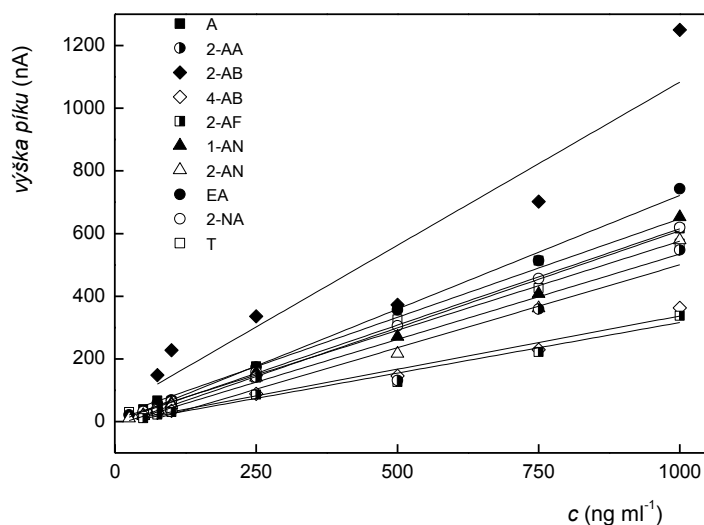
Analyt	Deionizovaná voda s methanolem 1:1 (V/V)		Říční voda	
	ED	UV	ED	UV
	Mez detekce, ng ml^{-1}	Mez detekce, ng ml^{-1}	Mez detekce, ng ml^{-1}	Mez detekce, ng ml^{-1}
A	6,9	979	5,2	–
2-AA	6,1	19	6,2	19
2-AB	5,3	24	3,2	18
4-AB	14,7	48	9,7	37
2-AF	16,1	112	10,2	84
1-AN	7,9	38	5,3	39
2-AN	8,9	59	6,1	53
EA	9,2	659	4,5	635
2-NA	22,5	15	5,4	11
T	10,5	–	5,8	–



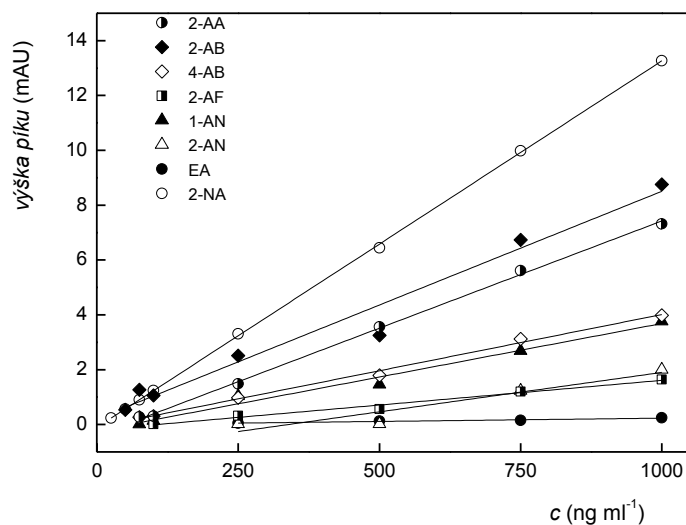
Obr. 3.5 Kalibrační závislosti jednotlivých látek v deionizované vodě s methanolem (1:1, V/V), amperometrická detekce. Kolona LiChroCART[®] 250-4 Purospher RP-18 (5µm). Gradient (A: acetátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0. – 6. min: 30 % B, 30. min. 90 % B, průtok. rychlost 0,5 ml min⁻¹. $E_{DET} = 1,4$ V.



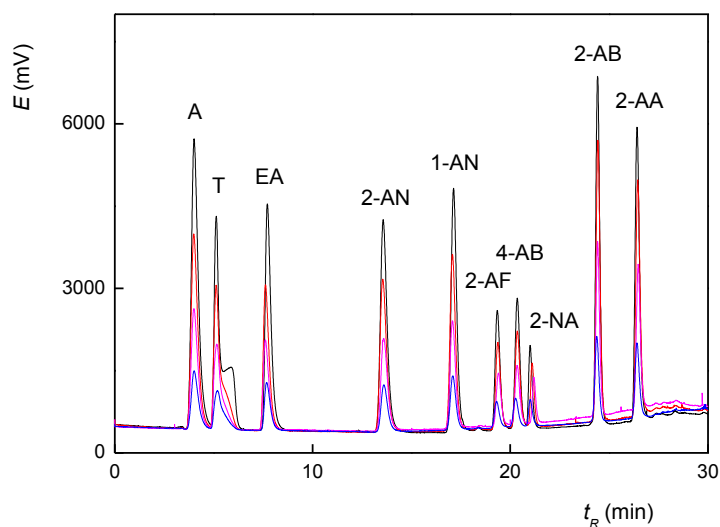
Obr. 3.6 Kalibrační závislosti jednotlivých látek v deionizované vodě s methanolem (1:1, V/V), spektrofotometrická detekce. Kolona LiChroCART[®] 250-4 Purospher RP-18 (5µm). Gradient (A: acetátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0. – 6. min: 30 % B, 30. min. 90 % B, průtok. rychlost 0,5 ml min⁻¹. $\lambda_{DET} = 235$ nm.



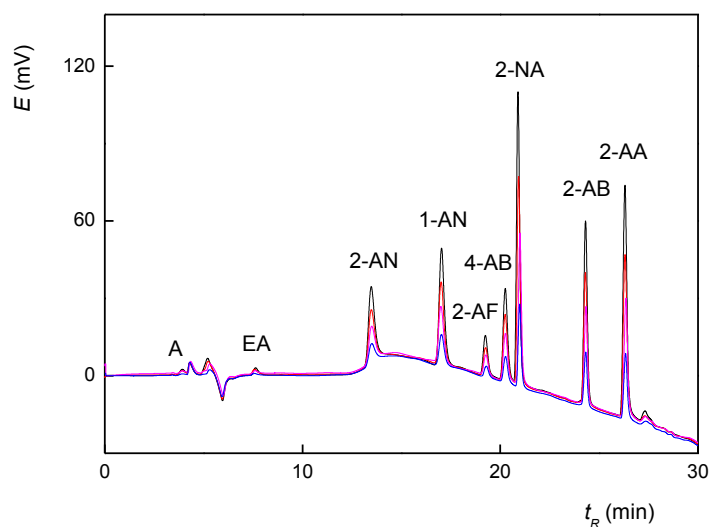
Obr. 3.7 Kalibrační závislosti jednotlivých látek v říční vodě, amperometrická detekce. Kolona LiChroCART[®] 250-4 Purospher RP-18 (5 μ m). Gradient (A: acetátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0. – 6. min: 30 % B, 30. min. 90 % B, průtok. rychlost 0,5 ml min⁻¹. $E_{DET} = 1,4$ V.



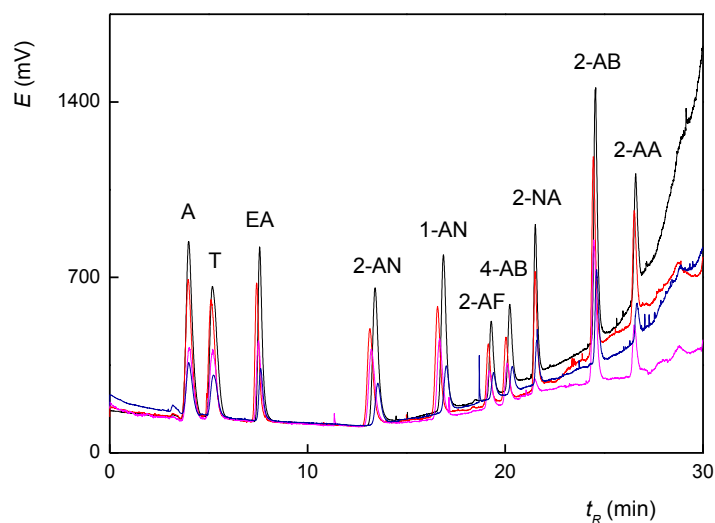
Obr. 3.8 Kalibrační závislosti jednotlivých látek v říční vodě, spektrofotometrická detekce. Kolona LiChroCART[®] 250-4 Purospher RP-18 (5 μ m). Gradient (A: acetátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0. – 6. min: 30 % B, 30. min. 90 % B, průtok. rychlost 0,5 ml min⁻¹. $\lambda_{DET} = 235$ nm.



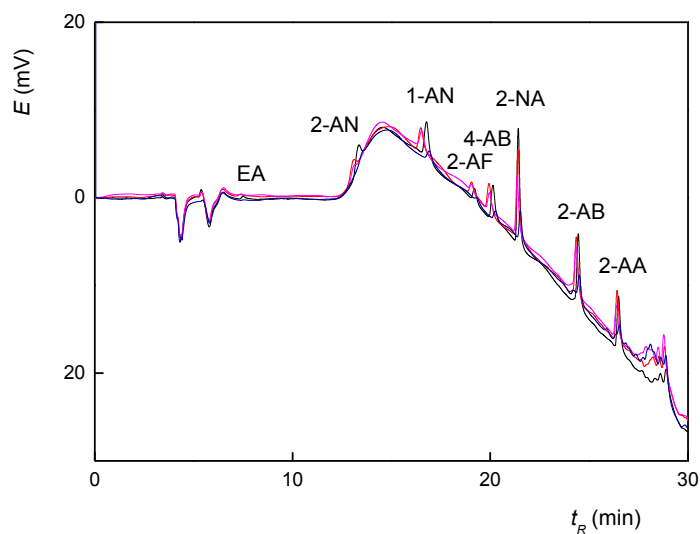
Obr. 3.9 Chromatogramy směsi látek (koncentrace analytů ve směsi: 10; 7,5; 5 a 2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) v deionizované vodě s methanolem (1:1, V/V), amperometrická detekce. Kolona LiChroCART[®] 250-4 Purospher RP-18 (5 μm). Gradient (A: acetátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0. – 6. min: 30 % B, 30. min. 90 % B, průtok. rychlost 0,5 ml min⁻¹. $E_{DET} = 1,4 \text{ V}$.



Obr. 3.10 Chromatogramy směsi látek (koncentrace analytů ve směsi: 10; 7,5; 5 a 2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) v deionizované vodě s methanolem (1:1, V/V), spektrofotometrická detekce. Kolona LiChroCART[®] 250-4 Purospher RP-18 (5 μm). Gradient (A: acetátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0. – 6. min: 30 % B, 30. min. 90 % B, průtok. rychlost 0,5 ml min⁻¹. $\lambda_{DET} = 235 \text{ nm}$.



Obr. 3.11 Chromatogramy směsi látek (koncentrace analytů ve směsi: 1; 0,75; 0,5 a 0,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) v říční vodě, amperometrická detekce. Kolona LiChroCART[®] 250-4 Purospher RP-18 (5 μm). Gradient (A: acetátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0. – 6. min: 30 % B, 30. min. 90 % B, průtok. rychlost 0,5 ml min⁻¹. $E_{DET} = 1,4$ V.



Obr. 3.12 Chromatogramy směsi látek (koncentrace analytů ve směsi: 1; 0,75; 0,5 a 0,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) v říční vodě, spektrofotometrická detekce. Kolona LiChroCART[®] 250-4 Purospher RP-18 (5 μm). Gradient (A: acetátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0. – 6. min: 30 % B, 30. min. 90 % B, průtok. rychlost 0,5 ml min⁻¹. $\lambda_{DET} = 235$ nm.

3.4.2. Kalibrační závislosti po zakoncentrování směsi pomocí SPE

Kalibrační závislosti směsi analytů v říční vodě po desetinásobném zakoncentrování na extrakční kolonce byly proměřeny v rozmezí od 1 ng ml⁻¹ do 100 ng ml⁻¹. Všechny kalibrační závislosti a jejich parametry jsou pro spektrofotometrickou detekci uvedeny v Tab. 3.10 a zobrazeny na Obr. 3.13, pro elektrochemickou detekci v Tab. 3.11 a na Obr. 3.14. Při stanovení pomocí spektrofotometrické detekce nebylo možné vyhodnotit první tři píky (A, EA, T) v důsledku píku matrice, který tyto tři píky překrývá (Obr. 3.15). U amperometrické detekce byly tyto píky vyhodnotitelné, ale vliv matrice byl znatelný (Obr. 3.16).

Meze detekce analytů zakoncentrované pomocí SPE, detekované amperometricky i spektrofotometricky (Tab. 3.12), odpovídají desetinásobnému zakoncentrování, jsou tedy desetinásobně nižší než meze detekce stanovení těchto látek v říční vodě bez předchozí extrakce. Směrnice kalibračních závislostí jednotlivých látek pro oba druhy detekce také odpovídají tomuto zakoncentrování, jsou desetkrát vyšší. Korelační koeficienty jednotlivých analytů po extrakci jsou nižší než jim odpovídající korelační koeficienty bez prekoncentrace, důvodem je vnesení chyb extrakčním postupem.

Tab. 3.10 Parametry kalibrační závislosti jednotlivých analytů ve směsi v říční vodě po zakoncentrování pomocí SPE pro HPLC se spektrofotometrickou detekcí. Měřeno za optimálních podmínek.

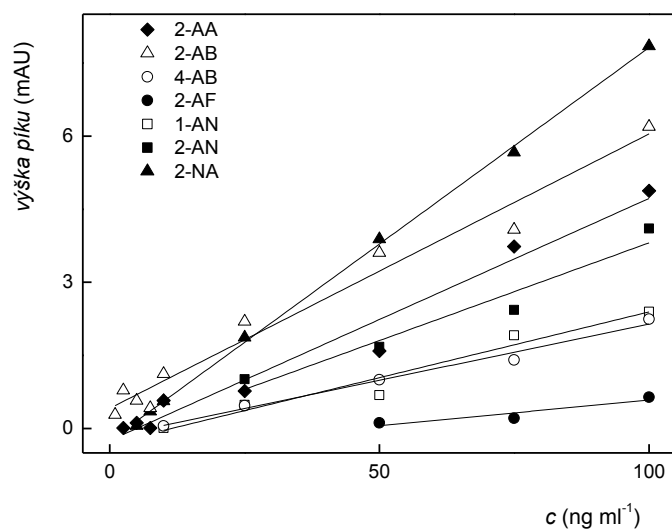
Analyt	Směrnice, mAU ng ⁻¹ ml	Úsek, mAU	Korelační koeficient
A	–	–	–
2-AA	0,050	–0,25	0,9853
2-AB	0,056	0,41	0,9866
4-AB	0,023	–0,17	0,9930
2-AF	0,011	–0,47	0,9373
1-AN	0,027	–0,31	0,9776
2-AN	0,040	–0,20	0,9726
EA	–	–	–
2-NA	0,081	–0,25	0,9996
T	–	–	–

Tab. 3.11 Parametry kalibrační závislosti jednotlivých analytů ve směsi v říční vodě po zakoncentrování pomocí SPE pro HPLC s amperometrickou detekcí. Měřeno za optimálních podmínek.

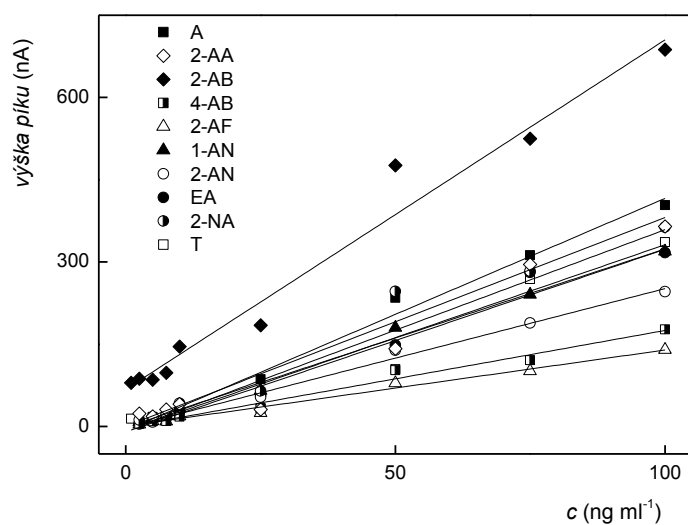
Analyt	Směrnice, nA ng ⁻¹ ml	Úsek, nA	Korelační koeficient
A	4,2	-6,91	0,9960
2-AA	3,8	-14,48	0,9796
2-AB	6,4	67,62	0,9869
4-AB	1,8	-1,22	0,9922
2-AF	1,4	0,64	0,9937
1-AN	3,3	-1,22	0,9970
2-AN	2,5	-1,99	0,9973
EA	3,4	-7,39	0,9908
2-NA	3,8	0,52	0,9842
T	3,4	-14,95	0,9756

Tab. 3.10 Meze detekce jednotlivých analytů v říční vodě po zakoncentrování pomocí SPE pro HPLC s amperometrickou a spektrofotometrickou detekcí. Měřeno za optimálních podmínek.

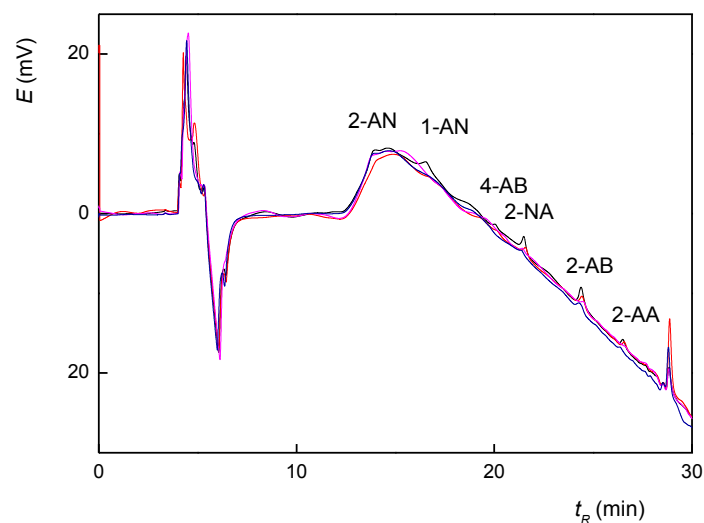
Analyt	Mez detekce, ng ml ⁻¹	
	ED	UV
A	0,33	–
2-AA	0,37	3,3
2-AB	0,22	2,9
4-AB	0,80	7,2
2-AF	1,01	15,7
1-AN	0,43	6,1
2-AN	0,56	4,1
EA	0,42	–
2-NA	0,37	2,1
T	0,41	–



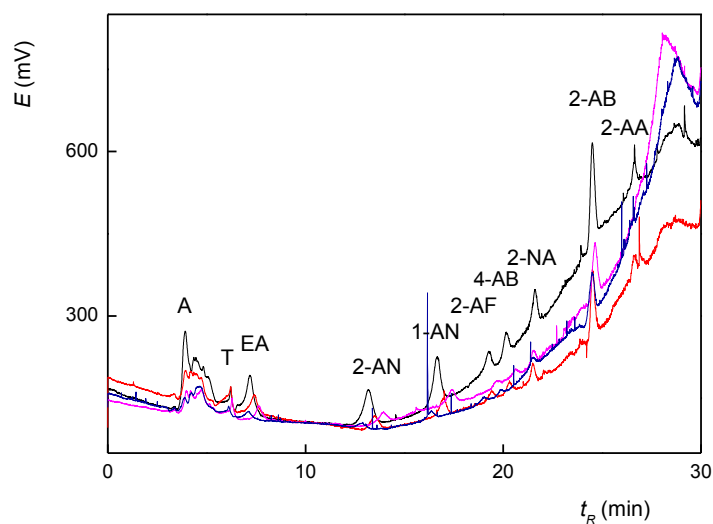
Obr. 3.13 Kalibrační závislosti jednotlivých látek v říční vodě po zakoncentrování pomocí SPE, spektrofotometrická detekce. Kolona LiChroCART[®] 250-4 Purospher RP-18 (5 μ m). Gradient (A: acetátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0. – 6. min: 30 % B, 30. min. 90 % B, průtok. rychlost 0,5 ml min⁻¹. $\lambda_{DET} = 235$ nm.



Obr. 3.14 Kalibrační závislosti jednotlivých látek v říční vodě po zakoncentrování pomocí SPE, amperometrická detekce. Kolona LiChroCART[®] 250-4 Purospher RP-18 (5 μ m). Gradient (A: acetátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0. – 6. min: 30 % B, 30. min. 90 % B, průtok. rychlost 0,5 ml min⁻¹. $E_{DET} = 1,4$ V.



Obr. 3.15 Chromatogramy směsi látek (koncentrace analytů ve směsi: 25; 10; 7,5 a 5 ng ml⁻¹) v říční vodě po prekoncentraci pomocí SPE, spektrofotometrická detekce. Kolona LiChroCART[®] 250-4 Purospher RP-18 (5μm). Gradient (A: acetátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0. – 6. min: 30 % B, 30. min. 90 % B, průtok. rychlost 0,5 ml min⁻¹. $\lambda_{DET} = 235$ nm.



Obr. 3.16 Chromatogramy směsi látek (koncentrace analytů ve směsi: 25; 10; 7,5 a 5 ng ml⁻¹) v říční vodě po prekoncentraci pomocí SPE, amperometrická detekce. Kolona LiChroCART[®] 250-4 Purospher RP-18 (5μm). Gradient (A: acetátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0. – 6. min: 30 % B, 30. min. 90 % B, průtok. rychlost 0,5 ml min⁻¹. $E_{DET} = 1,4$ V.

4. Závěr

V této práci bylo prostudováno chromatografické chování A, 2-AA, 2-AB, 4-AB, 2-AF, 1-AN, 2-AN, EA, 2-NA a T v systému HPLC s reverzním módem. Pomocí statistické metody plánování experimentu byly stanoveny optimální hodnoty tří významných parametrů – pH acetátosfátového pufru, počátečního podílu methanolu v mobilní fázi a gradientu mobilní fáze. Všechny tyto parametry a některé jejich vzájemné interakce mají velký vliv na separaci výše zmíněných látek. Celkové optimální podmínky separace byly určeny na základě výsledků DOE několika dalšími experimenty: průtoková rychlost mobilní fáze $0,5 \text{ ml min}^{-1}$; vlnová délka spektrofotometrického detektoru 235 nm; potenciál vložený na pracovní elektrodu 1,4 V; pH acetátosfátového pufru 2,5; počáteční podíl methanolu v mobilní fázi 30 %; gradient mobilní fáze – počáteční podíl methanolu v mobilní fázi (30 %) byl prvních 6 min analýzy udržován konstantní a během dalších 24 min byl podíl methanolu zvýšen na 90 %. Za těchto podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti směsi APAH v deionizované a říční vodě a určeny meze detekce jednotlivých analytů jak pro amperometrickou tak pro spektrofotometrickou detekci.

Dále byly metodami HPLC-ED a HPLC-UV proměřeny kalibrační závislosti směsi APAH v říční vodě po prekoncentraci pomocí SPE s acetonitrilem jako eluentem. Meze detekce jednotlivých analytů odpovídaly desetinásobnému zakoncentrování.

Amperometricky získané meze detekce u všech kalibračních závislostí se pohybovaly o řád níže než meze detekce spektrofotometrického detektoru. Dosažené meze detekce 2-aminobifenyly jsou pro ilustraci uvedeny v Tab. 4.1.

Tab. 4.1 Meze detekce 2-aminobifenyly.

Metoda stanovení	Mez detekce, ng ml^{-1}	
SPE + HPLC	ED	0,2
	UV	2,9
HPLC	ED	2,9
	UV	18

5. Literatura

- [1] IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Geneva: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 1972-PRESENT. www.iarc.fr (staženo 3. 5. 2013).
- [2] Chung K. T., Adris P.: Growth inhibition of intestinal bacteria and mutagenicity of 2-, 3-, 4-aminobiphenyls, benzidine, and biphenyl. *Toxicology in Vitro* 17, 145 – 152 (2003).
- [3] Masson, H.A.; Ioannides, C.; Gorrod, J.W.; Gibson, G.G.: The role of highly purified cytochrome P-450 isozymes in the activation of 4-aminobiphenyl to mutagenic products in the Ames test. *Carcinogenesis* 4, 1583 – 1586 (1983).
- [4] Gan J., Skipper P. L., Gago–Dominguez M., Arakawa K., Ross R. K., Yu M. C., Tannenbaum S. R.: Alkylaniline–Hemoglobine Adducts And Risk of Non–Smoking–Related Bladder Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 96, 1425 – 1431 (2004).
- [5] Cheung Y., Lewis D. F. V., Ridd T. I., Gray T. J. B., Ioannides C.: Diaminonaphtalenes and related aminocompounds: Mutagenicity, CYP1A induction and interaction with the Ah receptor. *Toxicology* 118, 115 – 117 (1997).
- [6] Moreira J. C., Berek J.: Analysis of carcinogenic nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons – a review. *Quimica Nova*, 18, 362 – 367 (1995).
- [7] Pickering R. W.: A toxicological review of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Toxicology – Cutaneous and Ocular Toxicology* 18, 101 – 135 (1999).
- [8] Vyskočil V., Berek J.: Electroanalysis of Nitro and Amino Derivatives of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Current Organic Chemistry* 15, 3059 – 3076 (2011).

- [9] Barek J., Cvačka J., Muck A., Quaiserová V., Zima J.: Polarographic and Voltammetric Determination of Carcinogenic Nitro and Amino Derivatives of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Electroanalysis* 13, 799 – 803 (2001).
- [10] Maixnerová L., Barek J., Pecková K.: Thin-Layer and Wall-Jet Arrangement of Amperometric Detector with Boron-Doped Diamond Electrode: Comparison of Amperometric Determination of Aminobiphenyls in HPLC-ED. *Electroanalysis* 24, 649 – 658 (2012).
- [11] Zima J., Dejmková H., Barek J.: HPLC Determination of Naphtalene Amino Derivatives Using Electrochemical Detection at Carbon Paste Electrodes. *Electroanalysis* 19, 185 – 190 (2007).
- [12] del Nogal Sánchez M., Pérez Sappó C., Pérez Pavón J. L., Moreno Cordero B.: A method based on microextraction by packed sorbent-programmed temperature vaporizer – fast gas chromatography – mass spectrometry for the determination of aromatic amines in environmental water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404, 2007 – 2015 (2012).
- [13] Cvačka J., Barek J., Fogg A. G., Moreira J. C., Zima J.: High-performance liquid chromatography of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analyst* 32, 9R – 18R (1998).
- [14] Zavázalová J., Dejmková H., Barek J., Pecková K.: Ampérometrická a spektrofotometrická detekce aminobifenylů a aminonaftalenů v HPLC. *Chemické listy* 105, s87 – s89 (2011).
- [15] Concialini V., Chiavari G., Vitali P.: Electrochemical detection in high-performance liquid chromatographic analysis of aromatic amines. *Journal of Chromatography A* 258, 244 – 251 (1983).
- [16] Shin D., Tryk D. A., Fujishima A., Muck A., Chen G., Wang J.: Microchip capillary electrophoresis with a boron-doped diamond electrochemical detector for analysis of aromatic amines. *Electrophoresis* 25, 3017 – 2023 (2004).

- [17] Fogg A. G., Bsebsu N. K., Abdalla M. A.: Indirect flow injection voltammetric determination of aromatic amines by monitoring at a glassy carbon electrode the excess of nitrite remaining after their diazotisation. *Analyst* 107, 1462 – 1465 (1982).
- [18] 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).
- [19] Pecková K., Jandová L., Maixnerová L., Swain G. M., Barek J.: Amperometric Determination of Aminobiphenyls Using HPLC-ED with Boron-Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis* 21, 316 – 324 (2009).
- [20] Gunasingham H., Tay B. T., Ang K. P.: Amperometric Detection in Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography with a Large Volume Wall Jet Cell and Ag/Ag⁺ Reference System. *Analytical Chemistry* 56, 2422 – 2426 (1984).
- [21] Matsuda H.: Zur theorie der stationären strom-spannungs-kurven von redox-elektrodenreaktionen in hydrodynamischer voltammetrie: I. laminare staupunktströmltngen. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 15, 109 – 127 (1967).
- [22] Gunasingham H., Tay B. T., Ang K. P., Koh L. L.: Electrochemical Detection od Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Following Reversed-Phase Gradient High-Performance Liquid Chromatography Using Large-Volume Wall-Jet Detector. *Journal of Chromatography* 285, 103 – 114 (1984).
- [23] Zavázalová J., Dejmková H., Barek J., Pecková K.: Voltammetric and Amperometric Determination of Mixtures of Aminobiphenyls and Aminonaphtalenes Using Boron Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis* 25, 253 – 262 (2013).
- [24] Dejmková H., Zima J., Barek J., Mika J.: Behavior of Glassy Carbon Paste Electrode in Flowing Methanolic Solutions. *Electroanalysis* 24, 1776 – 1770 (2012).

- [25] Dejmková H., Mikeš M., Barek J., Zima J.: Determination of Sulfamethizole Using Voltammetry and Amperometry on Carbon Paste Electrode. *Electroanalysis* 25, 189 – 194 (2013).
- [26] Adams R. N.: Carbon Paste Electrodes. *Analytical Chemistry* 30, 1576 – 1576 (1958).
- [27] Rivas G. A., Rubianes M. D., Pedano M. L., Ferreyra N. F., Luque G. L., Rodriguez M. C., Miscoria S. A.: Carbon nanotubes paste electrodes. A new alternative for the development of electrochemical sensors. *Electroanalysis* 19, 823 – 831 (2007).
- [28] Ramirez M. T., Palomar M. E., Gonzales I., Rojashernandez A.: Carbon-paste electrodes with electrolytic binder – influence of the preparation method. *Electroanalysis* 7, 184 – 188 (1995).
- [29] Švancara I., Vytřas K., Kalcher K., Walcarius A., Wang J.: Carbon Paste Electrodes in Facts, Numbers and Notes: A Review on the Occasion of the 50-Year Jubilee of Carbon Paste in Electrochemistry and Electroanalysis. *Electroanalysis* 21, 7 – 28 (2009).
- [30] Švancara I., Vytřas K., Barek J., Zima J.: Carbon Paste Electrodes in Modern Electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 31, 311 – 345 (2001).
- [31] Bezerra M. A., Santelli R. E., Oliveira E. P., Villar L. S., Escalera L. A.: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76, 965 – 977 (2008).
- [32] Sivukumar T., Manavalan R., Muralidharan C., Valliappan K.: Multi-criteria decision making approach and experimental design as chemometric tools to optimize HPLC separation of domperidone and pantoprazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 1842 – 1848 (2007).
- [33] Leardi R.: Experimental design in chemistry: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* 653, 161 – 172 (2009).

- [34] Hadjmohammadi M., Sharifi V.: Simultaneous optimization of the resolution and analysis time of flavonoids in reverse phase liquid chromatography using Derringer's desirability function. *Journal of Chromatography B* 880, 34 – 41 (2012).
- [35] Safa F., Hajmohammadi M.: Simultaneous optimization of the resolution and analysis time in micellar liquid chromatography of phenyl thiohydantoin amino acids using Derringer's desirability function. *Journal of Chromatography A* 1078, 42 – 50 (2005).
- [36] Kamel K., Hadjmohammadi M.: Application of Multilinear Gradient Elution for Optimization of Separation of Chlorophenols Using Derringer's Desirability Function. *Chromatographia* 67, 169 – 172 (2008).
- [37] Živanović L., Protić A., Zečević M., Jocić B., Kostić M.: Multicriteria optimization methodology in development of HPLC separation of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human urine and plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 50, 640 – 648 (2009).
- [38] Zavázalová J.: Elektrochemická detekce aminoderivátů naftalenu a bifenyly na platinových elektrodách. Diplomová práce, PŘF UK, Praha (2011).