

Stanovení nitroderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků pomocí

RP-HPLC

Obor Analytická chemie

Polycyklické aromatické uhlovodíky a jejich nitroderiváty jsou látky vznikající během nedokonalého spalování organických látek, včetně pohonných hmot, tabáku či potravin. Jedná se přitom o látky často velmi nebezpečné pro lidské zdraví, s mutagenními a karcinogenními účinky, jejich spolehlivé a přesné stanovení je proto velmi důležité z hlediska ochrany životního prostředí a lidského zdraví.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie představuje velmi efektivní způsob, jak tyto nebezpečné látky stanovit. Využívá principu separace mezi dvě kapalné fáze, z nichž jedna, nepolární, je chemicky vázaná na stacionární fázi.

Na průběh separace v HPLC má velký vliv složení mobilní fáze. V případě nitroderivátů PAH je, na rozdíl od polarizovatelných analytů, potlačen vliv pH, protože nedokáže ovlivnit strukturu analytů a tedy ani jejich retenci. Hlavním faktorem tedy zůstává poměr vodné a organické složky mobilní fáze. Tento poměr je zapotřebí přizpůsobit tak, aby i píky dvou nejbližších eluujících látek měly dostatečné rozlišení, za minimální přípustnou hodnotu se obvykle považuje 1,5. V případě, že je velký rozdíl mezi retencí jednotlivých analytů, se ovšem může stát, že jiné dvojice látek se od sebe příliš vzdálí a analýza se tak nepřiměřeně prodlouží, zvýší se spotřeba rozpouštědel a podobně. Proto se v takové situaci používá takzvaná gradientová eluce, kdy se poměr složek mobilní fáze mění podle vhodného schématu v průběhu analýzy.

Úkoly:

Optimalizujte složení mobilní fáze pro separaci 5-nitrochinolinu, 1-nitropyrenu, 2-nitrofluorenu a 3-nitrofluoranthenu pomocí HPLC s UV detekcí.

Za optimálních podmínek změřte koncentrační závislost a zhodnoťte citlivost stanovení pomocí této metody.

Pracovní postup:

Ke stanovení budete používat přístrojové vybavení od firmy ECOM, s.r.o., sestávající z degasseru, vysokotlaké pumpy Beta a spektrofotometrického detektoru Sapphire.

Separace bude prováděna na koloně Kromasil (250 × 4,6 mm, 7,0 μm, Phenomenex)

s chemicky vázaným oktadecylem. Nastříkujte 20 μl methanolického vzorku, průtokovou rychlost nastavte na $1,0 \text{ ml min}^{-1}$. K optimalizačním měřením použijte ekvimolární roztok směsi analytů o koncentraci $1 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ v methanolu.

Vlnovou délku, potřebnou pro vhodné nastavení spektrofotometrického detektoru, zjistíte porovnáním přiložených UV/VIS spekter stanovovaných látek.

Přístroje zapněte a nastavte prostřednictvím počítačového řízení podle návodu k programu Clarity.

Změřte chromatogramy studovaných látek s použitím následujících mobilních fází a gradientových programů:

- a) isokratická eluce, methanol : voda v poměru 70 : 30;
- b) isokratická eluce, methanol : voda v poměru 90 : 10;
- c) gradient, kdy se procento methanolu mění z 30 % na počátku analýzy na 10 % v desáté minutě;
- d) gradient, kdy se procento methanolu mění z 10 % na počátku analýzy na 30 % v desáté minutě;
- e) gradient, kdy je procento methanolu udržované od počátku analýzy do 4. minuty na 30 %, do sedmé minuty poklesne na 10 % a na této hodnotě je udržováno do konce analýzy.

Získané chromatogramy porovnejte a vyberte optimální variantu.

Za optimálních podmínek změřte koncentrační závislost v rozsahu koncentrací 1×10^{-5} až $1 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Vyhodnoťte linearitu závislosti a mez stanovitelnosti metody.

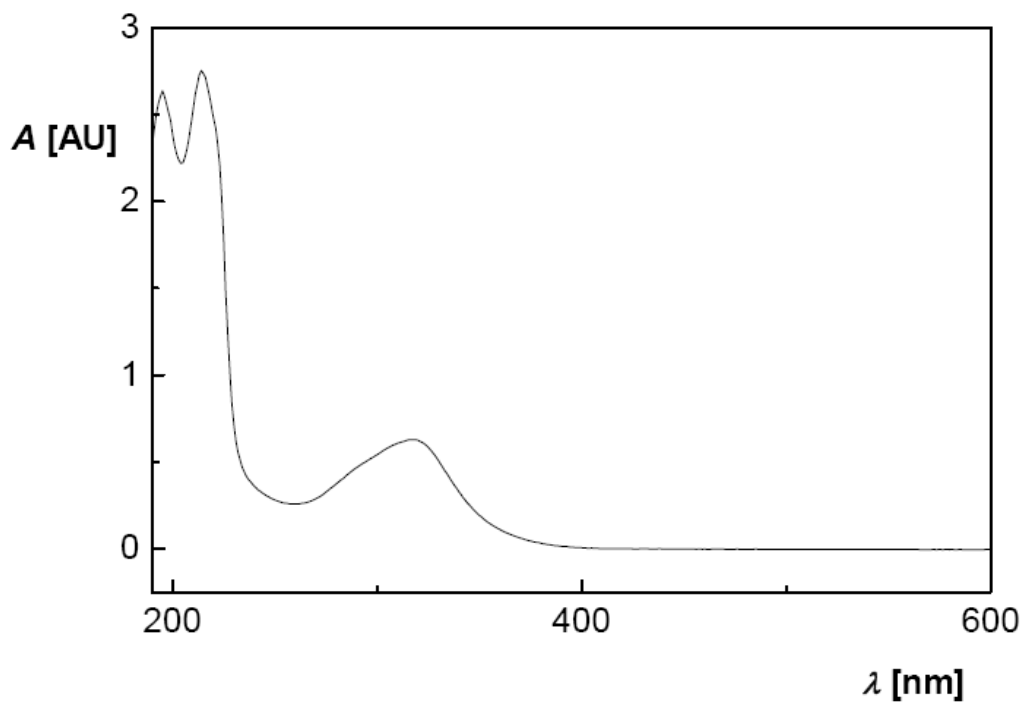
Literatura:

Z. Králová: Diplomová práce, Univerzita Karlova, Praha 2009.

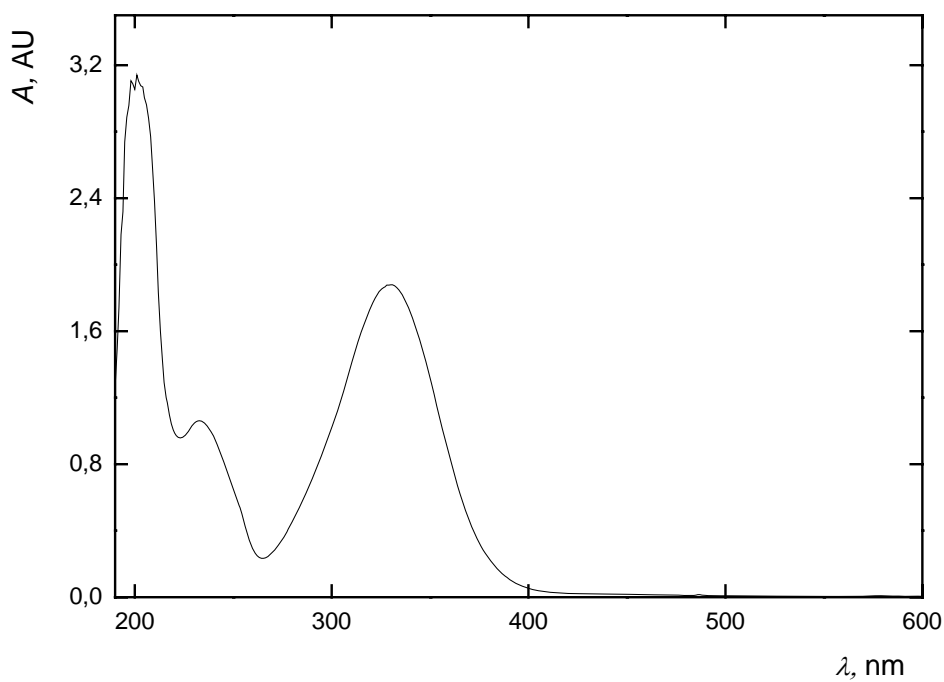
K.Štulík a kol.: Analytické separační metody, Karolinum, Praha 2005.

J. Barek a kol.: Electroanalysis, 13 (2001) 799-803.

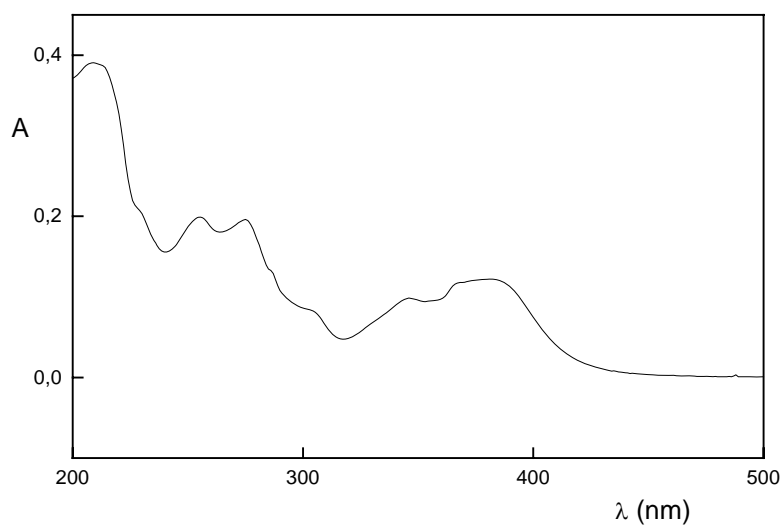
Příloha 1: UV/VIS spektra stanovovaných látek



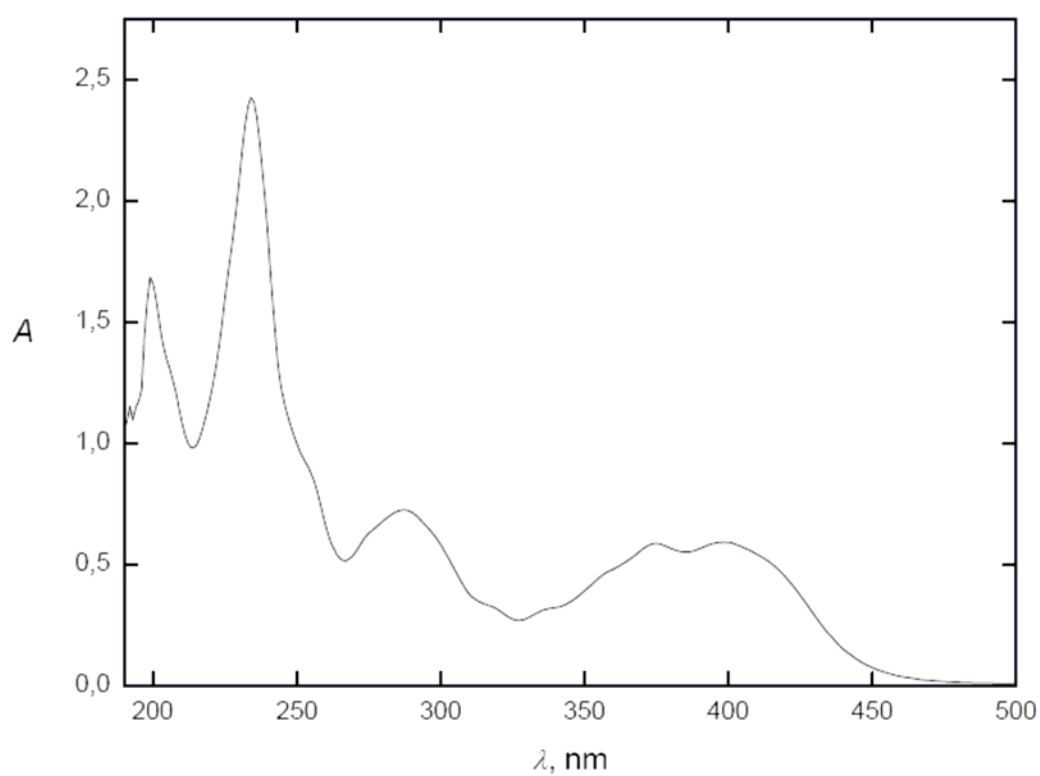
Absorpční spektrum roztoku 5-nitrochinolinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$) ve vodě. Měřeno proti methanolu v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm.



Absorpční UV-VIS spektrum roztoku 2-nitrofluorenu v methanolu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$). Měřeno proti methanolu v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm.



Absorpční spektrum roztoku 3-nitrofluoranthenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v methanolu. Měřeno proti methanolu v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm.



Absorpční spektrum 1-nitropyrenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-3}$) v methanolu. Měřeno proti methanolu v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 5 mm.