

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Vývoj metody pro stanovení vybraných  
aromatických aminů pomocí LC/MS**

Bakalářská práce

**Adéla Veselá**

Školitelka: Ing. Pavla Fojtíková, Ph.D.

České Budějovice 2023

Veselá, A., 2023: Vývoj metody pro stanovení vybraných aromatických aminů pomocí LC/MS. [Development of a method for the determination of selected aromatic amines by LC/MS. Bc. Thesis, in Czech.] – 50 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Anotace**

Cigarette butts, which are the subject of this work, are a very common waste that occurs in nature. Cigarette butts contain a variety of compounds including aromatic amines. Some of these are carcinogenic. In the bachelor thesis, an LC/MS method was developed for the determination of six primary aromatic amines. The chromatographic conditions was first optimized to achieve separation of all six analytes. The chromatographic separation was performed on a Kinetex Biphenyl column. A suitable mobile phase was selected. The mobile phase consisted of 0.1 % formic acid, 4 % acetonitrile and 2.5 mM ammonium acetate in water and 0.1 % formic acid, 50 % acetonitrile and 2.5 mM ammonium acetate in water (gradient elution). Then the mass detection was optimized to achieve a stable and intense detector signal. The developed method was finally applied to the analysis of extracts during the optimization of the extraction process of amines from cigarette butts.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 12.4. 2023

Adéla Veselá

## **Klíčová slova**

2-toluidin, 1-naftylamin, 2-naftylamin, 3-aminobifenyl, 4-aminobifenyl, benzidin, kapalinová chromatografie, hmotnostní detekce, optimalizace, validace.

## **Key words**

2-toluidine, 1-naphthylamine, 2-naphthylamine, 3-aminobiphenyl, 4-aminobiphenyl, benzidine, liquid chromatography, mass detection, optimization, validation.

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé školitelce Ing. Pavle Fojtíkové, Ph.D. za cenné rady a zkušenosti, které mi poskytla při konzultacích, za vstřícnost a ochotu během psaní mé bakalářské práce.

# Obsah

|       |                                                                      |    |
|-------|----------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | Úvod.....                                                            | 1  |
| 2     | Teoretická část.....                                                 | 2  |
| 2.1   | Aromatické aminy.....                                                | 2  |
| 2.2   | Vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí .....    | 3  |
| 2.2.1 | Optimalizace parametrů chromatografické separace .....               | 4  |
| 2.2.2 | Optimalizace parametrů hmotnostní detekce .....                      | 4  |
| 2.3   | Možnosti stanovení aromatických aminů pomocí HPLC/MS .....           | 5  |
| 2.4   | Extrakce aromatických aminů.....                                     | 7  |
| 3     | Experimentální část.....                                             | 8  |
| 3.1   | Přehled standardů a vnitřních standardů .....                        | 8  |
| 3.2   | Použité chemikálie .....                                             | 9  |
| 3.3   | Použité přístroje a materiály .....                                  | 10 |
| 3.4   | Příprava použitých roztoků .....                                     | 10 |
| 3.4.1 | Mobilní fáze .....                                                   | 10 |
| 3.4.2 | Zásobní roztoky standardů .....                                      | 12 |
| 3.4.3 | Zásobní roztoky vnitřních standardů.....                             | 12 |
| 3.4.4 | Příprava kalibračních roztoků .....                                  | 13 |
| 3.5   | Extrakce aminů z cigaretových nedopalků .....                        | 14 |
| 4     | Výsledky a diskuze.....                                              | 17 |
| 4.1   | Přímá infuze .....                                                   | 17 |
| 4.2   | Infuze do proudu mobilní fáze.....                                   | 18 |
| 4.3   | Optimalizace složení mobilní fáze.....                               | 18 |
| 4.4   | Optimalizace hmotnostní detekce .....                                | 19 |
| 4.4.1 | Optimalizace podmínek elektrospreje.....                             | 20 |
| 4.4.2 | Optimalizace iontové optiky a kolizní energie.....                   | 20 |
| 4.4.3 | Optimalizace objemu a koncentrace nástriku a doby plnění pasti ..... | 22 |

|       |                                                                      |    |
|-------|----------------------------------------------------------------------|----|
| 4.5   | Výsledná analytická metoda .....                                     | 24 |
| 4.6   | Validace analytické metody .....                                     | 25 |
| 4.6.1 | Rozsah metody .....                                                  | 26 |
| 4.6.2 | Mez detekce a mez stanovitelnosti.....                               | 28 |
| 4.6.3 | Správnost a přesnost.....                                            | 29 |
| 4.7   | Stanovení obsahu aromatických aminů v cigaretových nedopalcích ..... | 31 |
| 5     | Závěr.....                                                           | 32 |
| 6     | Seznam použitých zdrojů .....                                        | 34 |
| 7     | Přílohy .....                                                        | 38 |
| 7.1   | Příloha A .....                                                      | 38 |
| 7.2   | Příloha B .....                                                      | 39 |
| 7.3   | Příloha C .....                                                      | 40 |
| 7.4   | Příloha D .....                                                      | 41 |
| 7.5   | Příloha E.....                                                       | 42 |
| 7.6   | Příloha F.....                                                       | 43 |
| 7.7   | Příloha G .....                                                      | 44 |
| 7.8   | Příloha H .....                                                      | 45 |
| 7.9   | Příloha CH .....                                                     | 46 |
| 7.10  | Příloha I.....                                                       | 47 |
| 7.11  | Příloha J.....                                                       | 48 |
| 7.12  | Příloha K .....                                                      | 49 |
| 7.13  | Příloha L.....                                                       | 50 |

# Seznam zkratek

|                              |                                                    |
|------------------------------|----------------------------------------------------|
| 3-AMB                        | 3-aminobifenyl                                     |
| 4-AMB                        | 4-aminobifenyl                                     |
| 4-AMB-d9                     | 4-aminobifenyl-d9                                  |
| BEN                          | benzidin                                           |
| $V_{\text{celk}}$            | celkový objem                                      |
| PSA                          | ethylendiamin-N-propyl sorbent                     |
| SPE                          | extrakce pevnou fází                               |
| m                            | hmotnost                                           |
| MS                           | hmotnostní detekce                                 |
| HLB                          | hydrofilně-lipofilní sorbent                       |
| ESI                          | ionizace elektrosprejem                            |
| c                            | koncentrace                                        |
| CBEN                         | koncentrace benzidinu                              |
| C2-NAL-d7                    | koncentrace 2-naftylaminu-d7                       |
| CST                          | koncentrace pracovního roztoku standardů           |
| CVS                          | koncentrace pracovního roztoku vnitřních standardů |
| LOD                          | mez detekce                                        |
| LOQ                          | mez stanovitelnosti                                |
| IARC                         | Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny           |
| MF                           | mobilní fáze                                       |
| MFA                          | mobilní fáze A                                     |
| MFB                          | mobilní fáze B                                     |
| M                            | molární hmotnost                                   |
| MRM                          | monitorování více reakcí                           |
| 1-NAL                        | 1-naftylamin                                       |
| 2-NAL                        | 2-naftylamin                                       |
| 2-NAL-d7                     | 2-naftylamin-d7                                    |
| V                            | objem                                              |
| $V_{\text{MFA}}$             | objem mobilní fáze A                               |
| $V_{\text{ST} - \text{mix}}$ | objem pracovního roztoku standardů                 |
| $V_{\text{VS} - \text{mix}}$ | objem pracovního roztoku vnitřních standardů       |
| PAU                          | polycyklické aromatické uhlovodíky                 |

|          |                                        |
|----------|----------------------------------------|
| m/z      | poměr hmotnosti a náboje               |
| S/N      | poměr signálu a šumu                   |
| WHO      | Světová zdravotnická organizace        |
| MTBE     | terc-butylmethylether                  |
| 2-TOL    | 2-toludin                              |
| 2-TOL-d7 | 2-toluidin-d7                          |
| UV       | ultrafialové záření                    |
| VS       | vnitřní standard                       |
| HPLC     | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |



# 1 Úvod

Primární aromatické aminy jsou chemické látky, které obsahují aminovou funkční skupinu přímo navázanou na aromatické jádro. Nejjednodušší primární aromatický amin je anilin a od této sloučeniny jsou odvozeny až stovky dalších aromatických aminů. Některé z těchto látek jsou považovány za karcinogenní a mohou způsobovat rakovinu močového měchýře a močových cest u člověka. Aromatické aminy mají velké průmyslové využití při výrobě barviv a pigmentů, mohou však být obsaženy i v plastovém nádobí či obalech. Spolu s mnoha dalšími škodlivými látkami se nacházejí v cigaretovém kouři. Kouření cigaret je v dnešní době velmi rozšířené. Škodlivé látky, vzniklé v průběhu kouření cigaret, se uvolňují do ovzduší a způsobují kontaminaci životního prostředí. Cigaretové nedopalky, jež jsou předmětem této práce, jsou velmi běžným odpadem, který se vyskytuje v přírodě.

Cílem této práce bylo zavést metodu pro analýzu vybraných aromatických aminů pomocí LC/MS. Dílčími cíli bakalářské práce byl vývoj, optimalizace a validace analytické metody. Poté následovala optimalizace procesu extrakce aromatických aminů z cigaretových nedopalků a analýza získaných extraktů s využitím zavedené metody.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Aromatické aminy

Kouření cigaret představuje obrovské riziko, které je velkým tématem po celém světě. Cigaretový kouř obsahuje velké množství různých prvků a sloučenin, do roku 2012 jich bylo identifikováno více než 6 000 [1]. Některé z látek, které jsou v cigaretovém kouři obsaženy, jsou karcinogenní a mohou mít za následek iniciaci procesu karcinogenese [2]. V cigaretovém kouři můžeme nalézt například různé kovy (Al, Fe, Br, Mn), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), nitrosloučeniny, N-nitrosoaminy a rovněž aromatické aminy, kterými se zabývá tato bakalářská práce [3]. Aromatické aminy vzniklé v průběhu kouření cigaret následně kontaminují okolní vzduch a další složky životního prostředí [4]. V cigaretovém kouři se z aromatických aminů vyskytují především 2,6-dimethylanilin, 2-toluidin, 3-toluidin, 4-toluidin, 1-naftylamin, 2-naftylamin, 3-aminobifenyl, 4-aminobifenyl a o-anisidin [5–8].

Primární aromatické aminy jsou chemické látky, které obsahují aminovou funkční skupinu ( $-NH_2$ ), jež je přímo vázaná na aromatické jádro [9]. Aromatické aminy mají velké průmyslové využití, využívají se při výrobě kaučuku, polyuretanu, pesticidů, barviv, pigmentů a léčiv [10–12]. Také je můžeme najít v některém spotřebním zboží, a to například v barvách na vlasy či v kuchyňském nádobí. Jejich dalším zdrojem je, jak již bylo zmíněno, tabákový kouř [13].

V mnoha studiích bylo zjištěno, že aromatické aminy působí jako karcinogeny a vedou k nádorovým onemocněním močového měchýře a močových cest u člověka. Aromatické aminy mohou s proteiny a DNA vytvářet adukty, zejména při kyselém pH moči [14–19]. Některé z nich jsou hepatotoxické a vyvolávají methemoglobinemii (anilin a jeho deriváty) [2, 20]. Mezi karcinogenní látky patří nitrosaminy, které snadno vznikají z aromatických aminů a vyskytují se v tabákovém kouři, ale i v potravinách [21]. Podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) a Světové zdravotnické organizace (WHO) je několik aromatických aminů uvedeno jako známe karcinogeny u lidí [22, 23]. Podle IARC byly benzidin, 2-toluidin, 4-aminobifenyl a 2-naftylamin určeny jako karcinogeny skupiny 1, jako karcinogeny skupiny 2B o-anisidin a 2,6-dimethylanilin a 1-naftylmain jako karcinogen skupiny 3 [2, 24, 25]. IARC klasifikuje látky skupiny 1 jako karcinogenní pro člověka, látky skupiny 2A jako pravděpodobně karcinogenní pro člověka, 2B jako látky s potenciálním karcinogenním účinkem pro člověka a 3 jako látky neklasifikovatelné z hlediska karcinogenity pro člověka [25].

V roce 2012 byly 2-toluidin, 1-naftylamin, 2-naftylamin, 4-aminobifenyl, o-anisidin a 2,6-dimethylanilin přidány na seznam škodlivých a potencionálně škodlivých složek v tabákových výrobcích a tabákovém kouři americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv [26].

Stanovení aromatických aminů ve vzorcích životního prostředí je obtížné vzhledem k jejich tendenci podléhat dalším reakcím. V tabákovém kouři některé aromatické aminy reagují s dalšími složkami kouře během několika sekund [3, 27]. Literatura uvádí, že průměrná koncentrace aromatických aminů v různých složkách tabákového kouře se pro většinu stanovovaných aromatických aminů pohybovala řádově v jednotkách či desítkách ng/cig, nejvyšší koncentrace byly publikovány pro anilin a 1-naftylamin, řádově stovky ng/cig a o řád více u 2-toluidinu [3].

## **2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC/MS) je fyzikálně-chemická analytická metoda, která se používá pro kvantifikaci, identifikaci látek a k určení molekulové hmotnosti [28, 29]. Je velmi klíčová pro analýzu složitějších vzorků, jako příklad lze uvést vzorky s environmentální matricí, biologické tkáně a tekutiny [28]. Chromatografická separace má za účel rozdělit složky vzorku a hmotnostní detekce následně složky vzorku identifikovat, a to na základě poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) jejich produktových iontů, které vznikají fragmentací iontů molekulových [29]. Hmotnostní spektrometry mohou být použity na identifikaci i kvantifikaci analytů v komplexních směsích různých sloučenin. Mobilní fáze v LC/MS se účastní i ionizace, tudíž nemohou být použity klasické mobilní fáze pro HPLC. Jako vhodné mobilní fáze se využívají těkavá rozpouštědla, obvykle methanol nebo acetonitril, a to ve spojení s těkavými aditivami, kterými mohou být např. kyselina mravenčí nebo octová a pufr octanu nebo mravenčanu amonného (koncentrace aditiv  $<10 \text{ mol/l}$ ) [28].

Detekce látek pomocí hmotnostního spektrometru probíhá ve třech krocích. Jako první dochází k ionizaci molekul analytů ve vzorku. Tento krok je proveden buď za sníženého tlaku nebo za atmosférického tlaku. Ve druhém kroku dochází v hmotnostním analyzátoru za přítomnosti vakua k rozdělení iontů, a to na základě poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Hmotnostní analyzátor také slouží k urychlení prošlých iontů a fokusaci.

Nakonec je provedena detekce iontů [28]. V detektoru iontů je přeměňována energie iontů na elektrický signál, který je po digitalizaci zpracováván.

### **2.2.1 Optimalizace parametrů chromatografické separace**

Optimalizace je prováděna, aby byly nastaveny co nejvhodnější parametry, které ovlivňují chromatografickou separaci [29]. Separace látek může být ovlivněna zásahem do chromatografického systému, který buď změní jeho účinnost (kinetický aspekt) nebo sílu interakce mezi analytem a sorbentem (termodynamický aspekt) [30]. Cílem optimalizace je dosažení co nejlepšího rozlišení jednotlivých analytů. Vždy je snahou co nejkratší délka analýzy za současného dodržení dostatečně velkého kapacitního poměru pro analyt s nejnižším retenčním časem (kapacitní poměr  $\geq 2$ ). V průběhu optimalizace je důraz kladen na symetrii píku. Při dané koncentraci chceme docílit také co nejvyššího poměru signálu analytu k šumu (S/N), aby byla mez detekce (S/N = 3) a mez stanovitelnosti (S/N = 10) co nejnižší. Mezi optimalizované parametry náleží: vlastnosti stacionární fáze (typ chemicky vázané funkční skupiny, velikost částic a pórů nosiče a rozměry kolony), složení mobilní fáze, rychlost toku mobilní fáze, objem nástřiku vzorku a teplota separace [29].

### **2.2.2 Optimalizace parametrů hmotnostní detekce**

Po optimalizaci parametrů chromatografické separace, kterou popisuje kapitola 2.2.1, jsou následně optimalizovány parametry hmotnostní detekce. Tyto parametry jsou optimalizovány, kvůli nalezení takové kombinace parametrů hmotnostní detekce, aby byl zajištěn stabilní iontový zdroj a odezva detektoru byla co nejvyšší. Mezi optimalizované parametry patří např: kolizní energie a výběr produktových iontů, průtok hlavního a vedlejšího zmlžujícího plynu, teplota transferové trubice, iontová optika nebo maximální doba plnění iontové pasti a počet mikroskenů. Pokud je použita HESI ionizační technika, tak se mobilní fáze přímo podílí na ionizačním procesu, a složení mobilní fáze může následně ovlivnit odezvu detektoru [29, 31].

Hlavní a vedlejší zmlžující plyn je většinou dusík o čistotě  $\geq 99$  %. Hlavní zmlžující plyn slouží k zmlžování a odpařování mobilní fáze, která vystupuje z kapiláry a vstupuje do prostoru iontového zdroje. Vedlejší zmlžující plyn zejména zaostřuje kužel spreje a také snižuje vlhkost v iontovém zdroji. Co se týká transferové trubice, optimalizuje se pouze její teplota a prostupují jí ionty z iontového zdroje do iontové optiky. Dalším parametrem je kolizní energie, která je nutná k fragmentaci molekulového iontu, ze kterého vzniká iont produktový. [29] Dále je optimalizována iontová optika a doba plnění pasti. Vhodným

nastavením iontové optiky, zejména napětí na prstencových elektrodách (S-lens a F-lens) je možné dosáhnout optimálního urychlení a fokusace iontů před vstupem do hmotnostního analyzátoru. S-čochky jsou umístěny přímo za transferovou trubicí a F-čochky na konci iontové optiky. F-čochky regulují rychlost iontů, které letí z iontové optiky do hmotnostního analyzátoru [29]. Vhodným nastavením doby plnění pasti lze pozitivně ovlivnit poměr signálu a šumu, a tedy mez detekce. Optimální doba plnění pasti se hledá tak, aby byl současně pík složen z dostatečného počtu bodů a zároveň aby byl dosažen co nejvyšší poměr S/N [31].

## 2.3 Možnosti stanovení aromatických aminů pomocí HPLC/MS

Literární rešerše shrnuje přípravu roztoků standardů, parametry chromatografické separace a hmotnostní detekce. Jednotlivé metody, kterými se práce inspirovala, se lišily přípravou roztoků standardů, použitou stacionární a mobilní fází, teplotou separace a objemy nástríku vzorku. Informace z literární rešerše byly shrnuty v Tab. 1.

Publikace se zabývaly aromatickými aminy v životním prostředí (ve vzduchu) [32], v cigaretovém kouři [33–35], v potravinářských obalech a potištěných plastových sáčcích [36], v kuchyňském nádobí [24] a v jedné z publikací byly aromatické aminy stanovovány v lidské moči [37]. V rešeršovaných publikacích byla věnována pozornost zejména deseti aromatickým aminům, a to 2-toluidinu, 3-toluidinu, 4-toluidinu, 4-aminobifenyly, anilinu, anisidinu, 1-naftylaminu, 2-naftylaminu, 2,6-dimethylanilinu, 4-chloranilinu a v některých publikacích také dvěma markerům tabákového kouře, a to nikotinu a kotininu [32, 37].

V publikacích byla používána bifenylová stacionární fáze [32, 37] nebo C18 stacionární fáze [33–36, 38] a dále PFP stacionární fáze [24]. Teplota v kolonovém prostoru se pohybovala v rozmezí 22–50 °C. Při využití hmotnostní detekce byly mobilní fáze A (MFA) i mobilní fáze B (MFB) okyseleny kyselinou mravenčí na objemovou koncentraci 0,1 % [24, 32, 34–37], v jedné publikaci byla MFA okyselena kyselinou mravenčí na objemovou koncentraci 0,05 % a MFB na pH 4,5 [33]. Při využití UV detekce byl do mobilní fáze přidán octan amonný o koncentraci 10 mM [38]. V mobilních fázích byla použita voda a dvě organická rozpouštědla, methanol [32, 36, 37] a acetonitril [24, 33–35, 38]. Kyselina mravenčí byla použita, jelikož měla pozitivní vliv na intenzitu signálu hmotnostního detektoru, separaci a ionizaci aromatických aminů, zatímco octan amonný byl obsažen v mobilní fázi pouze v jedné publikaci s použitím UV detekce [38], jelikož v ostatních publikovaných metodách s MS detekcí docházelo ke ztrátě signálu [33–35, 37]. Ve všech publikacích byla zvolena gradientová eluce. Analyty byly stanovovány s využitím tandemové hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií, hmotnostní spektrometr

byl provozován v režimu pozitivní ionizace elektrosprejem (ESI) [32–37]. Do přehledu metod byla zahrnuta jedna aplikace využívající UV detekci [38]. V Tab. 1 jsou uvedeny meze detekce, které byly v jednotlivých publikacích zjištěny.

Tab. 1: Přehled informací k vývoji metody z vybraných publikací

| Kolona                                                                             | MFA                                                       | MFB                                       | Mez detekce      | Citace |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------|--------|
| Shield RP18<br>(150 x 2,1 mm, 3,5 µm)                                              | 0,1 obj. %<br>k. mravenčí,<br>voda                        | 0,1 obj. %<br>k. mravenčí,<br>acetonitril | 0,05–0,96 ng/cig | [34]   |
| Poroshell 120 EC-C18<br>(100 x 3,0 mm, 2,7 µm)                                     | 0,1 obj. %<br>k. mravenčí,<br>voda                        | 0,1 obj. %<br>k. mravenčí,<br>acetonitril | 0,04–0,58 ng/cig | [35]   |
| Ultra BiPh<br>(100 x 2,1 mm, 5 µm)<br>a ochranná C18 kolona<br>(20 x 2,1 mm, 5 µm) | 0,1 obj. %<br>k. mravenčí,<br>5 obj. %<br>methanol, voda  | 0,1 obj. %<br>k. mravenčí,<br>methanol    | 0,025–0,20 ng/ml | [37]   |
| Ultra BiPh<br>(100 x 2,1 mm, 5 µm)<br>a ochranná C18 kolona<br>(20 x 2,1 mm, 5 µm) | 0,1 obj. %<br>k. mravenčí,<br>5 obj. %<br>methanol, voda  | 0,1 obj. %<br>k. mravenčí,<br>methanol    | 0,025–0,5 ng/g   | [32]   |
| Poroshell EC-C18<br>(100 x 4,6 mm, 2,7 µm)                                         | 0,1 obj. %<br>k. mravenčí,<br>methanol                    | 0,1 obj. %<br>k. mravenčí,<br>voda        | 0,2–10 ng/g      | [36]   |
| Polaris C18<br>(50 x 4,6 mm, 0,18 µm)                                              | 0,05 obj. %<br>k. mravenčí,<br>acetonitril                | k. mravenčí, voda<br>(pH 4,5)             | 0,04–0,59 ng/cig | [33]   |
| Poroshell 120 PFP<br>(150 x 2,1 mm, 2,7 µm)                                        | 0,1 obj. %<br>k. mravenčí,<br>voda                        | acetonitril                               | 0,06–0,1 ng/g    | [24]   |
| Kinetex EVO C18<br>(150 x 2,1 mm, 2,6 µm)                                          | 10mM<br>octan amonný,<br>5 obj. %<br>acetonitril,<br>voda | acetonitril                               | –                | [38]   |

## 2.4 Extrakce aromatických aminů

Vlastnímu stanovení aromatických aminů pomocí HPLC/MS předchází extrakce analytů z materiálu, ve kterém mají být sloučeniny stanoveny. Aromatické aminy byly extrahovány z prachu [32] nebo z částicové frakce zachycené na filtru přes který procházel cigaretový kouř [2, 34, 39], dále byl rovněž popsán postup extrakce aromatických aminů ze vzorků moči [37].

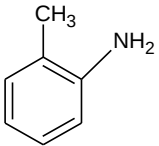
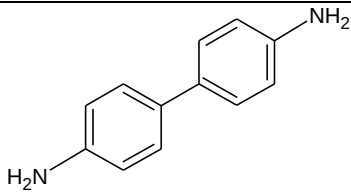
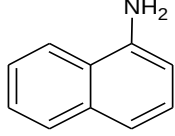
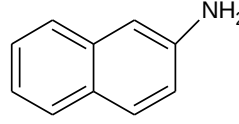
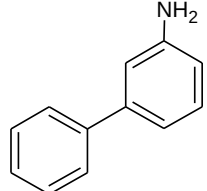
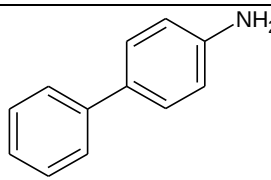
Extrakce byly prováděny do terc-butylmethyletheru působením ultrazvuku [32, 37], do okyselené vody kyselinou chlorovodíkovou na třepačce s následným vyextrahováním do toluenu či n-hexanu [2, 39] a zakoncentrováním na vakuové odparce nebo SPE přečištěním. Dalším extrakčním postupem byla extrakce do okyselené vody působením ultrazvuku s následnou úpravou pH a SPE extrakcí [34]. V případě, že extrakce byla prováděna do terc-butylmethyletheru bylo extrakční činidlo následně odpařeno pod dusíkem a vyextrahované látky byly rozpuštěny v mobilní fázi. Pro SPE přečištění byly použity HLB sorbenty (lipofilní divinylbenzen a hydrofilní N-vinylpyrrolidon) [34] nebo směsné sorbenty s obsahem síranu hořečnatého, aminu (PSA), C18 frakce a uhlíkových sazí [2]. Jednotlivé procesy byly optimalizovány za účelem maximálního zakoncentrování extraktů při současném splnění požadované výtěžnosti procesu.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Přehled standardů a vnitřních standardů

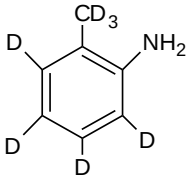
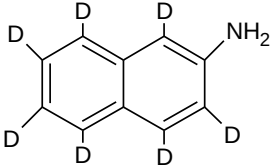
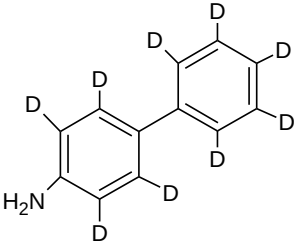
Stanovanými látkami v této bakalářské práci jsou 2-toluidin, benzidin, 1-naftylamin, 2-naftylamin, 3-aminobifenyl a 4-aminobifenyl a jako vnitřní standardy v této práci byly použity 2-toluidin-d7, 2-naftylamin-d7 a 4-aminobifenyl-d9. Přehled standardů je uveden v Tab. 2. a přehled vnitřních standardů v Tab. 3. Pro každý analyt je uveden název, v bakalářské práci použité označení, molární hmotnost a vzorec.

Tab. 2: Přehled standardů

| Standard       | Sumární vzorec    | Označení | M [g/mol] | Strukturní vzorec                                                                     |
|----------------|-------------------|----------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 2-toluidin     | $C_7H_9N$         | 2-TOL    | 107,15    |   |
| benzidin       | $C_{12}H_{12}N_2$ | BEN      | 184,24    |  |
| 1-naftylamin   | $C_{10}H_9N$      | 1-NAL    | 143,19    |  |
| 2-naftylamin   | $C_{10}H_9N$      | 2-NAL    | 143,19    |  |
| 3-aminobifenyl | $C_{12}H_{11}N$   | 3-AMB    | 169,22    |  |
| 4-aminobifenyl | $C_{12}H_{11}N$   | 4-AMB    | 169,22    |  |



Tab. 3: Přehled vnitřních standardů

| Vnitřní standard  | Sumární vzorec  | Označení | M [g/mol] | Strukturní vzorec                                                                   |
|-------------------|-----------------|----------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 2-toluidin-d7     | $C_7H_2D_7N$    | 2-TOL-d7 | 114,20    |  |
| 2-naftylamin-d7   | $C_{10}H_2D_7N$ | 2-NAL-d7 | 150,23    |  |
| 4-aminobifenyl-d9 | $C_{12}H_2D_9N$ | 4-AMB-d9 | 178,28    |  |

## 3.2 Použité chemikálie

V práci byly použity následující chemikálie:

- Standardy: 2-toluidin – čistota 98 % (Sigma Aldrich), 1-naftylamin – čistota 98 % (Sigma Aldrich), 2-naftylamin – čistota 95 % (Sigma Aldrich), benzidin – čistota 98 % (Sigma Aldrich), 3-aminobifenyl – čistota 97 % (Sigma Aldrich), 4-aminobifenyl – čistota 98 % (Sigma Aldrich)
- Vnitřní standardy: 2-toluidin-d7 – čistota 100 % (Toronto Research Chemicals), 2-naftylamin-d7 – čistota 100 % (Toronto Research Chemicals), 4-aminobifenyl-d9 – čistota 100 % (Toronto Research Chemicals)
- Mobilní fáze: Acetonitril pro LC-MS (VWR Chemicals), methanol pro LC-MS (VWR Chemicals), milli-Q voda generovaná přístrojem Smart2Pure 6 UV/UF (Thermo Scientific), kyselina mravenčí (Fisher chemical), octan amonný (Sigma Aldrich)
- Rozpouštědla pro extrakce: MTBE (Merck)

### 3.3 Použité přístroje a materiály

V této bakalářské práci byly použity přístroje a materiály uvedené níže:

- Odměrné a laboratorní sklo
- Krimpovací kleště
- Krimpovací vialky s hliníkovým uzávěrem s pryžovým septem, plastové špičky, centrifugační zkumavky, plastové zkumavky
- Automatická pipeta: o objemech 10–100  $\mu$ l, 100–1000  $\mu$ l a 1–10 ml (Eppendorf Research Plus)
- Skleněná dávkovací stříkačka: o objemech 5, 10, 25, 50, 100, 250 a 500  $\mu$ l (Hamilton)
- Analytické váhy: MS105DU (Mettler Toledo)
- Výrobník milli-Q vody: Smart2Pure 6 UV/UF (Thermo Scientific)
- Ultrasonic Cleaner USC – THD (VWR)
- Centrifuga 3–30 K (Sigma)
- Generátor dusíku Genius 1022 (Peak Scientific) s termoblokem (Stuart)
- Kapalinový chromatograf UltiMate 3000 (Thermo)
- Hmotnostní detektor Velos Pro (Thermo) - lineární iontová past, ionizace vyhřívaným elektrosprejem
- Chromatografická kolona: Kinetex (150 x 3 mm, 2,6  $\mu$ m Biphenyl)
- Zpracování výsledků: Thermo Scientific Xcalibur, Microsoft Excel 365, Thermo Tune Plus

### 3.4 Příprava použitých roztoků

#### 3.4.1 Mobilní fáze

Na základě literární rešerše, která je shrnuta v kapitole 2.3, bylo v průběhu optimalizace metody postupně použito pět různých mobilních fází A a mobilních fází B, jejichž složení můžeme vidět v Tab. 4.

Jako první MFA byla zvolena milli-Q voda s 5 obj. % methanolu, 0,1 obj. % kyseliny mravenčí a MFB 0,1 obj. % kyseliny mravenčí v methanolu.

Jako druhá MFA byla zvolena milli-Q voda, 4 obj. % acetonitrilu, 0,1 obj. % kyseliny mravenčí a MFB milli-Q voda, 50 obj. % acetonitrilu a 0,1 obj. % kyseliny mravenčí.

Jako třetí MFA byla vybrána milli-Q voda, 4 obj. % acetonitrilu, 0,1 obj. % kyseliny mravenčí, 5mM octan amonný a MFB milli-Q voda, 50 obj. % acetonitrilu, 0,1 obj. % kyseliny mravenčí a 5mM octan amonný.

Jako čtvrtá MFA byla vybrána milli-Q voda, 4 obj. % acetonitrilu, 0,1 obj. % kyseliny mravenčí, 2,5mM octan amonný a MFB milli-Q voda, 50 obj. % acetonitrilu, 0,1 obj. % kyseliny mravenčí a 2,5mM octan amonný.

Jako poslední MFA byla zvolena milli-Q voda, 4 obj. % acetonitrilu, 0,1 obj. % kyseliny mravenčí, 7,5mM octan amonný a MFB milli-Q voda, 50 obj. % acetonitrilu, 0,1 obj. % kyseliny mravenčí a 7,5mM octan amonný.

Tab. 4: Složení pěti mobilních fází použitých v průběhu bakalářské práce

| Mobilní fáze | MFA                                                                                          | MFB                                                                                           |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1            | voda, 5 obj. % methanolu,<br>0,1 obj. % kyseliny mravenčí                                    | methanol, 0,1 obj. % kyseliny<br>mravenčí                                                     |
| 2            | voda, 4 obj. % acetonitrilu,<br>0,1 obj. % kyseliny mravenčí                                 | voda, 50 obj. % acetonitrilu,<br>0,1 obj. % kyseliny mravenčí                                 |
| 3            | voda, 4 obj. % acetonitrilu,<br>0,1 obj. % kyseliny mravenčí,<br>5mM octan amonný            | voda, 50 obj. % acetonitrilu,<br>0,1 obj. % kyseliny mravenčí,<br>5mM octan amonný            |
| 4            | <b>voda, 4 obj. % acetonitrilu,<br/>0,1 obj. % kyseliny mravenčí,<br/>2,5mM octan amonný</b> | <b>voda, 50 obj. % acetonitrilu,<br/>0,1 obj. % kyseliny mravenčí,<br/>2,5mM octan amonný</b> |
| 5            | voda, 4 obj. % acetonitrilu,<br>0,1 obj. % kyseliny mravenčí,<br>7,5mM octan amonný          | voda, 50 obj. % acetonitrilu,<br>0,1 obj. % kyseliny mravenčí,<br>7,5mM octan amonný          |

### 3.4.2 Zásobní roztoky standardů

Zásobní roztoky všech standardů byly připraveny přesným navážením standardu do 5ml odměrné baňky a jako rozpouštědlo byl použit acetonitril. Přípravu jednotlivých zásobních roztoků standardů můžeme vidět v Tab. 5, kde jsou uvedeny přesné navážky, čistota a hmotnostní koncentrace.

Po přípravě všech zásobních roztoků byly roztoky rozpipetovány vždy do dvou 5ml plastových zkumavek a uchovány v boxu při teplotě -85 °C. Pro přímou infuzi a infuzi do proudu MF byly následně pomocí ředění milli-Q vodou zásobních roztoků standardů připraveny nové roztoky a koncentraci 100 mg/l. Tyto roztoky byly následně opakovaně ředěny, vždy 10x, za účelem zjištění meze detekce pro jednotlivé analyty.

Tab. 5: Příprava zásobních roztoků standardů

| Název          | Označení | Čistota [%] | Rozpouštědlo | V [l] | m [mg] | c [mg/l] |
|----------------|----------|-------------|--------------|-------|--------|----------|
| 2-toluidin     | o-TOL    | 98          | acetonitril  | 0,005 | 5,10   | 1041     |
| benzidin       | BEN      | 98          | acetonitril  | 0,005 | 5,51   | 1124     |
| 1-naftylamin   | 1-NAL    | 98          | acetonitril  | 0,005 | 5,03   | 1027     |
| 2-naftylamin   | 2-NAL    | 95          | acetonitril  | 0,005 | 5,11   | 1076     |
| 3-aminobifenyl | 3-AMB    | 97          | acetonitril  | 0,005 | 5,01   | 1033     |
| 4-aminobifenyl | 4-AMB    | 98          | acetonitril  | 0,005 | 5,03   | 1027     |

### 3.4.3 Zásobní roztoky vnitřních standardů

Zásobní roztoky vnitřních standardů byly připraveny až po zavedení metody, tedy po optimalizaci chromatografické separace a parametrů hmotnostní detekce. Jednotlivé roztoky přibližně o koncentraci 1000 mg/l byly připraveny navážením asi 5 mg vnitřního standardu na analytických vahách, navážka byla rozpuštěna v acetonitrilu a kvantitativně převedena do 5ml odměrné baňky a doplněna po rysku.

Po přípravě zásobního roztoku 2-toluidinu-d7, 2-naftylaminu-d7, 4-aminobifenylu-d9 byly tyto roztoky rozpipetovány do 5ml plastových zkumavek a uchovány v boxu při teplotě -85 °C. Na infuzi do proudu mobilní fáze byly vytvořeny nové roztoky naředěním zásobních roztoků na přibližnou koncentraci 100 mg/l pomocí MFA.

#### 3.4.4 Příprava kalibračních roztoků

Při kalibraci bylo připraveno jedenáct kalibračních úrovní, které byly za účelem validace metody připraveny ve čtyřech nezávislých opakováních. Pro přípravu kalibračních roztoků musel být připraven směsný pracovní roztok standardů a směsný pracovní roztok vnitřních standardů. Pracovní roztok standardů byl připraven do 25ml odměrné baňky a koncentrace standardů v pracovním roztoku byla 10 mg/l až na benzidin, jehož koncentrace byla 1 mg/l, jako rozpouštědlo byla použita MFA. Volba koncentrace vycházela z výsledků prvních měření. Pracovní roztok vnitřních standardů byl připraven do 5ml odměrné baňky tak, aby všechny přidané analyty měly koncentraci 50 mg/l kromě 2-naftylaminu-d7, který měl koncentraci 300 mg/l. Koncentrace tohoto analytu byla zvolena vyšší na základě předchozích měření. Odměrná baňka po přidání správných objemů vnitřních standardů byla doplněna po rysku MFA.

Po přípravě pracovních roztoků bylo možné připravit kalibrační roztoky. Ty byly připraveny do vialek. Nejprve byla do vialek dávkována MFA pomocí automatické pipety, poté pracovní roztok vnitřních standardů pomocí skleněné stříkačky Hamilton a jako poslední pracovní roztok standardů pomocí skleněné stříkačky Hamilton, ale i pomocí automatické pipety na základě velikosti přidávaného objemu. Kromě jedenácti kalibračních roztoků byla ještě připravena vialka pouze s MFA a vialka bez pracovního roztoku standardů, tedy vialka která obsahovala MFA a pracovní roztok vnitřních standardů. Na konci bylo všech třináct vialek zakrimpováno hliníkovým víčkem a promícháno. Jednotlivé koncentrační úrovně a přidávané objemy do jednotlivých vialek můžeme vidět v Tab. 6.

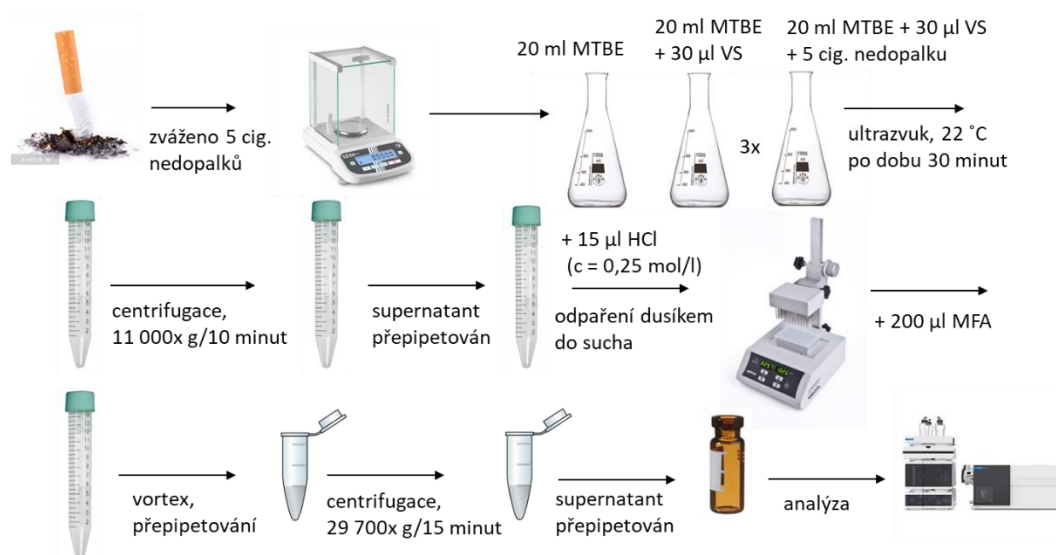
Tab. 6: Příprava kalibračních roztoků

| Kalibrační úroveň | V <sub>ST – mix</sub> [μl] | V <sub>VS – mix</sub> [μl] | V <sub>MFA</sub> [μl] | V <sub>celk</sub> [μl] | C <sub>ST</sub> [mg/l] | C <sub>BEN</sub> [mg/l] | C <sub>VS</sub> [mg/l] | C <sub>2-NAL-d7</sub> [mg/l] |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------------|
| 1                 | 2,5                        | 100                        | 897,5                 | 1000                   | 0,0250                 | 0,00250                 | 5                      | 30                           |
| 2                 | 5                          | 100                        | 895                   |                        | 0,0500                 | 0,00500                 | 5                      | 30                           |
| 3                 | 10                         | 100                        | 890                   |                        | 0,100                  | 0,0100                  | 5                      | 30                           |
| 4                 | 25                         | 100                        | 875                   |                        | 0,250                  | 0,0250                  | 5                      | 30                           |
| 5                 | 50                         | 100                        | 850                   |                        | 0,500                  | 0,0500                  | 5                      | 30                           |
| 6                 | 100                        | 100                        | 800                   |                        | 1,00                   | 0,100                   | 5                      | 30                           |
| 7                 | 175                        | 100                        | 725                   |                        | 1,75                   | 0,175                   | 5                      | 30                           |
| 8                 | 250                        | 100                        | 650                   |                        | 2,50                   | 0,250                   | 5                      | 30                           |
| 9                 | 500                        | 100                        | 400                   |                        | 5,00                   | 0,500                   | 5                      | 30                           |
| 10                | 700                        | 100                        | 200                   |                        | 7,00                   | 0,700                   | 5                      | 30                           |
| 11                | 900                        | 100                        | 0                     |                        | 9,00                   | 0,900                   | 5                      | 30                           |
| MFA               | 0                          | 0                          | 1000                  |                        | 0                      | 0                       | 0                      | 0                            |
| VS                | 0                          | 100                        | 900                   |                        | 0                      | 0                       | 5                      | 30                           |

### 3.5 Extrakce aminů z cigaretových nedopalků

V této práci byly použity čerstvé cigaretové nedopalky značky Marlboro. Postup extrakce byl proveden podle dříve publikovaného postupu, kde byly aromatické aminy zkoumány v prachu [32]. Celý proces extrakce je znázorněn na Obr. 1, obrázky byly převzaty a upraveny od dodavatelů daných materiálů. Nejprve byly připraveny tři Erlenmeyrovy baňky a do každé z nich bylo vloženo pět zvážených cigaretových nedopalků. Do každé baňky bylo přidáno 20 ml rozpouštědla MTBE. Dále byla připravena jedna Erlenmeyrova baňka pouze s 20 ml MTBE. Do všech čtyř baněk bylo následně přidáno 30 μl připraveného roztoku vnitřních standardů o koncentraci 50 mg/l (2-naftylamin-d7 o koncentraci 300 mg/l). Nakonec byla připravena poslední pátá baňka pouze s 20 ml MTBE. Extrakce probíhala po dobu 30 minut ultrazvukem při 22 °C. Poté byly extrakty z baněk pomocí automatické pipety přepipetovány do pěti plastových zkumavek. Do třech Erlenmeyrových baněk s cigaretovými nedopalky bylo znovu přidáno 10 ml rozpouštědla MTBE a byla provedena reextrakce ultrazvukem po dobu 30 minut při 22 °C. Oba podíly extraktů z nedopalků byly spojeny a odstředovány 10 minut při 11 000x g. Supernatant byl odpipetován do pěti nových

plastových zkumavek a do každé bylo přidáno 15  $\mu\text{l}$  HCl o koncentraci 0,25 mol/l. Extrakty byly následně odpařeny do sucha dusíkem a po odpaření bylo do každé zkumavky přidáno 200  $\mu\text{l}$  MFA. Obsah zkumavek byl přibližně 30 s vortexován, přepipetován do 1,5ml eppendorfky a centrifugován po dobu 15 minut při 29 700x g. Nakonec byl supernatant z každé plastové zkumavky přepipetován do skleněné vialky a analyzován. V Tab. 7 můžeme vidět jednotlivé navážky cigaretových nedopalků a množství rozpouštědla MTBE a roztoku vnitřních standardů.



Obr. 1: Extrakční postup

Tab. 7: Jednotlivé navážky cigaretových nedopalků

| <b>Erlenmeyrova<br/>baňka</b> | <b>Hmotnost nedopalku<br/>[g]</b> | <b>MTBE<br/>[ml]</b> | <b>Roztok VS<br/>[μl]</b> |
|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------|---------------------------|
| 1                             | 2,399                             | 30                   | 30                        |
| 2                             | 1,972                             | 30                   | 30                        |
| 3                             | 1,772                             | 30                   | 30                        |
| 4                             | x                                 | 20                   | 30                        |
| 5                             | x                                 | 20                   | x                         |

Před provedením extrakce s reálnými vzorky byla ještě provedena extrakce bez reálného vzorku, který byl nahrazen připraveným roztokem standardů. Extrakce byla provedena úplně stejným způsobem, jen místo třech Erlenmeyrových baněk s cigaretovými nedopalky bylo připraveno devět baněk s 20 ml MTBE, 30 μl roztoku vnitřních standardů o koncentraci 50 mg/l (2-NAL-d7 o koncentraci 300 mg/l) a 75 μl roztoku standardů o koncentraci 10 mg/l (BEN o koncentraci 1 mg/l). Tato extrakce byla provedena, aby bylo ověřeno, že během extrakce nedochází ke ztrátě jednotlivých analytů. Na základě vybraného postupu extrakce bez reálného vzorku byla vypočtena správnost a přesnost. Správnost vyjadřuje míru těsnosti mezi skutečnou hodnotou a výsledkem měření dané veličiny a přesnost míru těsnosti mezi vzájemně nezávislými výsledky analýzy, které byly získány za předem specifikovaných podmínek [30].



## 4 Výsledky a diskuze

Tato kapitola se věnuje popisu a zhodnocení vývoje a validace analytické metody pro stanovení aromatických aminů. Cílem optimalizace metody bylo najít ty nejlepší podmínky pro chromatografickou separaci a následnou detekci analyzovaných látek. Optimalizace byla prováděna na koloně Kinetex-Biphenyl při teplotě 25 °C [32, 37, 38]. Složení mobilních fází vycházelo z literární rešerše. Teplota kolonového prostoru a možnost použití octanu amonného jako aditiva byly zvoleny na základě výsledků ještě neobhajované diplomové práce studentky Přírodovědecké fakulty Anežky Vančurové, zabývající se rovněž analýzou aromatických aminů pomocí HPLC. Při optimalizaci podmínek MS detekce je třeba zohlednit tzv. kritický analyt. Jde o analyt, u kterého se předpokládá nejnížší koncentrace v analyzovaných vzorcích nebo vykazuje nejvyšší mez detekce. V případě zaváděné metody šlo o 2-toluidin. Během optimalizace byly získané parametry porovnávány s dosud publikovanými daty. Po validaci výsledné analytické metody byla metoda použita k analýze reálných vzorků vybraných aromatických aminů.

### 4.1 Přímá infuze

Nejprve byla provedena přímá infuze roztoků jednotlivých standardů o koncentraci 100 mg/l do detektoru. Infuze vnitřních standardů o koncentraci 100 mg/l byla provedena až po optimalizaci metody, a to do proudu zvolené mobilní fáze, která byla v poměru MFA a MFB 1:1. U jednotlivých analytů byla určena pozitivní nebo negativní ionizace a zaznamenána hmotnostní spektra. Na základě fragmentace jednotlivých molekulových iontů byly vybrány produktové ionty každého analytu podle maximální odezvy detektoru. Pro všechny analyty byla vybrána pozitivní ionizace. Vybrané MRM přechody na základě naměřených hmotnostních spekter a produktové ionty byly srovnány s fragmentovými ionty v publikacích, u všech analytů se zjištěné údaje shodovaly [2, 34, 37]. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 8.

Tab. 8: Molekulové a produktové ionty jednotlivých analytů

| <b>Analyt</b> | <b>Molekulový iont [m/z]</b> | <b>Produktový iont [m/z]</b> |     |     | <b>Vybraný produktový iont [m/z]</b> |
|---------------|------------------------------|------------------------------|-----|-----|--------------------------------------|
| 2-TOL         | 108                          | 91                           | 93  | x   | <b>93</b>                            |
| BEN           | 185                          | 168                          | x   | x   | <b>168</b>                           |
| 1-NAL         | 144                          | 117                          | 126 | 127 | <b>117</b>                           |
| 2-NAL         | 144                          | 117                          | 127 | 128 | <b>117</b>                           |
| 3-AMB         | 170                          | 143                          | 153 | 155 | <b>153</b>                           |
| 4-AMB         | 170                          | 143                          | 153 | 155 | <b>153</b>                           |
| 2-TOL-d7      | 115                          | 97                           | x   | x   | <b>97</b>                            |
| 2-NAL-d7      | 151                          | 123                          | 132 | x   | <b>123</b>                           |
| 4-AMB-d9      | 179                          | 151                          | 160 | x   | <b>160</b>                           |

## 4.2 Infuze do proudu mobilní fáze

Pro vytvoření první metody hmotnostní detekce bylo potřeba provést optimalizaci iontové optiky a zjistit kolizní energii u každého standardu. Hodnoty napětí na S- a F-čočkách a kolizní energie byly zjištěny infuzí roztoků standardů o koncentraci 100 mg/l do proudu mobilní fáze. Složení mobilní fáze bylo zvoleno dle publikací, které jsou uvedeny v kapitole 2.3. Jako MFA byla použita milli-Q voda, 5 obj. % methanolu a 0,1 obj. % kyseliny mravenčí a jako MFB methanol a 0,1 obj. % kyseliny mravenčí [32, 37]. Poměr mobilních fází byl 1:1, průtok 0,4 ml/min. Získané parametry byly následně využity v MS metodě použité v průběhu optimalizace složení mobilní fáze.

## 4.3 Optimalizace složení mobilní fáze

Během optimalizace metody bylo použito celkem pět různých mobilních fází, k analýze byl použit směsný roztok standardů o koncentraci 100 mg/l. Při výběru mobilní fáze byl sledován kapacitní poměr, intenzita signálu a symetrie píku pro jednotlivé analyty, kvalita separace, symetrie píku a délka analýzy u každého složení mobilní fáze. Průtok byl nastaven na 0,6 ml/min při nástřiku roztoků standardů 5  $\mu$ l.

Pět různých složení mobilních fází můžeme vidět v Tab. 4. Složení prvních dvou mobilních fází nebylo vhodné, separace izomerů byla nedokonalá, symetrie píků hodnocena

na základě faktoru asymetrie nebyla přijatelná, píky frontovaly a chvostovaly. Při změně organické mobilní fáze z methanolu na acetonitril nebyl pozorován výrazný vliv na hodnocené faktory chromatografie. Zlepšení parametrů separace bylo dosaženo přidáním octanu amonného do mobilní fáze [38]. Podle publikací mravenčan nebo octan amonný v mobilní fázi snižuje intenzitu signálu [33–35, 37], v této bakalářské práci ale přidání octanu amonného pomohlo separaci izomerů. Obsah octanu amonného v mobilní fázi byl optimalizován v rozmezí 2,5–7,5 mM (mobilní fáze 3-5, Tab. 4). Na základě průběhu separace, plochy a intenzity píků, poměru intenzity signálu a šumu a symetrie píků byla vybrána jako optimální koncentrace 2,5 mM, tedy MFA<sub>4</sub> a MFB<sub>4</sub>. Kapacitní poměr pro analyt s nejnižší retencí, tedy pro 2-toluidin, vyšel 2. Vyšší koncentrace octanu amonného (7,5 mM, MFA<sub>5</sub> a MFB<sub>5</sub>) vedla ke koeluci izomerních sloučenin (3- a 4-aminobifenylů). Pokud byl do mobilní fáze přidán octan amonný o koncentraci 5 mM (MFA<sub>3</sub> a MFB<sub>3</sub>), separace izomerů byla přijatelná a kapacitní poměr pro toluidin měl hodnotu 2,4. Vzhledem k intenzitě signálu, která byla lepší u koncentrace 2,5 mM, byla zvolena nižší koncentrace octanu amonného. Negativní vliv vyšší koncentrace octanu amonného na intenzitu signálu je v souladu s literaturou [37]. Byl rovněž optimalizován gradient. Při skokovém gradientu byl poměr mobilních fází skokově změněn ve třetí minutě z 0 % na 50 % MFB. Lineární gradient rostl od začátku analýzy až do šestnácté minuty postupně z 0 % na 100 % MFB. Každá metoda končila proplachem kolony 100% MFB (3 min) a stabilizací složení MF před další analýzou. Byl zvolen gradient skokový, při použití lineárního gradientu nebylo dosaženo optimální separace izomerů (3- a 4-aminobifenylů). Na základě gradientu se poté následná optimalizace dělala do poměru MFA<sub>4</sub> a MFB<sub>4</sub> 1:1.

## 4.4 Optimalizace hmotnostní detekce

Po optimalizaci složení a gradientu mobilní fáze byla provedena optimalizace hmotnostní detekce s vybranou mobilní fází (MFA<sub>4</sub> – 4 obj. % acetonitrilu, 0,1 obj. % kyseliny mravenčí, 2,5mM octan amonný, milli-Q voda, MFB<sub>4</sub> – 50 obj. % acetonitrilu, 0,1 obj. % kyseliny mravenčí, 2,5mM octan amonný a milli-Q voda). Průtok byl nastaven na 0,6 ml/min a poměr MFA a MFB byl na základě gradientu zvolen 1:1. Pro optimalizaci parametrů hmotnostní detekce byl použit směsný roztok standardů o koncentraci 50 mg/l a roztoky vnitřních standardů o koncentraci 100 mg/l.

#### 4.4.1 Optimalizace podmínek elektrospreje

Optimalizace podmínek elektrospreje byla provedena infuzí kritického analytu, případě této práce se jednalo o 2-toluidin, který měl nejnižší intenzitu signálu, resp. poměr signálu a šumu. Byla optimalizována teplota na HESI kapiláře v rozsahu 300–400 °C, napětí na kapiláře v rozsahu 2–4 kV, průtok hlavního zmlžujícího plynu v rozsahu 50–70 arb a vedlejšího zmlžujícího plynu v rozsahu 15–25 arb. Hodnotící kritérium při výběru jednotlivých parametrů byla stabilita signálu a intenzita odezvy hmotnostního detektoru. Pořadí a rozsah optimalizace jednotlivých parametrů jsou uvedeny v Tab. 9 v posledním sloupci. Teplota transferové trubice byla zvolena na 350 °C.

Jako optimální teplota na HESI kapiláře byla vybrána hodnota 350 °C. Při teplotě 300 °C byla intenzita signálu nižší, při teplotě 400 °C byla nižší stabilita signálu. Při teplotě na HESI kapiláře 350 °C bylo následně optimalizováno vložené napětí, jako optimální z hlediska stability a intenzity odezvy byla vybrána hodnota 3,5 V. Následně byl obdobným způsobem optimalizován i průtok plynu. Pro vytvoření výsledné analytické metody byly zvoleny hodnoty průtoků 50, resp. 20 arb. pro hlavní, resp. vedlejší zmlžující plyn.

Tab. 9: Výsledky optimalizace podmínek elektrospreje

| Optimalizované parametry            | Optimalizované hodnoty         |         |         | Vybrané hodnoty |
|-------------------------------------|--------------------------------|---------|---------|-----------------|
| Teplota na HESI kapiláře            | 300 °C                         | 350 °C  | 400 °C  | <b>350 °C</b>   |
| Napětí na kapiláře                  | 2-4 kV (zjišťování po 0,25 kV) |         |         | <b>3,5 kV</b>   |
| Průtok hlavního zmlžujícího plynu   | 50 arb.                        | 60 arb. | 70 arb. | <b>50 arb.</b>  |
| Průtok vedlejšího zmlžujícího plynu | 15 arb.                        | 20 arb. | 25 arb. | <b>20 arb.</b>  |

#### 4.4.2 Optimalizace iontové optiky a kolizní energie

Optimalizace iontové optiky zahrnovala optimalizaci plochých prstencových elektrod, tedy S- a F-čoček (S- a F-lens). Tato optimalizace byla prováděna pro všechny analyty, pro vytvoření výsledné MS metody byly použity pro S- a F-lens hodnoty získané pro kritický analyt, 2-toluidin. Optimalizace kolizní energie byla provedena tak, aby byla pro každý analyt zajištěna optimální míra fragmentace molekulového iontu na vybraný produktový iont. U každého analytu byla vybrána taková hodnota kolizní energie, u které byla největší odezva detektoru. Pro každý analyt bylo měření napětí S-lens a F-lens, a hodnoty kolizní energie

provedeno třikrát a poté byla určena výsledná hodnota na základě aritmetického průměru tří naměřených hodnot. Výsledky této optimalizace můžeme vidět v Tab. 10. Míra fragmentace molekulových iontů jednotlivých analytů byla následně v průběhu využívání analytické metody pravidelně kontrolována. Pokud bylo zaznamenáno snížení účinnosti fragmentace iontu molekulového na produktové ionty, byla hodnota normalizované kolizní energie znovu optimalizována.

Tab. 10: Výsledky optimalizace iontové optiky a kolizní energie

| <b>Produktový iont<br/>(analyt)</b> | <b>S-lens<br/>[V]</b> | <b>Průměr<br/>[V]</b> | <b>F-lens<br/>[V]</b> | <b>Průměr<br/>[V]</b> | <b>Kolizní<br/>energie<br/>[%]</b> | <b>Průměr<br/>[%]</b> |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------|
| 93 (2-TOL)                          | 68                    | <b>68</b>             | -8                    | <b>-8</b>             | 25                                 | <b>30</b>             |
|                                     | 68                    |                       | -8                    |                       | 35                                 |                       |
|                                     | 69                    |                       | -8                    |                       | 31                                 |                       |
| 168 (BEN)                           | 69                    | <b>67</b>             | -8                    | <b>-8</b>             | 32                                 | <b>32</b>             |
|                                     | 67                    |                       | -8                    |                       | 34                                 |                       |
|                                     | 66                    |                       | -8                    |                       | 31                                 |                       |
| 117 (1-NAL, 2-NAL)                  | 67                    | <b>68</b>             | -8                    | <b>-8</b>             | 28                                 | <b>29</b>             |
|                                     | 69                    |                       | -8                    |                       | 29                                 |                       |
|                                     | 69                    |                       | -8                    |                       | 29                                 |                       |
| 153 (3-AMB, 4-AMB)                  | 69                    | <b>67</b>             | -8,5                  | <b>-8,5</b>           | 30                                 | <b>31</b>             |
|                                     | 67                    |                       | -8,5                  |                       | 32                                 |                       |
|                                     | 65                    |                       | -8,5                  |                       | 31                                 |                       |
| 97 (2-TOL-d7)                       | 67                    | <b>68</b>             | -8                    | <b>-8</b>             | 32                                 | <b>26</b>             |
|                                     | 69                    |                       | -8                    |                       | 23                                 |                       |
|                                     | 69                    |                       | -8                    |                       | 23                                 |                       |
| 123 (2-NAL-d7)                      | 69                    | <b>67</b>             | -8                    | <b>-8</b>             | 24                                 | <b>25</b>             |
|                                     | 63                    |                       | -8                    |                       | 27                                 |                       |
|                                     | 69                    |                       | -8                    |                       | 25                                 |                       |
| 160 (4-AMB-d9)                      | 69                    | <b>67</b>             | -7,5                  | <b>-7,5</b>           | 29                                 | <b>29</b>             |
|                                     | 62                    |                       | -7,5                  |                       | 30                                 |                       |
|                                     | 69                    |                       | -7,5                  |                       | 29                                 |                       |

#### 4.4.3 Optimalizace objemu a koncentrace nástřiku a doby plnění pasti

Před validací výsledné metody byl ještě optimalizován objem nástřiku, koncentrace směsného roztoku standardů a doba plnění pasti neboli maximální doba, kdy je past otevřená a plní se ionty. Nejprve byl optimalizován objem nástřiku v rozsahu 5–25  $\mu\text{l}$  při koncentraci směsného roztoku standardů 50 mg/l. V průběhu předchozí části práce objem nástřiku činil 5  $\mu\text{l}$ . Při nástřiku 10–25  $\mu\text{l}$  píky analytů 2-toluidinu, 3-aminobifenyly a 4-aminobifenyly chvostovaly. Faktor asymetrie byl vyšší než doporučená maximální hodnota 2 [28]. Nástřik 25  $\mu\text{l}$  byl ověřován při nižší koncentraci směsného roztoku standardů (5 mg/l). Při této koncentraci analytů už nedocházelo k výraznému chvostování píků. Pouze pro pík 2-toluidinu byl faktor asymetrie  $> 2$ . Vzhledem k požadavku na zavedení metody s co nejnižší hodnotou meze stanovitelnosti byl zvolen objem nástřiku 25  $\mu\text{l}$ .

Dále byla optimalizována doba plnění pasti, která do této doby činila 100 ms. Bylo vybíráno mezi hodnotami 100, 250 a 500 ms na základě počtu bodů na pík, výsledky můžeme vidět v Tab. 11. Optimální počet bodů na pík je 15–25, pokud je počet velký, je vhodné zvýšit dobu plnění pasti, což může následně vést ke snížení meze detekce. Doba plnění pasti byla optimalizována pro nástřik 25  $\mu\text{l}$  a koncentraci směsného roztoku standardů 0,05 mg/l. Pro výslednou analytickou metodu byla vybrána hodnota 500 ms, počet bodů na pík se pohyboval v rozmezí 12–32. V případě benmidinu byl počet bodů na pík pouze 12, ale jak vyplývá z naměřených hodnot, nebylo možné tento parametr ovlivnit dobou plnění pasti. Při době plnění pasti 500 ms byl poměr S/N pro všechny analyty vyšší než v případě kratší doby plnění pasti, tj. 100 ms, resp. 250 ms.

Tab. 11: Počty bodů na pík pro jednotlivé analyty

| Analyt |                   | Doba plnění pasti |        |            |
|--------|-------------------|-------------------|--------|------------|
|        |                   | 100 ms            | 250 ms | 500 ms     |
| 2-TOL  | Počet bodů na pík | 30                | 24     | <b>20</b>  |
|        | S/N               | 8                 | 11     | <b>15</b>  |
| BEN    | Počet bodů na pík | 12                | 12     | <b>12</b>  |
|        | S/N               | 186               | 169    | <b>213</b> |
| 1-NAL  | Počet bodů na pík | 34                | 30     | <b>28</b>  |
|        | S/N               | 4                 | 6      | <b>11</b>  |
| 2-NAL  | Počet bodů na pík | 24                | 22     | <b>22</b>  |
|        | S/N               | 7                 | 10     | <b>14</b>  |
| 3-AMB  | Počet bodů na pík | 35                | 35     | <b>32</b>  |
|        | S/N               | 7                 | 7      | <b>12</b>  |
| 4-AMB  | Počet bodů na pík | 35                | 35     | <b>30</b>  |
|        | S/N               | 5                 | 5      | <b>10</b>  |

Před validací metody bylo potřeba najít optimální nejnižší koncentraci standardů, od které byly následně připraveny kalibrační roztoky. Koncentrace byla vybírána na základě intenzity signálu, resp. poměru signálu a šumu. Bylo rozhodováno mezi hodnotami 50, 5, 0,5, 0,05, 0,005 mg/l při již vybraném objemu nástřiku 25  $\mu$ l. Na základě výsledků těchto analýz byl koncentrační rozsah analytů 2-toluidin, 1- a 2-naftylamin, 3- a 4- aminobifenyl pro validaci metody zvolen 0,025–9 mg/l, pro benzidin 0,0025–0,9 mg/l.

## 4.5 Výsledná analytická metoda

Po přímé infuzi, infuzi do proudu mobilní fáze, optimalizaci složení mobilní fáze a optimalizaci hmotnostní detekce byla vytvořena výsledná analytická metoda. Veškeré parametry jsou shrnuty v této kapitole.

### **Optimalizované podmínky chromatografické separace:**

- Kolona: Kinetex (150 x 3 mm, 2,6 µm Biphenyl)
- Teplota v kolonovém prostoru: 25 °C
- Objem nástřiku: 25 µl
- Průtok mobilní fáze: 0,6 ml/min
- Celková doba analýzy: 21 minut

### **Výsledné složení mobilní fáze:**

- MFA: 4 obj. % acetonitrilu, 0,1 obj. % kyseliny mravenčí, 2,5mM octan amonný a milli-Q voda
- MFB: 50 obj. % acetonitrilu, 0,1 obj. % kyseliny mravenčí, 2,5mM octan amonný a milli-Q voda
- Skokový gradient: 0–2 min: 100 % MFA, 2–3 min: 100–50 % MFA, 3–10 min: 50 % MFA, 10–11 min: 50–0 % MFA, 11–14 min: 0 % MFA, 14–15 min: 0–100 % MFA, 15–21 min: 100 % MFA

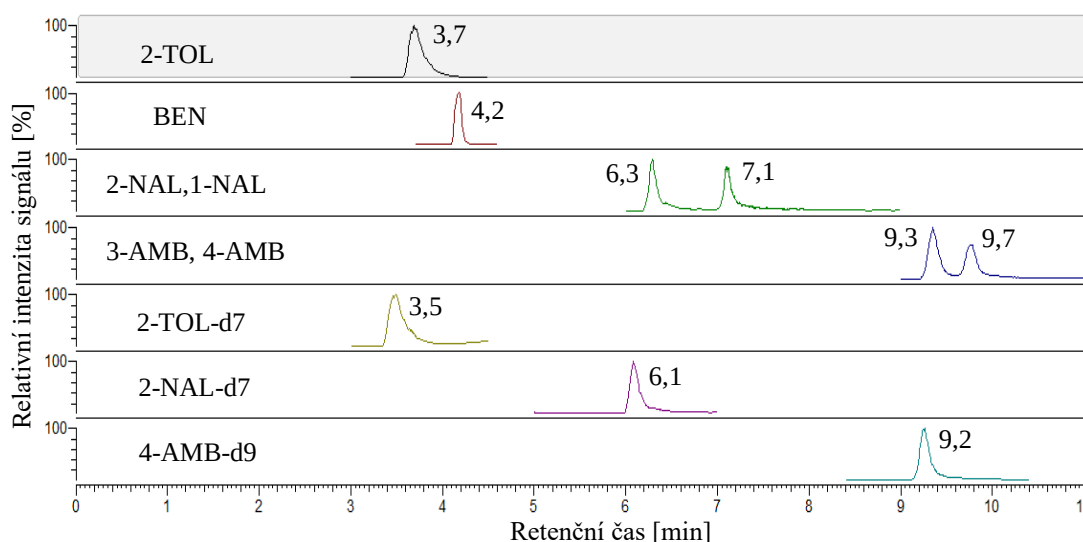
### **Optimalizace hmotnostní detekce:**

- Teplota na kapiláře: 350 °C
- Teplota transferové trubice: 350 °C
- Napětí na kapiláře: 3,5 kV
- Průtok hlavního zmlžujícího plynu: 50 arb.
- Průtok vedlejšího zmlžujícího plynu: 20 arb.
- S-lens: 68 V
- F-lens: -8 V
- Normalizovaná kolizní energie: 30 %
- Doba plnění pasti: 500 ms



### Produktové ionty pro kvantifikaci [m/z]:

- 2-TOL: 93
- 1-NAL, 2-NAL: 117
- BEN: 168
- 3-AMB, 4-AMB: 153
- 2-TOL-d7: 97
- 2-NAL-d7: 123
- 4-AMB-d9: 160



Obr. 2: Výsledný chromatogram s uvedenými retenčními časy (nástřík 25  $\mu$ l, koncentrace směsného roztoku ST 2,5 mg/l (BEN 0,025 mg/l), koncentrace směsného roztoku VS 5 mg/l (2-NAL-d7 30 mg/l))

## 4.6 Validace analytické metody

Poté co byla dokončena optimalizace metody, mohla být provedena validace analytické metody. Validace byla provedena, aby byl určen koncentrační rozsah metody a také proto, aby mohla být prokázána vhodnost analytické metody pro stanovení vybraných aromatických aminů pomocí LC/MS. Během validace byla zjišťována mez detekce, mez stanovitelnosti, rozsah metody, linearita, správnost a přesnost.

Nejprve byla analyzována řada kalibračních roztoků ve čtyřech nezávislých opakováních v rozsahu 0,025–9 mg/l, resp. 0,0025–0,9 mg/l (benzidin). Byl zjištěn koncentrační rozsah jednotlivých analytů a vybrán vhodný vnitřní standard ke každému analytu. Také byla zjištěna mez detekce a mez stanovitelnosti metody. Tyto parametry byly zjištěny na základě poměru signálu k šumu (S/N). Správnost a přesnost

metody byly určeny jednak na základě analýzy kalibračních roztoků a na základě analýz extraktů s obohacovacím roztokem. Podklady k validaci metody jsou uvedeny v Příloze A–K.

#### **4.6.1 Rozsah metody**

Rozsah metody byl zjištěn na základě výsledků analýzy série kalibračních roztoků ve čtyřech nezávislých opakováních. Pro všechny analyty byla u každého kalibračního roztoku vypočtena difference, což je rozdíl mezi teoretickou a naměřenou hodnotou vyjádřený v procentech. Na základě takto vypočtených diferencí byl u každého analytu určen koncentrační rozsah, který můžeme vidět v Tab. 12. Pro hodnocení byla použita pravidla FDA, podle kterých maximální hodnoty difference teoretické a naměřené hodnoty koncentrace kalibračního roztoku pro nejnižší kalibrační bod musí být do 20 % a pro ostatní kalibrační body do 15 % [26]. Protože obsah analytů v extraktech pravděpodobně nebude vysoký, byl při výběru koncentračního rozsahu pro jednotlivé analyty kladen větší důraz na dosažení co nejnižší meze stanovitelnosti, nikoli na co nejširší koncentrační rozsah. Podle vyhodnoceného rozsahu metody byl pro každý analyt proveden i výběr optimálního vnitřního standardu.

Koncentrace jednotlivých analytů, které lze stanovovat pomocí metody zavedené v této bakalářské práci, jsou o jeden až tři řády vyšší než v dosud publikovaných metodách [24, 32–37]. Tento výsledek lze vysvětlit tím, že v této bakalářské práci byla použita lineární iontová past. Ve zmíněných publikacích byl jako hmotnostní analyzátor použit trojitý kvadrupól.

Tab. 12: Koncentrační rozsahy jednotlivých analytů

| Analyt | Vnitřní standard | Koncentrační rozsah [mg/l] |
|--------|------------------|----------------------------|
| 2-TOL  | 2-TOL-d7         | 0,05–2,5                   |
| BEN    | 2-TOL-d7         | <b>0,005–0,5</b>           |
|        | 2-NAL-d7         | 0,025–0,7                  |
| 1-NAL  | 2-TOL-d7         | 0,1–5                      |
|        | 2-NAL-d7         | 0,25–7                     |
|        | 4-AMB-d9         | <b>0,1–9</b>               |
| 2-NAL  | 2-TOL-d7         | 0,25–9                     |
|        | 2-NAL-d7         | 0,25–7                     |
|        | 4-AMB-d9         | <b>0,1–5</b>               |
| 3-AMB  | 4-AMB-d9         | 0,1–7                      |
| 4-AMB  | 4-AMB-d9         | 0,05–2,5                   |

Podmínky difference byly zcela splněny pro 2-toluidin. U ostatních analytů byly difference u některých kalibračních bodů pro jedno ze čtyř opakování vyšší, jak můžeme vidět v Příloze B–K. Pro benzidin byla difference vyšší u obou vnitřních standardů v jednom z opakování u dvou kalibračních bodů. Pro 1-naftylamin byla difference vyšší v jednom z opakování u dvou kalibračních bodů, pokud byl 4-aminobifenyl-d9 použit jako vnitřní standard. Pro 2-naftylamin byla difference vyšší v jednom z opakování u jednoho kalibračního bodu, pokud byl použit jako vnitřní standard 2-toluidin-d7 a u dvou kalibračních bodů, pokud byl jako vnitřní standard použit 2-naftylamin-d7. Difference byla také vyšší v jednom z opakování u jednoho kalibračního bodu pro 3-aminobifenyl a v jednom z opakování u dvou kalibračních bodů pro 4-aminobifenyl. Pro 2-toluidin byl rozsah metody stanoven v rozmezí 0,05–2,5 mg/l, pro benzidin byl jako vnitřní standard vybrán 2-toluidin-d7 a koncentrační rozsah stanoven v rozmezí 0,005–0,5 mg/l. U ostatních analytů kritéria přijatelnosti vyšla lépe s použitím 4-aminobifenyly-d9 jako vnitřního standardu. Pro 2-naftylamin byl stanoven rozsah metody 0,1–5 mg/l, 0,1–9 mg/l pro 1-naftylamin, pro 3-aminobifenyl 0,1–7 mg/l a pro 4-aminobifenyl 0,05–2,5 mg/l. Předpokládalo se, že 2-naftylamin-d7 bude vhodným vnitřním standardem pro 1-naftylamin a 2-naftylamin. V průběhu všech měření byla však pro tento vnitřní standard poměrně slabá odezva detektoru a malá intenzita signálu. V kalibraci měl tento vnitřní standard 6x vyšší koncentraci než ostatní vnitřní standardy. Parametry

odezvy detektoru pro 2-naftylamin-d7 se nezlepšily ani s vyšší mírou fragmentace zvýšením normalizované kolizní energie.

Linearita byla hodnocena rovněž na základě hodnoty koeficientu determinace. Koeficient determinace by měl být  $\geq 0,9800$  [40]. Hodnoty koeficientu determinace pro jednotlivé analyty v koncentračních rozsazích vybraných na základě diferencí (Tab. 12) vycházely v rozsahu 0,9805–0,9951. Nejnížší hodnota 0,9805 byla získána pro BEN, jako vnitřní standard byl použit 2-NAL-d7 a nejvyšší 0,9951 pro 3-AMB s použitím 4-AMB-d9 jako vnitřního standardu. Hodnoty jsou uvedeny v Příloze L. Pro všechny analyty bylo splněno kritérium přijatelnosti.

#### 4.6.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Vyhodnocením poměru signálu a šumu (S/N) byla zjištěna instrumentální mez detekce a mez stanovitelnosti. Mez detekce (LOD) je stanovena jako koncentrace, pro kterou je analytický signál odlišný od šumu. Mez stanovitelnosti (LOQ) může být popsána jako koncentrace, kdy nám správnost a přesnost stanovení dovolí kvantitativně vyhodnocovat [30]. Hodnoty S/N, které byly použity pro výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti jsou uvedeny v příloze A. Mez detekce byla určena v rozsahu 0,000075–0,017 mg/l a mez stanovitelnosti v rozsahu 0,00025–0,056 mg/l. Jednotlivé hodnoty můžeme vidět v Tab. 13.

Tab. 13: Hodnoty mezí detekce a mezí stanovitelnosti pro jednotlivé analyty

| Analyt | Mez detekce<br>[mg/l] | Mez stanovitelnosti<br>[mg/l] |
|--------|-----------------------|-------------------------------|
| 2-TOL  | 0,0063                | 0,021                         |
| BEN    | 0,000075              | 0,00025                       |
| 1-NAL  | 0,017                 | 0,056                         |
| 2-NAL  | 0,013                 | 0,042                         |
| 3-AMB  | 0,0063                | 0,021                         |
| 4-AMB  | 0,0083                | 0,028                         |

### 4.6.3 Správnost a přesnost

Pro výpočet správnosti a přesnosti metody bylo připraveno devět extrakčních roztoků podle postupu v kapitole 3.5. Jednalo se o roztoky, jimiž v průběhu extrakce nebyl extrahován nedopalek, celý proces extrakce byl proveden pouze s obohacovacím roztokem standardů a s vnitřními standardy. Správnost a přesnost byla pro validaci analytické metody také spočítána na základě výsledků analýz roztoků kalibrační křivky, a to vždy pro nejnižší a nejvyšší kalibrační bod koncentračního rozsahu daného analytu na daný vnitřní standard. Pro posouzení míry správnosti a přesnosti vlastní analytické metody a analytické metody se zahrnutím extrakčního procesu byla použita kritéria dle AOAC [40], která jsou uvedena v Tab. 14. Správnost a přesnost vypočtené z kalibrační křivky můžeme vidět v Tab. 15 a z připravených extrakčních roztoků v Tab. 16.

Správnost a přesnost určená na základě analýzy kalibračních roztoků vychází jak pro nejnižší, tak pro nejvyšší kalibrační body v rámci požadovaných kritérií pro všechny analyty. Pouze v případě 2-naftylaminu vychází u nejnižšího kalibračního bodu hodnota správnosti 111 % místo požadovaných 110 % v případě vnitřních standardů 2-naftylaminu-d7 a 4-aminobifenyly-d9.

Extrakční roztoky byly analyzovány dvěma metodami, které se lišily v aplikované kolizní energii. Jednak s původní optimalizovanou kolizní energií a také se standardní hodnotou relativní kolizní energie 35 % pro všechny analyty. Byly použity dvě kolizní energie, jelikož i po optimalizaci se měnila s optimální kolizní energií míra fragmentace. Správnost a přesnost pro 2-toluidin a 2-naftylamin byly vypočteny na základě měření s kolizní energií 35 %, jelikož v původní metodě docházelo k nedostatečné fragmentaci molekulového iontu. Koncentrační úroveň analytů v analyzovaných extraktech byla pro benzidin  $10^{-7}$  a pro ostatní analyty  $10^{-6}$ . Na základě výsledků uvedených v Tab. 16 lze konstatovat, že byla splněna kritéria přijatelnosti pro 2-naftylamin, 3-aminobifenyl a 4-aminobifenyl, a to jak pro správnost tak pro přesnost. Pro benzidin nevyšla správnost při použití 2-TOL-d7 jako vnitřního standardu, stejně jako pro 2-toluidin. Výsledky analýz nedosáhly požadované přesnosti pro 1-naftylamin. Pokud byla správnost a přesnost vypočtena z kalibrační křivky, vycházely hodnoty lépe. Získaná data naznačují, že vlastní analýza roztoků standardů splňuje validační kritéria. Proces extrakce pro výše zmíněné analyty nesplňoval zcela validační kritéria. Celkově lze konstatovat, že metoda je využitelná pro účely této práce.

Tab. 14: Kritéria přijatelnosti dle AOAC

| Koncentrační úroveň<br>[1] | Správnost<br>[%] | Přesnost<br>[%] |
|----------------------------|------------------|-----------------|
| $10^{-6}$                  | 80–110           | 11              |
| $10^{-7}$                  | 80–110           | 15              |
| $10^{-8}$                  | 60–115           | 21              |
| $10^{-9}$                  | 40–120           | 30              |

Tab. 15: Správnost a přesnost spočítána z kalibrační křivky

| Analyt | Vnitřní standard | Koncentrační úroveň | Správnost [%] | Přesnost [%] |
|--------|------------------|---------------------|---------------|--------------|
| 2-TOL  | 2-TOL-d7         | $10^{-8}$           | 107           | 6,3          |
|        |                  | $10^{-6}$           | 99            | 9,6          |
| BEN    | 2-TOL-d7         | $10^{-9}$           | 93            | 8,2          |
|        |                  | $10^{-7}$           | 98            | 11,2         |
|        | 2-NAL-d7         | $10^{-8}$           | 94            | 8,7          |
|        |                  | $10^{-7}$           | 98            | 11,5         |
| 1-NAL  | 2-TOL-d7         | $10^{-7}$           | 109           | 5,8          |
|        |                  | $10^{-6}$           | 100           | 4,7          |
|        | 2-NAL-d7         | $10^{-7}$           | 108           | 6,7          |
|        |                  | $10^{-6}$           | 97            | 5,3          |
|        | 4-AMB-d9         | $10^{-7}$           | 89            | 7,2          |
|        |                  | $10^{-6}$           | 102           | 8,9          |
| 2-NAL  | 2-TOL-d7         | $10^{-7}$           | 84            | 5,7          |
|        |                  | $10^{-6}$           | 101           | 6,9          |
|        | 2-NAL-d7         | $10^{-7}$           | <b>111</b>    | 6,3          |
|        |                  | $10^{-6}$           | 98            | 4,7          |
|        | 4-AMB-d9         | $10^{-7}$           | <b>111</b>    | 8,4          |
|        |                  | $10^{-6}$           | 100           | 7,7          |
| 3-AMB  | 4-AMB-d9         | $10^{-7}$           | 83            | 7,1          |
|        |                  | $10^{-6}$           | 98            | 3,7          |
| 4-AMB  | 4-AMB-d9         | $10^{-8}$           | 113           | 6,1          |
|        |                  | $10^{-6}$           | 99            | 6,3          |

Tab. 16: Správnost a přesnost jednotlivých analytů

| <b>Analyt</b> | <b>Vnitřní standard</b> | <b>Správnost [%]</b> | <b>Přesnost [%]</b> |
|---------------|-------------------------|----------------------|---------------------|
| 2-TOL         | 2-TOL-d7                | <b>113</b>           | 6,5                 |
| BEN           | 2-TOL-d7                | <b>124</b>           | 8,2                 |
|               | 2-NAL-d7                | 110                  | 12                  |
| 1-NAL         | 2-TOL-d7                | 84                   | <b>16</b>           |
|               | 2-NAL-d7                | 83                   | <b>19</b>           |
|               | 4-AMB-d9                | 79                   | <b>16</b>           |
| 2-NAL         | 2-TOL-d7                | 103                  | 7,4                 |
|               | 2-NAL-d7                | 105                  | 11                  |
|               | 4-AMB-d9                | 110                  | 7,7                 |
| 3-AMB         | 4-AMB-d9                | 104                  | 6,7                 |
| 4-AMB         | 4-AMB-d9                | 101                  | 8,3                 |

## 4.7 Stanovení obsahu aromatických aminů v cigaretových nedopalcích

Stanovení aromatických aminů v cigaretových nedopalcích bylo provedeno na základě postupu, který je sepsán v kapitole 3.5. Extrakcí látek z nedopalků do MTBE a následnou úpravou extraktu byly získány tři různé vzorky k analýze. V žádném z extraktů nebyly detekovány stanovované analyty ani vnitřní standardy. Následně byly tyto vzorky obohaceny roztokem standardů, ale opět nebyl detekován ani jeden z analytů. Z výsledků analýz extrakcí prováděných s obohacovacím roztokem bez nedopalku (kapitola 4.6) je zřejmé, že nedochází k významnějším ztrátám analytů v průběhu procesu extrakce. Lze tedy usuzovat, že matrice cigaret následně rušila analýzu, proto nebyly analyty detekovány.

Do budoucna je tedy nutné optimalizovat, resp. změnit postup extrakce, který byl proveden dle publikovaného postupu a problém s matricí zde nebyl zmiňován [32]. Je nezbytné vzít v úvahu, že v citované publikaci byla prováděna extrakce aromatických aminů z prachu, ne z nedopalků cigaret. Nabízí se možnost provést extrakci z nedopalků do většího objemu okyselené vody a následně po neutralizaci extrahovat aminy z vody do organického rozpouštědla [2, 34, 39]. K přečištění extraktů je možné použít SPE sorbenty za účelem odstranění mastných látek z extraktu [2].

## 5 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývala vývojem metody pro stanovení vybraných aromatických aminů (2-toluidin, 1-naftylamin, 2-naftylamin, 3-aminobifenyl, 4-aminobifenyl a benzidin) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Jako vnitřní standardy byly použity 2-toluidin-d7, 2-naftylamin-d7 a 4-aminobifenyl-d9.

V teoretické části byly uvedeny zdroje a toxikologické účinky aromatických aminů. Dále byla pozornost věnována principu vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí a průběhu optimalizace chromatografické separace a hmotnostní detekce. Byly zde uvedeny parametry, které je potřeba optimalizovat, aby bylo dosaženo co nejlepšího rozlišení jednotlivých analytů a stabilního a intenzivního signálu detektoru. Na závěr teoretické části byl kladen velký důraz na literární rešerši podmínek analýzy aromatických aminů použitých v dosud publikovaných LC/MS metodách. Byl zjišťován zejména typ stacionární fáze, složení mobilní fáze a mez detekce. Také byly řešeny možnosti extrakce aromatických aminů z reálných vzorků.

Experimentální část se nejprve zabývala optimalizací podmínek chromatografické separace a hmotnostní detekce. Povedlo se nalézt vhodné analytické podmínky pro všechny stanovované látky. Chromatografická separace byla provedena na koloně Kinetex Biphenyl. Byla zvolena vhodná mobilní fáze, která se skládala z 0,1 obj. % kyseliny mravenčí, 4 obj. % acetonitrilu a 2,5mM octanu amonného ve vodě a 0,1 obj. % kyseliny mravenčí, 50 obj. % acetonitrilu a 2,5mM octanu amonného ve vodě. Pro všechny analyty byl určen lineární koncentrační rozsah a vybrán vnitřní standard. Rozsah metody byl určen pro 2-toluidin v rozmezí 0,05–2,5 mg/l, pro benzidin byl jako vnitřní standard vybrán 2-toluidin-d7 a koncentrační rozsah byl stanoven v rozmezí 0,005–0,5 mg/l. U ostatních analytů byl jako vnitřního standard na základě výsledků zvolen 4-aminobifenyl-d9. Pro 2-naftylamin byl stanoven rozsah metody v rozmezí 0,1–5 mg/l, 0,1–9 mg/l pro 1-naftylamin, 0,1–7 mg/l pro 3-aminobifenyl a v rozmezí 0,05–2,5 mg/l pro 4-aminobifenyl. Analytická metoda byla použita k popisu procesu extrakce aromatických aminů z čerstvých cigaretových nedopalků značky Marlboro.

V této práci byla úspěšně zavedena analytická metoda, bohužel se ale nepodařilo stanovit vybrané aromatické aminy v cigaretových nedopalcích. Na základě výsledků lze usuzovat, že matrice cigaret rušila analýzu, proto nebyly analyty detekovány. Je ale nezbytné vzít v úvahu, že převzatý postup extrakce byl dříve použit na extrakci aromatických aminů z prachu, a ne z nedopalků cigaret.



V budoucnu by bylo vhodné vyzkoušet jiné možnosti postupu extrakce aromatických aminů, kde nebude problém s matricí jako v této bakalářské práci. Jako možnost se nabízí provést extrakci z nedopalků do většího objemu okyselené vody, následně po neutralizaci extrahovat aminy z vody do organického rozpouštědla. K přečištění extraktů by bylo možné použít SPE sorbenty za účelem odstranění mastných látek z extraktu.

## 6 Seznam použitých zdrojů

- [1] A. Rodgman, T. Perfetti, „The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke", *CRC Press, Florida.*, 2013.
- [2] H. Deng, F. Yang, Z. Li, Z. Bian, Z. Fan, Y. Wang, S. Liu, G. Tang „Rapid determination of 9 aromatic amines in mainstream cigarette smoke by modified dispersive liquid liquid microextraction and ultraperformance convergence chromatography tandem mass spectrometry", *J Chromatogr A*, 2017.
- [3] F. Soleimani, S. Dobaradaran, G. E. De-la-Torre, T. C. Schmidt, R. Saeedi, „Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: A comprehensive systematic review", *Science of The Total Environment*, 2022.
- [4] T. E. Novotny, E. Slaughter, „Tobacco product waste: an environmental approach to reduce tobacco consumption", *Curr. Environ. Health Rep.*, 2014.
- [5] Y. Masuda, D. Hoffmann, „Quantitative determination of 1-naphthylamine and 2-naphthylamine in cigarette smoke", *Anal. Chem.*, 1969.
- [6] G. Pieraccini, F. Luceri, G. Moneti, „New gas-chromatographic/mass spectrometric method for the quantitative analysis of primary aromatic amines in main- and side-stream cigarette smoke", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1992.
- [7] S. Saha, R. Mistri, B. C. Ray, „Rapid and sensitive method for simultaneous determination of six carcinogenic aromatic amines in mainstream cigarette smoke by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry", *J Chromatogr A*, 2009.
- [8] C. J. Smith, G. L. Dooly, S. C. Moldoveanu, „New technique using solid-phase extraction for the analysis of aromatic amines in mainstream cigarette smoke", *J Chromatogr A*, 2003.
- [9] P. W. G. Smith, A. R. Tatchella, „Aromatic amines", *Aromatic Chemistry*, 1969.
- [10] R. H. Kruger, C. Boissiere, K. Klein-Hartwig, H. J. Kretzschmar, „New phenylenediamine antiozonants for commodities based on natural and synthetic rubber", *Food Addit. Contam.*, 2005.
- [11] T. P. Gnanarajan, A. S. Nasar, N. P. Lyer, G. Radhakrishnan, „Synthesis of poly(urethane-imide) using aromatic secondary amine-blocked polyurethane prepolymer", *J Polym Sci Pol Chem.*, 2000.
- [12] L. Fishbein, „Aromatic-amines of major industrial importance - use and occurrence", *IARC Sci Publ DO.*, 1981.

- [13] M. Â. F. Perez, M. Padula, D. Moitinho, C. B. G. Bottoli, „Primary aromatic amines in kitchenware: Determination by liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *J Chromatogr A*, 2019.
- [14] L. McGachy, P. Tomášová, Z. Rošková, *Toxikologie a ekotoxikologie I.*, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2021.
- [15] I. Linhart, *Toxikologie: Interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky.*, VŠCHT Praha, 2022.
- [16] S. Letašiová, A. Medved'ová, A. Šovčíková, M. Dušinská, K. Volkovová, C. Mosoiu, A. Bartonová „Bladder cancer, a review of the environmental risk factors", *Environ. Health*, 2012.
- [17] A. Besaratinia, S. Tommasi, „Genotoxicity of tobacco smoke-derived aromatic amines and bladder cancer: current state of knowledge and future research directions", *Faseb J.*, 2013.
- [18] L. Tao, B. W. Day, B. Hu, Y. B. Xiang, R. Wang, M. C. Stern, M. Gago-Dominguez, V. K. Cortessis, D. V. Conti, D. Van Den Berg, „Elevated 4-aminobiphenyl and 2,6-dimethylaniline hemoglobin adducts and increased risk of bladder cancer among lifelong nonsmokers–The Shanghai Bladder Cancer Study", *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 2013.
- [19] E. Bessette, R. Turesky, S. Spivack, A. Goodenough, T. Wang, S. Pinto, F. Kadlubar, „Identification of carcinogen DNA adducts in human saliva by linear quadrupole ion trap/multistage tandem mass spectrometry", *Chem. Res. Toxicol.*, 2010.
- [20] M. Tichý, *Toxikologie pro chemiky.*, Karolinum, 1998.
- [21] SCCS, „Opinion on Nitrosamines and Secondary Amines in Cosmetic Products Final Opinion", 2012.
- [22] R. Baan, K. Straif, Y. Grosse, B. Secretan, F. El Ghissassi, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, V. Cogliano, „Carcinogenicity of some aromatic amines, organic dyes, and related exposures", *Lancet Oncol*, 2008.
- [23] M. Mattarozzi, F. Lambertini, M. Suman, M. Careri, „Liquid chromatography–full scan-high resolution mass spectrometry-based method towards the comprehensive analysis of migration of primary aromatic amines from food packaging", *J Chromatogr A*, 2013.
- [24] M. Â. Fávoro Perez, M. Padula, C. Lucio do Lago, C. B. Grespan Bottoli, D. Daniel, „Cooking Utensils: Determination of Primary Aromatic Amines by LC/MS/MS", *Agilent Technologies.*, 2019.

- [25] „IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans", *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, 2018.
- [26] „FDA", *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry.*, 2018.
- [27] G. Grimmer, G. Dettbarn, A. Seidel, J. Jacob, „Detection of carcinogenic aromatic amines in the urine of non-smokers", *Science of The Total Environment*, 2000.
- [28] L. Nováková, M. Douša, P. Česla, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021.
- [29] D. Kahoun, „Laboratorní cvičení z hmotnostní spektrometrie", *Přírodovědecká Fakulta, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích.*, 2023.
- [30] L. Nováková, M. Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.*, Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021.
- [31] M. Holčápek, „Molekulová spektrometrie (C549)", *Fakulta chemicko-technologická, Pardubice*, 2023.
- [32] S. Chinthakindi, K. Kannan, „Primary aromatic amines in indoor dust from 10 countries and associated human exposure", *Environ Int*, 2021.
- [33] S. Saha, R. Mistri, B. C. Ray, „Rapid and sensitive method for simultaneous determination of six carcinogenic aromatic amines in mainstream cigarette smoke by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry", *J Chromatogr A*, 2009.
- [34] F. Xie, J. Yu, S. Wang, G. Zhao, Q. Xia, X. Zhang, S. Zhang, „Rapid and simultaneous analysis of ten aromatic amines in mainstream cigarette smoke by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry under ISO and “Health Canada intensive” machine smoking regimens", *Talanta*, 2013.
- [35] Z. Bie, W. Lu, Y. Zhu, Y. Chen, H. Ren, L. Ji, „Rapid determination of six carcinogenic primary aromatic amines in mainstream cigarette smoke by two-dimensional online solid phase extraction combined with liquid chromatography tandem mass spectrometry", *J Chromatogr A*, 2017.
- [36] R. jie Luo, Q. bao Lin, L. Zhu, J. wei Yan, Z. Li, „Detection of primary aromatic amines content in food packaging ink and migration from printed plastic bags", *Food Packag Shelf Life*, 2022.
- [37] S. Chinthakindi, K. Kannan, „A liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the analysis of primary aromatic amines in human urine", *Journal of Chromatography B*, 2021.

- [38] „Aplikační list - ,Carcinogenic amines on Kinetex 2.6 µm EVO C18“, *Phenomenex*, 2023.
- [39] R. Stabbert, K.-H. Schäfer, C. Biefel, K. Rustemeier, „Analysis of aromatic amines in cigarette smoke“, *Rapid communications in mass spectrometry*, 2003.
- [40] „AOAC“, *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*., 2016.

## 7 Přílohy

### 7.1 Příloha A

| <b>Analyt</b> | <b>Koncentrace<br/>[mg/l]</b> | <b>S/N</b> | <b>Mez detekce<br/>[mg/l]</b> | <b>Mez stanovitelnosti<br/>[mg/l]</b> |
|---------------|-------------------------------|------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| 2-TOL         | 0,0250                        | 12         | 0,0063                        | 0,021                                 |
| BEN           | 0,00250                       | 100        | 0,000075                      | 0,00025                               |
| 1-NAL         | 0,0500                        | 9          | 0,017                         | 0,056                                 |
| 2-NAL         | 0,0500                        | 12         | 0,013                         | 0,042                                 |
| 3-AMB         | 0,0250                        | 12         | 0,0063                        | 0,021                                 |
| 4-AMB         | 0,0250                        | 9          | 0,0083                        | 0,028                                 |

## 7.2 Příloha B

| Analyt | Vnitřní standard | Produktový iont |
|--------|------------------|-----------------|
| 2-TOL  | 2-TOL-d7         | 93              |

| Kalibrační roztok | Koncentrační úroveň [mg/l] | Vypočtená koncentrace [mg/l] | Diference [%] |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|---------------|
| 2                 | 0,05                       | 0,0491                       | -2            |
|                   |                            | 0,0565                       | 13            |
|                   |                            | 0,0557                       | 11            |
|                   |                            | 0,0527                       | 5             |
| 3                 | 0,1                        | 0,0969                       | -3            |
|                   |                            | 0,110                        | 10            |
|                   |                            | 0,104                        | 4             |
|                   |                            | 0,0925                       | -8            |
| 4                 | 0,25                       | 0,247                        | -1            |
|                   |                            | 0,239                        | -4            |
|                   |                            | 0,280                        | 12            |
|                   |                            | 0,263                        | 5             |
| 5                 | 0,5                        | 0,475                        | -5            |
|                   |                            | 0,534                        | 7             |
|                   |                            | 0,499                        | 0             |
|                   |                            | 0,465                        | -7            |
| 6                 | 1                          | 0,971                        | -3            |
|                   |                            | 0,971                        | -3            |
|                   |                            | 0,945                        | -5            |
|                   |                            | 1,01                         | 1             |
| 7                 | 1,75                       | 1,93                         | 10            |
|                   |                            | 1,68                         | -4            |
|                   |                            | 1,60                         | -9            |
|                   |                            | 1,93                         | 10            |
| 8                 | 2,5                        | 2,79                         | 12            |
|                   |                            | 2,42                         | -3            |
|                   |                            | 2,52                         | 1             |
|                   |                            | 2,21                         | -11           |

## 7.3 Příloha C

| Analyt | Vnitřní standard | Produktový iont |
|--------|------------------|-----------------|
| BEN    | 2-TOL-d7         | 168             |

| Kalibrační roztok | Koncentrační úroveň [mg/l] | Vypočtená koncentrace [mg/l] | Diference [%] |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|---------------|
| 2                 | 0,005                      | 0,00450                      | -10           |
|                   |                            | 0,00520                      | 4             |
|                   |                            | 0,00453                      | -9            |
|                   |                            | 0,00435                      | -13           |
| 3                 | 0,01                       | 0,00816                      | -18           |
|                   |                            | 0,0104                       | 4             |
|                   |                            | 0,00988                      | -1            |
|                   |                            | 0,00999                      | 0             |
| 4                 | 0,025                      | 0,0205                       | -18           |
|                   |                            | 0,0218                       | -13           |
|                   |                            | 0,0250                       | 0             |
|                   |                            | 0,0218                       | -13           |
| 5                 | 0,05                       | 0,0442                       | -12           |
|                   |                            | 0,0522                       | 4             |
|                   |                            | 0,0472                       | -6            |
|                   |                            | 0,0485                       | -3            |
| 6                 | 0,1                        | 0,0897                       | -10           |
|                   |                            | 0,0921                       | -8            |
|                   |                            | 0,0846                       | -15           |
|                   |                            | 0,0964                       | -4            |
| 7                 | 0,175                      | 0,189                        | 8             |
|                   |                            | 0,175                        | 0             |
|                   |                            | 0,181                        | 3             |
|                   |                            | 0,186                        | 6             |
| 8                 | 0,25                       | 0,271                        | 9             |
|                   |                            | 0,280                        | 12            |
|                   |                            | 0,263                        | 5             |
|                   |                            | 0,248                        | -1            |
| 9                 | 0,5                        | 0,410                        | -18           |
|                   |                            | 0,531                        | 6             |
|                   |                            | 0,510                        | 2             |
|                   |                            | 0,517                        | 3             |



## 7.4 Příloha D

| Analyt | Vnitřní standard | Produktový iont |
|--------|------------------|-----------------|
| BEN    | 2-NAL-d7         | 168             |

| Kalibrační roztok | Koncentrační úroveň [mg/l] | Vypočtená koncentrace [mg/l] | Diference [%] |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|---------------|
| 4                 | 0,025                      | 0,0210                       | -16           |
|                   |                            | 0,0232                       | -7            |
|                   |                            | 0,0240                       | -4            |
|                   |                            | 0,0260                       | 4             |
| 5                 | 0,05                       | 0,0415                       | -17           |
|                   |                            | 0,0430                       | -14           |
|                   |                            | 0,0471                       | -6            |
|                   |                            | 0,0465                       | -7            |
| 6                 | 0,1                        | 0,0825                       | -18           |
|                   |                            | 0,0858                       | -14           |
|                   |                            | 0,0918                       | -8            |
|                   |                            | 0,101                        | 1             |
| 7                 | 0,175                      | 0,178                        | 2             |
|                   |                            | 0,162                        | -7            |
|                   |                            | 0,188                        | 7             |
|                   |                            | 0,182                        | 4             |
| 8                 | 0,25                       | 0,278                        | 11            |
|                   |                            | 0,262                        | 5             |
|                   |                            | 0,265                        | 6             |
|                   |                            | 0,256                        | 2             |
| 9                 | 0,5                        | 0,436                        | -13           |
|                   |                            | 0,523                        | 5             |
|                   |                            | 0,533                        | 7             |
|                   |                            | 0,555                        | 11            |
| 10                | 0,7                        | 0,596                        | -15           |
|                   |                            | 0,790                        | 13            |
|                   |                            | 0,679                        | -3            |
|                   |                            | 0,684                        | -2            |

## 7.5 Příloha E

| Analyt | Vnitřní standard | Produktový iont |
|--------|------------------|-----------------|
| 1-NAL  | 2-TOL-d7         | 117             |

| Kalibrační roztok | Koncentrační úroveň [mg/l] | Vypočtená koncentrace [mg/l] | Diference [%] |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|---------------|
| 3                 | 0,1                        | 0,100                        | 0             |
|                   |                            | 0,114                        | 14            |
|                   |                            | 0,112                        | 12            |
|                   |                            | 0,112                        | 12            |
| 4                 | 0,25                       | 0,226                        | -9            |
|                   |                            | 0,270                        | 8             |
|                   |                            | 0,286                        | 14            |
|                   |                            | 0,266                        | 6             |
| 5                 | 0,5                        | 0,519                        | 4             |
|                   |                            | 0,531                        | 6             |
|                   |                            | 0,451                        | -10           |
|                   |                            | 0,510                        | 2             |
| 6                 | 1                          | 0,854                        | -15           |
|                   |                            | 0,981                        | -2            |
|                   |                            | 0,882                        | -12           |
|                   |                            | 0,942                        | -6            |
| 7                 | 1,75                       | 1,92                         | 10            |
|                   |                            | 1,70                         | -3            |
|                   |                            | 1,86                         | 6             |
|                   |                            | 1,79                         | 2             |
| 8                 | 2,5                        | 2,46                         | -2            |
|                   |                            | 2,69                         | 8             |
|                   |                            | 2,60                         | 4             |
|                   |                            | 2,27                         | -9            |
| 9                 | 5                          | 4,69                         | -6            |
|                   |                            | 5,22                         | 4             |
|                   |                            | 5,12                         | 2             |
|                   |                            | 4,94                         | -1            |

## 7.6 Příloha F

| Analyt | Vnitřní standard | Produktový iont |
|--------|------------------|-----------------|
| 1-NAL  | 2-NAL-d7         | 117             |

| Kalibrační roztok | Koncentrační úroveň [mg/l] | Vypočtená koncentrace [mg/l] | Diference [%] |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|---------------|
| 4                 | 0,25                       | 0,248                        | -1            |
|                   |                            | 0,286                        | 14            |
|                   |                            | 0,262                        | 5             |
|                   |                            | 0,283                        | 13            |
| 5                 | 0,5                        | 0,510                        | 2             |
|                   |                            | 0,429                        | -14           |
|                   |                            | 0,467                        | -7            |
|                   |                            | 0,481                        | -4            |
| 6                 | 1                          | 0,857                        | -14           |
|                   |                            | 0,862                        | -14           |
|                   |                            | 0,929                        | -7            |
|                   |                            | 1,03                         | 3             |
| 7                 | 1,75                       | 1,96                         | 12            |
|                   |                            | 1,52                         | -13           |
|                   |                            | 1,87                         | 7             |
|                   |                            | 1,95                         | 12            |
| 8                 | 2,5                        | 2,65                         | 6             |
|                   |                            | 2,34                         | -7            |
|                   |                            | 2,45                         | -2            |
|                   |                            | 2,14                         | -14           |
| 9                 | 5                          | 4,65                         | -7            |
|                   |                            | 5,34                         | 7             |
|                   |                            | 5,74                         | 15            |
|                   |                            | 5,48                         | 10            |
| 10                | 7                          | 7,22                         | 3             |
|                   |                            | 6,35                         | -9            |
|                   |                            | 6,84                         | -2            |
|                   |                            | 6,86                         | -2            |

## 7.7 Příloha G

| Analyt | Vnitřní standard | Produktový iont |
|--------|------------------|-----------------|
| 1-NAL  | 4-AMB-d9         | 117             |

| Kalibrační roztok | Koncentrační úroveň [mg/l] | Vypočtená koncentrace [mg/l] | Diference [%] |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|---------------|
| 3                 | 0,1                        | 0,0987                       | -1            |
|                   |                            | 0,0869                       | -13           |
|                   |                            | 0,0876                       | -12           |
|                   |                            | 0,0841                       | -16           |
| 4                 | 0,25                       | 0,227                        | -9            |
|                   |                            | 0,273                        | 9             |
|                   |                            | 0,284                        | 14            |
|                   |                            | 0,258                        | 3             |
| 5                 | 0,5                        | 0,545                        | 9             |
|                   |                            | 0,448                        | -10           |
|                   |                            | 0,483                        | -3            |
|                   |                            | 0,530                        | 6             |
| 6                 | 1                          | 0,992                        | -1            |
|                   |                            | 0,935                        | -6            |
|                   |                            | 1,06                         | 6             |
|                   |                            | 1,02                         | 2             |
| 7                 | 1,75                       | 2,08                         | 19            |
|                   |                            | 1,88                         | 7             |
|                   |                            | 1,89                         | 8             |
|                   |                            | 1,83                         | 5             |
| 8                 | 2,5                        | 2,34                         | -7            |
|                   |                            | 2,47                         | -1            |
|                   |                            | 2,45                         | -2            |
|                   |                            | 2,10                         | -16           |
| 9                 | 5                          | 4,93                         | -1            |
|                   |                            | 4,96                         | -1            |
|                   |                            | 5,44                         | 9             |
|                   |                            | 5,01                         | 0             |
| 10                | 7                          | 6,78                         | -3            |
|                   |                            | 6,67                         | -5            |
|                   |                            | 7,49                         | 7             |
|                   |                            | 5,93                         | -15           |
| 11                | 9                          | 8,03                         | -11           |
|                   |                            | 9,93                         | 10            |
|                   |                            | 9,51                         | 6             |
|                   |                            | 9,26                         | 3             |

## 7.8 Příloha H

| Analyt | Vnitřní standard | Produktový iont |
|--------|------------------|-----------------|
| 2-NAL  | 2-TOL-d7         | 117             |

| Kalibrační roztok | Koncentrační úroveň [mg/l] | Vypočtená koncentrace [mg/l] | Diference [%] |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|---------------|
| 4                 | 0,25                       | 0,210                        | -16           |
|                   |                            | 0,202                        | -19           |
|                   |                            | 0,227                        | -9            |
|                   |                            | 0,202                        | -19           |
| 5                 | 0,5                        | 0,500                        | 0             |
|                   |                            | 0,489                        | -2            |
|                   |                            | 0,409                        | -18           |
|                   |                            | 0,444                        | -11           |
| 6                 | 1                          | 0,932                        | -7            |
|                   |                            | 0,962                        | -4            |
|                   |                            | 0,902                        | -10           |
|                   |                            | 0,880                        | -12           |
| 7                 | 1,75                       | 2,01                         | 15            |
|                   |                            | 1,54                         | -12           |
|                   |                            | 1,83                         | 5             |
|                   |                            | 1,92                         | 10            |
| 8                 | 2,5                        | 2,37                         | -5            |
|                   |                            | 2,72                         | 9             |
|                   |                            | 2,69                         | 7             |
|                   |                            | 2,38                         | -5            |
| 9                 | 5                          | 5,02                         | 0             |
|                   |                            | 5,34                         | 7             |
|                   |                            | 5,32                         | 6             |
|                   |                            | 5,51                         | 10            |
| 10                | 7                          | 6,57                         | -6            |
|                   |                            | 6,06                         | -13           |
|                   |                            | 7,25                         | 3             |
|                   |                            | 6,82                         | -3            |
| 11                | 9                          | 8,57                         | -5            |
|                   |                            | 9,34                         | 4             |
|                   |                            | 8,56                         | -5            |
|                   |                            | 9,84                         | 9             |

## 7.9 Příloha CH

| Analyt | Vnitřní standard | Produktový iont |
|--------|------------------|-----------------|
| 2-NAL  | 2-NAL-d7         | 117             |

| Kalibrační roztok | Koncentrační úroveň [mg/l] | Vypočtená koncentrace [mg/l] | Diference [%] |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|---------------|
| 4                 | 0,25                       | 0,256                        | 2             |
|                   |                            | 0,280                        | 12            |
|                   |                            | 0,278                        | 11            |
|                   |                            | 0,299                        | 20            |
| 5                 | 0,5                        | 0,499                        | 0             |
|                   |                            | 0,448                        | -10           |
|                   |                            | 0,464                        | -7            |
|                   |                            | 0,455                        | -9            |
| 6                 | 1                          | 0,829                        | -17           |
|                   |                            | 0,913                        | -9            |
|                   |                            | 0,991                        | -1            |
|                   |                            | 0,940                        | -6            |
| 7                 | 1,75                       | 1,89                         | 8             |
|                   |                            | 1,43                         | -18           |
|                   |                            | 1,82                         | 4             |
|                   |                            | 1,86                         | 6             |
| 8                 | 2,5                        | 2,50                         | 0             |
|                   |                            | 2,41                         | -4            |
|                   |                            | 2,72                         | 9             |
|                   |                            | 2,41                         | -4            |
| 9                 | 5                          | 5,04                         | 1             |
|                   |                            | 5,06                         | 1             |
|                   |                            | 5,43                         | 8             |
|                   |                            | 5,45                         | 9             |
| 10                | 7                          | 6,58                         | -6            |
|                   |                            | 7,30                         | 4             |
|                   |                            | 6,73                         | -4            |
|                   |                            | 6,73                         | -4            |

## 7.10 Příloha I

| Analyt | Vnitřní standard | Produktový iont |
|--------|------------------|-----------------|
| 2-NAL  | 4-AMB-d9         | 117             |

| Kalibrační roztok | Koncentrační úroveň [mg/l] | Vypočtená koncentrace [mg/l] | Diference [%] |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|---------------|
| 3                 | 0,1                        | 0,122                        | 22            |
|                   |                            | 0,102                        | 2             |
|                   |                            | 0,105                        | 5             |
|                   |                            | 0,115                        | 15            |
| 4                 | 0,25                       | 0,248                        | -1            |
|                   |                            | 0,244                        | -2            |
|                   |                            | 0,270                        | 8             |
|                   |                            | 0,242                        | -3            |
| 5                 | 0,5                        | 0,556                        | 11            |
|                   |                            | 0,466                        | -7            |
|                   |                            | 0,437                        | -13           |
|                   |                            | 0,496                        | -1            |
| 6                 | 1                          | 1,05                         | 5             |
|                   |                            | 0,943                        | -6            |
|                   |                            | 1,05                         | 5             |
|                   |                            | 0,891                        | -11           |
| 7                 | 1,75                       | 2,02                         | 15            |
|                   |                            | 1,62                         | -8            |
|                   |                            | 1,80                         | 3             |
|                   |                            | 1,77                         | 1             |
| 8                 | 2,5                        | 2,32                         | -7            |
|                   |                            | 2,53                         | 1             |
|                   |                            | 2,64                         | 6             |
|                   |                            | 2,34                         | -6            |
| 9                 | 5                          | 5,29                         | 6             |
|                   |                            | 4,74                         | -5            |
|                   |                            | 4,62                         | -8            |
|                   |                            | 5,39                         | 8             |

## 7.11 Příloha J

| Analyt | Vnitřní standard | Produktový iont |
|--------|------------------|-----------------|
| 3-AMB  | 4-AMB-d9         | 153             |

| Kalibrační roztok | Koncentrační úroveň [mg/l] | Vypočtená koncentrace [mg/l] | Diference [%] |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|---------------|
| 3                 | 0,1                        | 0,0912                       | -9            |
|                   |                            | 0,0777                       | -22           |
|                   |                            | 0,0799                       | -20           |
|                   |                            | 0,0822                       | -18           |
| 4                 | 0,25                       | 0,205                        | -18           |
|                   |                            | 0,215                        | -14           |
|                   |                            | 0,228                        | -9            |
|                   |                            | 0,238                        | -5            |
| 5                 | 0,5                        | 0,484                        | -3            |
|                   |                            | 0,467                        | -7            |
|                   |                            | 0,463                        | -7            |
|                   |                            | 0,456                        | -9            |
| 6                 | 1                          | 0,987                        | -1            |
|                   |                            | 0,897                        | -10           |
|                   |                            | 1,02                         | 1             |
|                   |                            | 0,984                        | -2            |
| 7                 | 1,75                       | 1,88                         | 7             |
|                   |                            | 1,68                         | -4            |
|                   |                            | 1,68                         | -4            |
|                   |                            | 1,88                         | 8             |
| 8                 | 2,5                        | 2,64                         | 5             |
|                   |                            | 2,49                         | 0             |
|                   |                            | 2,61                         | 4             |
|                   |                            | 2,35                         | -6            |
| 9                 | 5                          | 4,93                         | -1            |
|                   |                            | 5,60                         | 12            |
|                   |                            | 5,08                         | 2             |
|                   |                            | 5,26                         | 5             |
| 10                | 7                          | 6,66                         | -5            |
|                   |                            | 7,05                         | 1             |
|                   |                            | 7,06                         | 1             |
|                   |                            | 6,58                         | -6            |



## 7.12 Příloha K

| Analyt | Vnitřní standard | Produktový iont |
|--------|------------------|-----------------|
| 4-AMB  | 4-AMB-d9         | 153             |

| Kalibrační roztok | Koncentrační úroveň [mg/l] | Vypočtená koncentrace [mg/l] | Diference [%] |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|---------------|
| 2                 | 0,05                       | 0,0536                       | 7             |
|                   |                            | 0,0531                       | 6             |
|                   |                            | 0,0583                       | 17            |
|                   |                            | 0,0601                       | 20            |
| 3                 | 0,1                        | 0,117                        | 17            |
|                   |                            | 0,101                        | 1             |
|                   |                            | 0,0994                       | -1            |
|                   |                            | 0,0976                       | -2            |
| 4                 | 0,25                       | 0,202                        | -19           |
|                   |                            | 0,228                        | -9            |
|                   |                            | 0,256                        | 3             |
|                   |                            | 0,241                        | -4            |
| 5                 | 0,5                        | 0,492                        | -2            |
|                   |                            | 0,502                        | 0             |
|                   |                            | 0,494                        | -1            |
|                   |                            | 0,470                        | -6            |
| 6                 | 1                          | 1,06                         | 6             |
|                   |                            | 0,934                        | -7            |
|                   |                            | 1,07                         | 7             |
|                   |                            | 0,972                        | -3            |
| 7                 | 1,75                       | 1,88                         | 7             |
|                   |                            | 1,87                         | 7             |
|                   |                            | 1,70                         | -3            |
|                   |                            | 1,70                         | -3            |
| 8                 | 2,5                        | 2,70                         | 8             |
|                   |                            | 2,42                         | -3            |
|                   |                            | 2,45                         | -2            |
|                   |                            | 2,33                         | -7            |

## 7.13 Příloha L

| Analyt | Vnitřní standard | Koeficient determinace (R <sup>2</sup> ) |
|--------|------------------|------------------------------------------|
| 2-TOL  | 2-TOL-d7         | 0,9870                                   |
| BEN    | 2-TOL-d7         | 0,9855                                   |
|        | 2-NAL-d7         | 0,9805                                   |
| 1-NAL  | 2-TOL-d7         | 0,9950                                   |
|        | 2-NAL-d7         | 0,9875                                   |
|        | 4-AMB-d9         | 0,9875                                   |
| 2-NAL  | 2-TOL-d7         | 0,9896                                   |
|        | 2-NAL-d7         | 0,9932                                   |
|        | 4-AMB-d9         | 0,9911                                   |
| 3-AMB  | 4-AMB-d9         | 0,9951                                   |
| 4-AMB  | 4-AMB-d9         | 0,9938                                   |