

Stanovení 5-aminochinolinu pomocí HPLC se spektrofotometrickou a elektrochemickou detekcí na CPE

Návod

pro výběrovou úlohu pro Pokročilé praktikum (C 230C04) z instrumentální analytické chemie pro posluchače navazujícího magisterského studia oboru Analytické chemie a Moderních metod analytické chemie (C 230C10) oboru Geochemie a Pokročilého praktika z analytické chemie (C 230C13) pro posluchače bakalářského studia oboru Klinická a toxikologická analýza a Praktikum z přístrojové analýzy (C230C15) pro posluchače oboru Chemie životního prostředí.

Teoretický úvod

Aminoderiváty heterocyklických aromatických uhlovodíků patří mezi látky s poměrně širokým praktickým využitím, a to jakožto součásti komerčně vyráběných léčiv, analytická činidla, součásti barviv a přípravků používaných v zemědělství. Některé deriváty však jsou podezřelé z negativních účinků na lidské zdraví. Ke stanovení látek tohoto typu se běžně využívají moderní separační metody, které kromě vynikající citlivosti mají i důležitou schopnost separace analytů i z poměrně komplikovaných environmentálních či biologických matric.

Kapalinová chromatografie s reverzními fázemi je v současné době jednou z nejpoužívanějších metod v organické analýze. Poměrně snadná oxidovatelnost aminoskupiny na aromatickém jádře lze využít k HPLC stanovení aminochinolinů na základě jejich oxidace v oblasti poměrně nízkých pozitivních potenciálů a k porovnání této metody s klasickou detekcí pomocí klasické spektrofotometrické detekce.

Cílem této úlohy je v dané mobilní fázi nalézt optimální podmínky pro spektrofotometrickou detekci 5-aminochinolinu (5-AQ) a elektrochemickou detekci 5-AQ, a to na základě změření hydrodynamického voltamogramu $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ 5-AQ na uhlíkové pastové elektrodě. Za optimálních podmínek se pomocí duální ED a spektrofotometrické detekce změní kalibrační závislosti v koncentračním rozmezí $2-10 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ 5-AQ, které se vynesou do kalibračních závislostí (pomocí výšek i ploch píků). Tyto kalibrační závislosti se využijí ke stanovení koncentrace 5-AQ v neznámém vzorku.

Experimentální část

A. Přístroje a zařízení

Pro měření s fotometrickou a elektrochemickou detekcí se použije vysokoúčinný kapalinový chromatograf složený z gradientového čerpadla Beta (ECOM, Praha), smyčkového dávkovacího analytického ventilu typu D s 20 μ l smyčkou (ECOM, Praha), kolona Purospher[®] RP-18e 150 x 4 mm, 5 μ m (Merck), UV-VIS detektoru s proměnnou vlnovou délkou Safír (ECOM), ampérometrického detektoru ADLC 2 (Laboratorní přístroje, Praha) s pracovní elektrodou tvořenou uhlíkovou pastovou elektrodou (KACH PŘF UK), Ag/AgCl srovnávací elektrodou a platinovou plíškovou elektrodou (obě Monokrystaly, Turnov). K vyhodnocení signálů se použije počítačem řízená stanice Clarity (Dataapex) umožňující dvoukanálové vyhodnocování. Fotometrický detektor se nastaví na určenou vlnovou délku. ADLC 2 detektor se použije k odvětvování potenciálů +0,6 až +1,4 V po 0,2 V. Dávkuje se pomocí injekční stříkačky s Luerovým nástavcem. K dispozici jsou všechny potřebné návody, a to jak pro vysokotlaké čerpadlo, tak pro oba detektory i řídicí software.

B. Reagencie

Mobilní fáze se připraví smísením 30 objemových částí acetonitrilu, p.a. a 70 objemových částí vodného 0,01 mol l⁻¹ fosfátového pufru pH 7 (vše Lachema, Brno). Po smísení objemů nedoplňovat! Průtoková rychlost mobilní fáze se nastaví na 0,5 ml min⁻¹. Zásobní methanolický roztok 5-AQ má koncentraci 1.10⁻³ mol l⁻¹, na kolonu dávkovaný roztok se zředí mobilní fází na koncentraci 1.10⁻⁴ mol l⁻¹.

C. Pracovní postupy

1. Příprava uhlíkové pasty

Před započítím měření se v třecí misce dokonale zhomogenizuje 250 mg mikrokuliček skelného uhlíku a 120 μ l minerální oleje. Vzniklou pastou se naplní tělo pracovní elektrody. Před měřením se povrch uhlíkové pastové elektrody očistí mechanicky otřením navlhčeným filtračním papírem.

2. Nalezení optimálních podmínek detekce

Nejprve se proměří UV-VIS spektrum 1.10⁻⁴ mol l⁻¹ 5-AQ v mobilní mol l⁻¹ v 0,5 cm křemenných kyvetách. Po ustavení rovnovážných podmínek v chromatografickém systému (ca 20 min. od započítí čerpání

mobilní fáze) se v zapojení CPE jako wall-jet detektoru změří hydrodynamický voltamogram 5-AQ s dávkováním smyčkou o objemu 20 μl při odvětvovaných potenciálech +0,6 až +1,4 V, s krokem 0,2 V. Měření při všech potenciálech se provádí duplicitně. Současně se provádí i UV fotometrická detekce 5-AQ při vlnové délce maxima absorpance odečteného ze změřeného UV-VIS spektra.

Z naměřeného hydrodynamického voltamogramu se určí vhodný potenciál pro detekci 5-AQ (ca +1,0 až +1,2 V) pro dané experimentální podmínky.

3. Změření kalibrační závislosti 5-AQ

Za určených optimálních experimentálních podmínek se proměří kalibrační křivky v koncentračním rozmezí 1 až $10 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ 5-AQ, a to pro oba druhy detekce.

4. Určení koncentrace 5-AQ v neznámém vzorku

Koncentrace 5-AQ v neznámém vzorku se určí nástřikem vzorku na kolonu a vyhodnocením získaných voltamogramů jak pro elektrochemickou, tak pro spektrofotometrickou detekci. Získané výsledky se porovnají a okomentují.

Závěr

Výsledky získané pomocí elektrochemické i spektrofotometrické detekce se mezi sebou porovnají a zhodnotí, rovněž tak i oba použité způsoby vyhodnocování množství analytu ve vzorku pomocí ploch a výšek naměřených signálů. Všechny naměřené chromatogramy budou uloženy do 1 složky se jménem studenta a odevzdaný protokol bude obsahovat seznam jednotlivých naměřených souborů rozdělených na skupinu obsahující chromatogramy naměřené při získávání hydrodynamického voltamogramu a skupinu obsahující analytickou část stanovení obsahu 5-AQ ve vzorku metodou kalibrační přímky.

Tato úloha je prováděna na přístrojovém vybavení získané díky Fondu rozvoje vysokých škol v rámci projektu FRVŠ 275/2006.