

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Použití kapalinové chromatografie v analýze vzorků  
životního prostředí**

Bakalářská práce

**Monika Křížová**

Školitelka: Ing. Pavla Fojtíková, Ph.D.

České Budějovice 2022

Křížová, M., 2022: Použití kapalinové chromatografie v analýze vzorků životního prostředí. [Application of liquid chromatography in the analysis of environmental samples. Bc. Theses, in Czech.] – 43 p, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace**

This work deals with the use of HPLC method in the analysis of environmental samples. Cigarette butts are one of the most common garbage in nature. These cigarette butts may contain high amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and many other toxic and chemical compounds, which may contaminate the environment. One of the aims of this work was to optimize extraction process of 16 priority PAHs from freshly smoked cigarette butts and the HPLC/FLD analytical method and consequently to determine their contents in collected samples.

The second part of the work is devoted to the introduction of a method suitable for the quantitative evaluation of metformin loss in 100% aqueous samples. The method will be further used for the analysis of standard solutions in the monitoring and evaluation of possible photochemical reactions of metformin.

### **Prohlášení**

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

**Klíčová slova**

Kapalinová chromatografie, polycyklické aromatické uhlovodíky, cigaretové nedopalky, metformin, optimalizace, validace

**Key words**

Liquid chromatography, polycyclic aromatic hydrocarbons, cigarette butts, metformin, optimization, validation

## **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Pavle Fojtíkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a předané zkušenosti. Děkuji za přátelský přístup, vstřícnost a ochotu při zpracování práce.

# Obsah

1	Seznam použitých zkratek a symbolů.....	1
2	Úvod.....	3
3	Cíle práce.....	3
4	Teoretická část.....	4
4.1	Kapalinová chromatografie.....	4
4.2	Polycyklické aromatické uhlovodíky.....	7
4.3	Metformin.....	10
4.4	Stanovení metforminu pomocí HPLC s UV detekcí.....	10
5	Materiály a metody.....	13
5.1	Použité chemikálie.....	13
5.2	Instrumentální vybavení a spotřební materiál.....	13
5.3	Příprava roztoků, postup extrakce nedopalků a podmínky chromatografické separace pro stanovení PAU.....	15
5.3.1	Příprava mobilní fáze.....	15
5.3.2	Příprava zásobních a pracovních roztoků ST a VS.....	15
5.3.3	Příprava kalibračních roztoků.....	15
5.3.4	Příprava roztoků pro extrakce.....	16
5.3.5	Sběr a uchování vzorků.....	16
5.3.6	Postup extrakce nedopalků.....	17
5.3.7	Podmínky chromatografické separace PAU.....	17
5.4	Příprava roztoků – vývoj metody pro metformin.....	18
5.4.1	Příprava mobilních fází.....	18
5.4.2	Příprava zásobního a pracovních roztoků standardu.....	18
5.5	Výsledky a diskuse.....	19
5.5.1	Optimalizace metody extrakce a stanovení PAU.....	19
5.5.2	Validace metody pro stanovení PAU.....	20
5.5.3	Stanovení koncentrace PAU ve vzorcích nedopalků.....	22

5.5.4	Optimalizace podmínek chromatografické separace metforminu.....	28
6	Závěr.....	31
7	Seznam použitých literárních zdrojů.....	33
8	Přílohy.....	40

# 1 Seznam použitých zkratek a symbolů

a	Směrnice kalibrační křivky
AY	Acenaftylen
ACN	Acetonitril
AE	Acenaften
AN	Antracen
BA	Benzo[a]antracen
BaP	Benzo[a]pyren
BbF	Benzo[b]fluoranthen
BkF	Benzo[k]fluoranthen
BP	Benzo[g,h,i]perylene
c	koncentrace
DA	Dibenzo[a,h]antracen
FE	Fenantren
FL	Fluoranthen
FLD	Fluorescenční detektor
FR	Fluoren
GC/MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
CH	Chrysen
IP	Indeno[1,2,3-c,d]pyren
k	Kapacitní poměr
$K_D$	Distribuční konstanta
MF	Mobilní fáze
NA	Naftalen
PAU	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PEEK	Polyetherketon
PR	Pyren
q	Úsek na ose y (intercept) rovnice kalibrační křivky
QC	Koeficient kvality lineární regrese
R	Korelační koeficient

Re	Výtěžnost
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
RSD	Relativní směrodatná odchylka
S/N	Poměr signálu k šumu
ST	Standardní sloučenina
$t_M$	Mrtvý retenční čas
$t_R$	Retenční čas
UV/VIS	Ultrafialovo-viditelná (spektrofotometrie)
US EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí
VS	Vnitřní standard
Vz	Vzorek
y	Odezva detektoru



## 2 Úvod

Tato práce se zabývá využitím metody HPLC v analýze vzorků životního prostředí. Cigaretové nedopalky jsou jedním z nejběžnějších odpadků vyskytujících se v přírodě. Obsahují polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) a mnoho dalších chemických sloučenin, které kontaminují životní prostředí. Jedním z cílů práce je optimalizace extrakce a stanovení prioritních 16 PAU v čerstvě vykouřených nedopalcích a vyhodnocení jejich obsahů.

Další část práce je věnována zavedení metody vhodné pro kvantitativní hodnocení úbytku metforminu ve 100 % vodných vzorcích. Metoda bude dále využívána pro analýzu roztoků standardů při sledování a hodnocení možných fotochemických reakcí metforminu.

## 3 Cíle práce

- 1) teoretické a praktické seznámení se s analýzou vzorků pomocí kapalinové chromatografie
- 2) stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků v cigaretových nedopalcích metodou HPLC s FLD a UV detekcí
- 3) vývoj, optimalizace metody pro analýzu metforminu ve vodném roztoku metodou HPLC s UV detekcí

## 4 Teoretická část

### 4.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie se řadí do skupiny separačních analytických metod. V současné době se v praxi využívá zejména vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC), která byla použita i v této práci (Křížek a Šíma 2015). Jde o systém s polární mobilní fází a nepolární stacionární fází, který umožňuje separaci sloučenin různých polarit (Nováková et al. 2021).

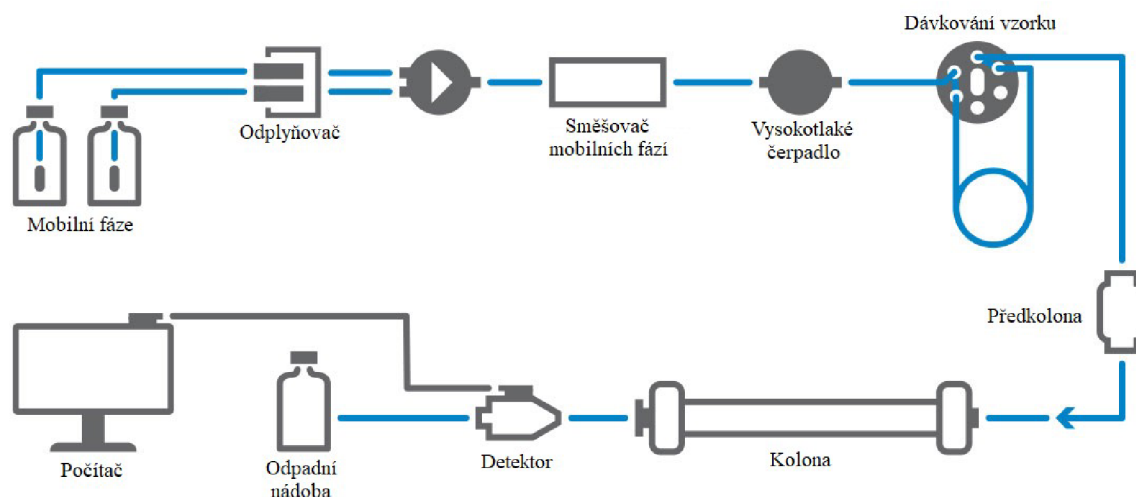
Principem kapalinové chromatografie je rozdílná distribuce látek mezi dvě nemísitelné fáze, a to pohyblivou (mobilní) fází a nepohyblivou (stacionární) fází (Nováková et al. 2021). Mobilní fáze je v tomto typu chromatografie tvořena rozpouštědlem nebo jejich mísitelnou směsí. K přípravě směsí se vybírají kombinace polárních a méně polárních sloučenin, např. acetonitril či methanol a voda (Záruba 2016). Stacionární fáze je umístěná v chromatografické koloně a je tvořena buď pevnou látkou nebo kapalinou nejčastěji ukotvenou na tuhém nosiči (Nováková et al. 2021).

V průběhu chromatografické separace dochází k zadržování molekul analytu na sorbentu střídající plynutí molekul s mobilní fází. Jedná se o dynamický proces přecházení, kdy se v každém okamžiku systém blíží rovnováze, nicméně jí není dosaženo. Tento stav hledání rovnováhy mezi analytem, stacionární a mobilní fází charakterizuje distribuční konstanta značená  $K_D$  (Záruba 2016).

Při interakci analytu s mobilní a stacionární fází je podstatná jejich vzájemná afinita, která ovlivňuje dobu eluce neboli hodnotu retenčního času. Tato veličina charakterizuje dobu od nástřiku vzorku do chromatografického systému po maximum píku. Čím vyšší je afinita analytu k sorbentu, tím déle je v chromatografické koloně zadržován a retenční čas je vyšší. Naopak při vysoké interakci s mobilní fází a velmi nízkou či žádnou afinitou analytu k sorbentu dochází k eluci záhy nebo již v tzv. mrtvém objemu (Křížek a Šíma 2015).

Základní části chromatografu jsou zásobníky mobilních fází, směšovač, vysokotlaké čerpadlo, dávkovací zařízení (stříkačka či autosampler), chromatografická kolona eventuálně s předkolonou umístěná v termostatu, detektor, odpadní nádoba a zapisovač v podobě počítače.

Na Obr. 1 je znázorněno schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).



Obr. 1: Schéma HPLC (upraveno a převzato z TUDelft 2021)

Před vstupem mobilní fáze do systému je pomocí odplyňovače odstraněn rozpuštěný vzduch v kapalině, aby nebyl signál detektoru ovlivněn procházejícími bublinkami vzduchu (Záruba 2016).

Složky mobilních fází lze mísit podle gradientového programu ve směšovači, který může být řazen před i za vysokotlakým čerpadlem (Nováková et al. 2021).

V systému HPLC se pracuje za vysokých tlaků pomocí vysokotlakého čerpadla, které zajišťuje rozsah tlaků 1 - 35 MPa, při průtocích mobilní fáze v rozmezí 0,01 - 10 ml/min. Čerpadlo musí tlumit pulzaci mobilní fáze zařazením tlumiče pulzů nebo např. využitím čerpadla v opačné fázi (Křížek a Šíma 2015; Záruba 2016).

Pro dávkování vzorku se nejčastěji využívá autosampler, tedy automatický dávkovač složený z nástřikového zařízení a prostoru pro umístění vzorků ve vialkách. Vialky jsou skleněné či plastové mikronádoby o standardizovaném objemu 2 ml se speciálním uzávěrem vybaveným pryžovým či silikonovým septem. Pro správné a přesné nanesení vzorku je důležité zamezit rozmytí zóny vzorku neboli disperzi a to při vpravení vzorku do vysokotlakého systému chromatografu (Nováková et al. 2021).

Vzorek je dále unášen proudem mobilní fáze do chromatografické kolony, které může předcházet předkolona zabezpečující její ochranu před nečistotami, např. u přírodních vzorků (Křížek a Šíma 2015).

Analytické kolony pro kapalinovou chromatografii jsou rovné ocelové či skleněné trubice o délce obvykle 10 – 300 mm a s vnitřním průměrem 2,1 – 5 mm (Záruba et al. 2016; Nováková et al. 2021). Kolona je vyplněna sorbentem s velikostí částic nejčastěji 1 – 10  $\mu\text{m}$ , kterým může být tuhá látka nebo kapalina ukotvená na nosiči. Stacionární fáze lze dělit

podle různých kritérií, např. dle skupenství, polarity, chromatografického módu nebo podle chemického složení. Z chemického hlediska lze stacionární fáze rozdělit na anorganické oxidy, mezi něž patří silikagel, oxid zirkoničitý, oxid hlinitý a oxid titaničitý. Dalšími skupinami stacionárních fází jsou chemicky vázané fáze na bázi silikagelu, organické polymery, hybridní stacionární fáze a stacionární fáze na bázi grafitového uhlíku. Stacionární fázi lze charakterizovat několika parametry jako je např. velikost a tvar částic, měrný povrch, který je nepřímo úměrný velikosti pórů, dále obsah uhlíku či měrný objem pórů. Při výběru vhodné kolony a stacionární fáze je důležitá mechanická stabilita, tedy odolnost vůči vysokému tlaku uvnitř kolony, ale i chemická stabilita v souvislosti s mobilní fází, která nesmí reagovat s fází stacionární. Nejužívanější při klasické chromatografii je pro své vlastnosti silikagel, polární anorganický sorbent. Po chemické úpravě je silikagel hojně využíván také pro separaci na reverzních fázích. Povrchové hydroxylové skupiny silikagelu jsou modifikovány vhodným ligandem. Příkladem je často používaná C<sub>18</sub> chemicky vázaná stacionární fáze. Tělo kolony je zakončeno koncovkou, která zajišťuje dostatečnou těsnost, rovnoměrnou distribuci mobilní fáze a analytu kolonou v procesu separace a zadržování stacionární fáze kolony. Spojení s dávkovačem a detektorem je zajištěno kovovými, polyetherketonovými (PEEK) kapilárami, hydraulickými spojkami či PEEK kapilárami s křemenem (Nováková et al. 2021).

K možnosti úpravy a zajištění konstantní teploty a případně optimalizaci separační metody je kolona umístěna v termostatu. V současné době jsou využívány výhradně horkovzdušné termostaty se vzduchem jako médiem, které zabezpečují rovnoměrné šíření dané teploty (Nováková et al. 2021).

Pro zaznamenání odezvy, tedy změny signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze s analytem, slouží detektor. Mezi hojně využívané detektory patří spektrofotometrické detektory, které pracují na principu absorpce záření v UV/VIS oblasti, konkrétně v rozsahu vlnových délek 190 – 800 nm. Dle konstrukčního uspořádání lze tyto detektory rozdělit na detektory s fixní, měnitelnou a programovatelnou vlnovou délkou a na tzv. detektory s diodovým polem. Ty jsou schopné snímat celé UV/VIS spektrum složky v reálném čase bez přerušení procesu separace. Dále je velmi rozšířen fluorescenční detektor fungující na principu luminiscence a měření sekundárního (emisního) záření, které látka vydá po absorpci primárního (excitačního) záření. Luminiscencí se rozumí vyzáření světla při přechodu molekuly ze stavu excitovaného do základního. Na základě energie, kterou je luminiscence vybuzena, ji lze rozdělit například na fotoluminiscenci, chemiluminiscenci nebo elektroluminiscenci. Dále je rozlišována na fluorescenci a fosforescenci podle doby

dosvitu po odstranění zdroje excitace. V současné době se do popředí dostává využití systému HPLC v kombinaci s detekcí pomocí hmotností spektrometrie. Odezva detektoru je zpracována počítačem v podobě časového záznamu signálu znázorněného křivkou Gaussovského tvaru (píku) na chromatogramu (Nováková et al. 2021).

## 4.2 Polycyklické aromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou organické perzistentní sloučeniny, jejichž základ je tvořen dvěma a více benzenovými jádry. Jedná se o látky téměř všudypřítomné, které mohou mít mutagenní a karcinogenní účinky (Tomaniová et al. 1997; Bezpečnost potravin A-Z 2022). Charakteristické vlastnosti pro PAU jsou vysoké teploty tání a varu, nízká tenze par, nízká rozpustnost ve vodě a také jsou vysoce lipofilní. Ovšem jejich fyzikálně-chemické vlastnosti se mohou značně lišit v závislosti na molekulové hmotnosti. S rostoucí molekulovou hmotností se tenze par PAU a rozpustnost ve vodě snižuje a naopak teploty tání, varu a lipofilita se zvyšuje (Abdel-Shafy a Mansour 2016; Masih et al. 2012). Agenturou pro ochranu životního prostředí (US EPA) bylo vybráno 15 PAU a naftalen jako vysoce prioritní kontaminanty životního prostředí. Chemické sloučeniny z kategorie 16 PAU jsou znázorněny v Tab. 1 (US EPA 2022; Hussar et al. 2012). Ke vzniku PAU dochází zejména pyrolýzou a spalováním organických sloučenin za omezeného přístupu kyslíku při 500 – 900 °C (Tomaniová et al. 1997; Bezpečnost potravin A-Z 2022). Neantropogenními zdroji PAU jsou např. lesní požáry, vulkanická činnost a biochemická syntéza některými makrofyty a mikroorganismy (Tomaniová et al. 1997; Fouchecourt et al. 1999). Mezi významné antropogenní zdroje PAU patří např. spalování fosilních paliv, zpracování ropy, těžba uhlí, ropné skvrny a potraviny, zejména po nevhodné tepelné úpravě (Hussar et al. 2012).




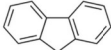

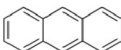


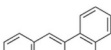
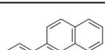

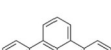
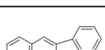
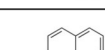



Řada toxických látek a PAU vznikají také při hoření tabákových listů v cigaretových produktech. Následně se uvolňují nejen do ovzduší, ale zůstávají zachyceny i ve filtrech cigaret. V současné době patří nedopalky mezi nejčastější odpad v životním prostředí. Jde o odpad, který může následně kontaminovat vzduch, půdu a vodu. Nicméně pro vodní systémy zatím není environmentální význam PAU pocházejících z nedopalků zcela objasněn (Dobaradaran et al. 2020; Novotny et al. 2009).

Většina dosud publikovaných prací se zabývá obsahem PAU v cigaretovém kouři. Např. publikace (Vu et al. 2015) se věnuje zastoupení 14 PAU pomocí metody GC/MS v primárním proudu cigaretového kouře pro 50 komerčních amerických cigaret. Celkové hodnoty zastoupení 14 PAU se pohybovaly v rozsahu 0,14 – 2,6 µg na váhu cigarety.

V celkových hodnotách obsahů PAU dominovaly zejména nízkomolekulární PAU (NA, FR a FE). Naopak výrazně nižší výtěžek byl zaznamenán u PAU s vyšší molekulovou hmotností, např. pro BbF, BkF a BaP. Tato skutečnost značí závislost hodnoty obsahu jednotlivého PAU na molekulové hmotnosti. Počet publikací, kde byl sledován obsah PAU přímo v cigaretových nedopalcích není mnoho. Publikace (Moriwaki et al. 2009) zkoumala jeden vzorek nedopalku odebraného z životního prostředí v Japonsku, v kterém byl celkový obsah 11 PAU roven 0,39  $\mu\text{g/g}$ . Ve studii (Shimazu 2016) bylo stanoveno 9 PAU v pěti značkách cigaret. Nejrozsáhlejší publikovaný výzkum obsahu PAU v nedopalcích je (Dobaradaran et al. 2019). Zabývá se porovnáním koncentrací 16 PAU v čerstvě vykouřených cigaretách s koncentrací těchto látek v nedopalcích po určitou dobu exponovaných podmínkách okolního prostředí v ulicích měst a v blízkosti vodních toků. Nedopalky byly extrahovány v 3,5 ml cyklohexanu a po dobu 14 h třepány. Výzkum v této studii proběhl s využitím GC/MS. Výsledné celkové koncentrace pro 16 PAU ze 36 čerstvých nedopalků se nacházely v rozsahu 14,4 – 35,9  $\mu\text{g/g}$ , z něhož vyplývá značná variabilita obsahů PAU mezi jednotlivými vzorky. Studie uvádí pořadí jednotlivých PAU dle jejich zastoupení. Nejvyšších hodnot dosahovaly analyty NA, IP, DA, AE a FR s procentuálním zastoupením 23; 7,4; 7,4; 6,8 a 6,4 % z celkového obsahu. Mezi těmito pěti nejvíce zastoupenými PAU se vyskytují analyty s nejnižší i nejvyšší molekulovou hmotností. Pro nedopalky z ulic ve městě byl naměřen celkový obsah PAU pro 72 vzorků v rozsahu 10,8 – 32,7  $\mu\text{g/g}$  a pro stejný počet nedopalků louhovaných v řece 12,2 – 27,8  $\mu\text{g/g}$ .

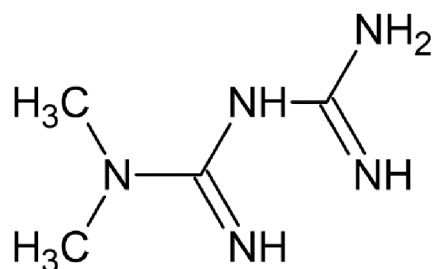
Dále bylo v (Dobaradaran et al. 2020) provedeno měření a hodnocení koncentrací 16 PAU z výluhu nedopalků. Expozice nedopalků ve vodě probíhala v rozmezí 4 h až 21 dnů. Celková množství všech vyextrahovaných PAU se pohybovala v rozmezí 3,9 – 5,7; 3,3 – 5,5 a 3,0 – 5,0  $\mu\text{g/l}$  pro vodu deionizovanou, vodovodní a říční. PAU s nižší molekulovou hmotností byly ve výluhu detekovány již po 4 h a celkově dosahovaly nejvyšších koncentrací. Studie tedy souhlasí s výsledky publikace (Vu et al. 2015) z hlediska závislosti zastoupení PAU na jejich molekulové hmotnosti.

Tab. 1: Sloučeniny z kategorie 16 PAU dle US EPA a vnitřní standard (Merck 2022)

Sloučenina	Zkratka	Vzorec	Mr [g/mol]	CAS	
Naftalen	NA		$C_{10}H_8$	128,17	91-20-3
Acenaftylen	AY		$C_{12}H_8$	152,19	208-96-8
Acenaften	AE		$C_{12}H_{10}$	154,21	83-32-9
Fluoren	FR		$C_{13}H_{10}$	166,22	86-73-7
Fenantren	FE		$C_{14}H_{10}$	178,23	85-01-8
Antracen	AN		$C_{14}H_{10}$	178,23	120-12-7
Fluoranthen	FL		$C_{16}H_{10}$	202,25	206-44-0
Pyren	PR		$C_{16}H_{10}$	202,25	129-00-0
Benzo[a]antracen	BA		$C_{18}H_{12}$	228,29	56-55-3
Chrysen	CH		$C_{18}H_{12}$	228,29	218-01-9
9,10-difenylantracen	VS		$C_{26}H_{18}$	330,42	1499-10-1
Benzo[b]fluoranthen	BbF		$C_{20}H_{12}$	252,31	205-99-2
Benzo[k]fluoranthen	BkF		$C_{20}H_{12}$	252,31	207-08-9
Benzo[a]pyren	BaP		$C_{20}H_{12}$	252,31	50-32-8
Dibenzo[a,h]antracen	DA		$C_{22}H_{14}$	278,35	53-70-3
Benzo[g,h,i]perylen	BP		$C_{22}H_{12}$	276,33	191-24-2
Indeno[1,2,3-c,d]pyren	IP		$C_{22}H_{12}$	276,33	193-39-5

### 4.3 Metformin

Metformin neboli 1,1-dimethylbiguanid je organická sloučenina, jejíž strukturní vzorec je znázorněn na Obr. 2 (Metry et al. 2021; Mubeen a Noor 2009). Systematický název této sloučeniny je 3-(diaminomethyliden)-1,1-dimethylguanidin a její registrační číslo CAS je 657-24-9 (CAS Common chemistry 2022). Jedná se o látku stabilní, velmi polární a ve vodě rozpustnou. Ve formě soli hydrochloridu je využívána ve farmakologii (Metry et al. 2021; Mubeen a Noor 2009).



Obr. 2: Strukturní vzorec metforminu

Metformin je perorální antidiabetikum určené k léčbě především diabetu mellitus 2. typu. Společně se sloučeninami fenformin a buformin je řazen do skupiny tzv. biguanidů (Alshishani et al. 2018). Jejich základ je tvořen biguanidem neboli amidinoguanidinem, kde jsou dvě molekuly guanidinu spojeny společným atomem dusíku. Látky z této třídy nachází široké uplatnění jako reakční katalyzátory, organické silné báze, ligandy pro komplexaci kovů a jsou též hojně využívány pro jejich biologickou aktivitu (Grytsai et al. 2021). Nicméně jako medikament je využíván výhradně metformin vzhledem k nežádoucím vedlejším účinkům s rizikem laktátové acidózy ostatních léčiv. Metformin působí v hepatocytech, inhibuje produkci glukózy a zároveň zvyšuje senzitivitu tělesných tkání na inzulin, v důsledku čehož se hladina glukózy v krvi sníží. Tento lék je dlouhodobě předepisován zejména pacientům s nadváhou, při jeho užívání nedochází k hypoglykémii. Zkoumány jsou též protirakovinné účinky této látky. V lidském organismu není metabolizován a je vyloučen močí nezměněn (Alshishani et al. 2018). Vzhledem k velkému počtu lidí s diabetem 2. typu a tedy k hojnému a globálnímu užívání metforminu je třeba na tento lék nahlížet i jako na potencionální organický polutant životního prostředí (Kosma et al. 2015).



#### 4.4 Stanovení metforminu pomocí HPLC s UV detekcí

Pro vývoj a optimalizaci metody ke stanovení metforminu ve vodném roztoku pomocí HPLC s UV detekcí bylo zapotřebí seznámit se s dřívějšími publikacemi na toto téma a přehledně zpracovat souhrn vyvinutých metod pro analýzu.

Analýza metforminu je prováděna zejména pomocí metody RP-HPLC, tedy vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi, se spektrofotometrickou detekcí za izokratické eluce. Mezi optimalizované parametry v publikacích patří výběr kolony a stacionární fáze, objem nástřiku vzorku, složení a průtok mobilní fáze, teplota kolonového prostoru a vlnová délka detekce. Tyto metody byly obvykle vyvinuty nejen pro analýzu metforminu, ale současně také pro stanovení látek s podobným antidiabetickým účinkem, např. gliclazidem, miglitolem a benfotiaminem.

V Tab. 2 je uveden souhrn parametrů dosud publikovaných analytických podmínek pro stanovení metforminu pomocí kapalinové chromatografie s využitím UV detekce. V publikacích (Kumari a Bandhakavi 2020; Snow 2019; Dayyih et al. 2018; Prameela et al. 2018; Izzaty et al. 2014) byla použita kolona C18 lišící se druhem výrobce a případně délkou kolony. Dále byly používány kolony HILIC (Merck 2021), Alltima CN (Gedawy et al. 2019) a Luna SCX (Trass a Orłowicz 2016). Příprava zásobních a pracovních roztoků standardů se vždy odvíjela od složení použité mobilní fáze. Objem nástřiku vzorku byl v rozsahu 2 - 40  $\mu$ l. Pro kolony C18 byla MFA vždy fosfátový pufr s odlišnou úpravou pH v jednotlivých metodách. MFB byl acetonitril s výjimkou publikace (Izzaty et al. 2014), která uvádí jako MFB methanol. V (Dayyih et al. 2018) byla použita voda jako třetí mobilní fáze (MFC). Při analýze pomocí kolony Alltima CN a HILIC byla MFA mravenčanový pufr a MFB acetonitril (Gedawy et al. 2019; Merck 2021). Mobilní fází na koloně Luna SCX byl opět fosfátový pufr (Trass a Orłowicz 2016). Podrobnější údaje o složení mobilních fází jsou uvedeny v Tab. 2. Průtok MF byl obvykle roven 1 ml/min, pouze (Trass a Orłowicz 2016) uvádí vyšší hodnotu 2 ml/min. Teplota kolonového prostoru byla laboratorní nebo 30 °C v případě analýz (Prameela et al. 2018; Kumari a Bandhakavi 2020). Vlnová délka detekce se v jednotlivých publikacích pohybovala v rozsahu 218 – 254 nm.

Tab. 2: Souhrn optimalizovaných podmínek HPLC analýzy metforminu dle uvedených publikací

<b>Kolona</b>	<b>Rozměry kolony</b>	<b>MF</b>	<b>Teplota (kolona) [°C]</b>	<b>Vlnová délka [nm]</b>	<b>Citace</b>
Kromasil C18	150×4,6 mm; 5 μm	fosfátový pufr (pH 2,7) /ACN (65:35)	30 ± 2	224	(Kumari a Bandhakavi 2020)
Kinetex C18	250×4,6 mm; 5 μm	fosfátový pufr (pH 3) /ACN (19:1)	okolí	230	(Snow 2019)
Xterra C18	250×4,6 mm; 5 μm	fosfátový pufr (pH 6) /ACN /voda (20:65:15)	okolí	239	(Dayyih et al. 2018)
Hypersil C18	250×4,6 mm; 5 μm	0,100 mol/l fosfátový pufr (pH 3) /ACN (80:20)	30	254	(Prameela et al. 2018)
Phenomenex ODS C18	250×4,6 mm; 5 μm	fosfátový pufr (pH4) /methanol (50:50)	-	235	(Izzaty et al. 2014)
Alltima CN	250×4,6 mm; 5 μm	mravenčanový pufr (pH 3,5) /ACN (45:55)	25	227	(Gedawy et al. 2019)
Luna SCX	150×4,6 mm; 5 μm	0,114 mol/l fosfátový pufr (pH 3)	okolí	218	(Trass a Orłowicz 2016)
HILIC	50×3 mm; 2,7 μm	0,0100 mol/l mravenčanový pufr / ACN (5:95)	25	-	(Merc 2021)

## 5 Materiály a metody

### 5.1 Použité chemikálie

- Metformin hydrochlorid – standard (Sigma-Aldrich)
- Směsný standard PAU MIX-9 (Dr. Ehrenstorfer) obsahující 16 PAU dle US EPA
- 9,10-difenylantracen (Sigma-Aldrich)
- Mravenčan amonný – čistota LC-MS  $\geq 99,0\%$  (Sigma-Aldrich)
- Dihydrogenfosforečnan sodný – čistota 99% (Fluka)
- Octan amonný  $\geq 99,0\%$  p.a. (Fluka)
- Kyselina ortho-fosforečná – 85% p.a. (Sigma-Aldrich)
- Kyselina octová – 100% p.a. (Sigma-Aldrich)
- Acetonitril-HPLC Super Gradient (Avantor Performance Materials)
- Hexan  $\geq 98,0\%$  (Sigma-Aldrich)
- Aceton  $\geq 99,8\%$  (Sigma-Aldrich)
- Isopropylalkohol p.a. (Lach-Ner)
- Diethylenglykol  $\geq 99,0\%$  p.a. (Sigma-Aldrich)
- Deionizovaná voda

### 5.2 Instrumentální vybavení a spotřební materiál

- Kapalinový chromatograf s UV a FLD detekcí (Dionex UltiMate 3000, Thermo Scientific)
- Analytické váhy (Mettler Toledo)
- Chromatografická kolona PAU C18; délka 250 mm; vnitřní průměr 3 mm; velikost částic 5,0  $\mu\text{m}$  (Waters)
- Chromatografická kolona Kinetex-HILIC; délka 150 mm; vnitřní průměr 3 mm; velikost částic 2,6  $\mu\text{m}$  (Phenomenex)
- Chromatografická kolona Kinetex EVO C18 100 Å; délka 150 mm; vnitřní průměr 3 mm; velikost částic 5,0  $\mu\text{m}$  (Phenomenex)
- Chromatografická kolona Luna SCX; délka 150 mm; vnitřní průměr 3 mm; velikost částic 5,0  $\mu\text{m}$  (Phenomenex)
- Výrobník deionizované vody (Smart2Pure 6 UV/UF, Thermo)
- Vakuová odparka (IKA RV 10)

- Lednice pro laboratorní vzorky s mrazákem (- 20 °C) (Liebherr)
- Blok pro odpařování vzorků (Stuart)
- Generátor dusíku (Genius 1022, PeakScientific)
- Ultrazvuková lázeň (VWR)
- Orbitální třepačka (Orbit1000, Labnet International)
- pH elektroda (ED s.r.o.)
- pH metr (GRYF 107)
- Centrifuga (Sigma)
- Automatická dávkovací pipeta: BioPettePLUS o objemu 20 – 200 µl (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta: BioPettePLUS o objemu 100 – 1000 µl (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta: Transferette o objemu 1 – 10 ml (Brand)
- Odměrné sklo: třída přesnosti A (FischerBrand)
- Laboratorní sklo
- Krimpovací kleště, pinzeta
- Skleněné dávkovací stříkačky o objemu 5, 10, 25, 50, 100, 250 a 500 µl (Hamilton)
- Spotřební materiál: plastové špičky, krimpovací vialky z čírého skla s hliníkovým uzávěrem s pryžovým septem, centrifugační zkumavky, hliníková fólie
- Zpracování výsledků bylo provedeno v programu Microsoft Excel 2019 (Microsoft).
- Pro ovládání kapalinového chromatografu a zpracování chromatogramů byl použit program Chromeleon 7.2.

## **5.3 Příprava roztoků, postup extrakce nedopalků a podmínky chromatografické separace pro stanovení PAU**

### **5.3.1 Příprava mobilní fáze**

Mobilní fáze (50 % ACN) byla připravena smícháním acetonitrilu a deionizované vody v poměru 1:1 do laboratorní skleněné láhve o objemu 1000 ml.

### **5.3.2 Příprava zásobních a pracovních roztoků ST a VS**

V průběhu práce byly připraveny roztoky čtyř různých koncentrací VS ze zásobní látky a tři různých koncentrací ST. Jako rozpouštědlo byl vždy použit 50 % ACN.

Zásobní roztok vnitřního standardu (9,10-difenylntracenu) VS\_B o koncentraci 5000 µg/l byl připraven smícháním 2,5 ml roztoku VS\_A o koncentraci 50,0 mg/l a doplněním rozpouštědla po rysku do 25 ml odměrné baňky.

Pracovní roztok VS\_C o koncentraci 1000 µg/l byl připraven smícháním 1 ml zásobního roztoku VS a rozpouštědla do 5 ml odměrné baňky.

Dále byl připraven pracovní roztok VS\_D o koncentraci 100 µg/l. Do 50 ml odměrné baňky byl odměřen 1 ml zásobního roztoku VS a následně byla baňka doplněna rozpouštědlem.

Pracovní roztok VS\_E o koncentraci 2000 µg/l byl připraven smícháním 2 ml zásobního roztoku VS a rozpouštědla do 5 ml odměrné baňky.

Zásobní roztok standardu ST\_B o koncentraci 1000 µg/ml byl připraven odměřením 0,1 ml ST\_A o koncentraci 100 mg/l a doplněním rozpouštědla po rysku 10 ml odměrné baňky.

Pracovní roztok ST\_C o koncentraci 20 µg/l byl připraven smícháním 0,2 ml ST\_B a doplněním rozpouštědla po rysku 10 ml odměrné baňky.

Dále byl připraven roztok ST\_D o koncentraci 500 µg/l. Do 2 ml odměrné baňky byl odměřen 1 ml roztoku ST\_B a poté byla baňka doplněna rozpouštědlem.

### **5.3.3 Příprava kalibračních roztoků**

V Tab. 3 je uvedena příprava kalibračních roztoků. Kalibrační roztoky byly připraveny pro každou koncentrační úroveň ve třech opakováních. Pro odměření objemů MF do skleněných vialek byla použita automatická dávkovací pipeta. Dále byly přidány jednotlivé objemy VS a ST pomocí skleněných dávkovacích stříkaček (Hamilton). Pro koncentrační

úroveň 1 – 8 byl použit roztok ST\_C a pro koncentrační úroveň 9 – 12 roztok ST\_B. Jako vnitřní standard byl použit roztok VS\_D o koncentraci 100 µg/l.

Tab. 3: Příprava kalibračních roztoků

Koncentrační úroveň	Objem ST	Objem VS_D	Objem MF	Celkový objem	Koncentrace
	[µl]	[µl]	[µl]	[µl]	[µg/l]
1	5	100	895	1000	0,100
2	10		890		0,200
3	25		875		0,500
4	50		850		1,00
5	100		800		2,00
6	175		725		3,50
7	250		650		5,00
8	500		400		10,0
9	50		850		50,0
10	100		800		100
11	250		650		250
12	500		400		500

### 5.3.4 Příprava roztoků pro extrakce

Extrakční rozpouštědlo bylo připraveno smícháním hexanu a acetonu v poměru 1:1 do laboratorní skleněné láhve o objemu 1000 ml.

Keeper byl připraven smícháním isopropanolu a diethylenglykolu v poměru 4:1 do 10 ml odměrné baňky.

### 5.3.5 Sběr a uchování vzorků

Odběr vzorků proběhl v areálu Jihočeské Univerzity, PŘF. Čerstvě vykouřené nedopalky byly odebírány pravidelně v průběhu dne, po odběru byly umístěny do hliníkové fólie a následně uloženy do laboratorní mrazničky při nastavené teplotě na -20 °C. Celkem bylo odebráno 20 vzorků v zastoupení čtyř různých značek cigaret. Konkrétně se jedná o značky LM, LD, Marlboro a balený druh.

Pro srovnání byly připraveny rovněž tzv. čisté nedopalky odštížením z nepoužitých cigaret značky LD.

### 5.3.6 Postup extrakce nedopalků

Extrakce probíhaly dle postupu zavedeného a validovaného v laboratoři analytické chemie (KCH, PŘF) dle publikace (Primbs et al. 2008). Vzorek filtru byl vždy nejprve zvážen na analytických vahách a vložen do Erlenmayerovy baňky. Následně bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku VS\_C, 10 ml extrakčního rozpouštědla a uzavřená baňka byla vložena do ultrazvukové lázně na 10 min. Poté byl první podíl odlit do srdcové baňky o objemu 25 ml. Do Erlenmayerovy baňky s nedopalkem bylo znova přidáno 10 ml extrakčního rozpouštědla a opět byla vložena na 10 min do ultrazvukové lázně. Následně byl druhý podíl přilít do srdcové baňky k prvnímu podílu. Do roztoku extraktu bylo přidáno 0,5 ml keeperu a bylo provedeno odpařování při 300 mBar, teplotě 40 °C, 100 rpm po dobu až zbylo přibližně 0,2 ml extraktu. K extraktu byl přidán 1 ml MF (50 % ACN), promíchaný roztok byl převeden do centrifugační zkumavky a následně proběhla centrifugace při 25000 rpm. Po odstředění byl eluát odpipetován do vialky a uzavřen krimpovacím víčkem.

Nepoužité neboli čisté nedopalky byly extrahovány obdobně, ale ke třem vzorkům bylo navíc přidáno 100  $\mu$ l roztoku ST\_D.

### 5.3.7 Podmínky chromatografické separace PAU

Analýza roztoků standardů a vzorků s obsahem PAU probíhala pomocí RP-HPLC s FLD a UV/VIS detekcí za gradientové eluce. Použitou chromatografickou kolonou byla PAU C18, MFA byl 50 % ACN a MFB byl zásobní roztok ACN (Pilík 2018). Podmínky separace jsou uvedeny v Tab. 4. Tato metoda byla následně optimalizována viz kapitola 5.5.1.

Tab. 4: Podmínky chromatografické separace PAU

Parametr separace	Hodnota	
Velikost nástřiku pro kalibrační roztoky	90 $\mu$ l	
Velikost nástřiku pro reálné vzorky	10, resp. 15 $\mu$ l	
Průtok MF	1 ml/min	
Teplota kolonového prostoru	35 °C	
Gradientový program	Čas [min]	Zastoupení MFB [%]
	0 – 2,5	0
	2,5 – 10	0 $\rightarrow$ 100
	10 – 14	100
	14 – 15	100 $\rightarrow$ 0
	15 – 20	0

## **5.4 Příprava roztoků – vývoj metody pro metformin**

### **5.4.1 Příprava mobilních fází**

Roztok mravenčanu amonného (MFA-1) o koncentraci 0,0100 mol/l byl připraven do 100 ml odměrné baňky rozpuštěním 0,06315 g této látky v deionizované vodě.

Roztok dihydrogenfosforečnanu sodného (MFA-2) o koncentraci 0,0150 mol/l byl připraven do 250 ml odměrné baňky rozpuštěním 0,4548 g této látky v deionizované vodě. Následně bylo pH této mobilní fáze upraveno roztokem kyseliny fosforečné na přibližnou hodnotu pH 3.

Při vývoji metody byl jako MFB použit acetonitril.

### **5.4.2 Příprava zásobního a pracovních roztoků standardu**

Zásobní roztok standardu metformin hydrochloridu byl připraven navážením 6,380 mg látky, rozpuštěním v deionizované vodě a kvantitativním převedením do 5 ml odměrné baňky. Výsledná koncentrace zásobního roztoku činila 1,28 mg/ml.

Pracovní roztok M1 metformin hydrochloridu o koncentraci 0,0500 mg/ml byl připraven odpipetováním 196  $\mu$ l zásobního roztoku do 5 ml odměrné baňky a doplněním objemu ACN po rysku.

Pracovní roztok M2 metformin hydrochloridu byl připraven odpipetováním 196  $\mu$ l zásobního roztoku do 5 ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku baňky. Koncentrace roztoku standardu činila také 0,0500 mg/ml.



## 5.5 Výsledky a diskuse

První část kapitoly výsledky a diskuse se zabývá optimalizací a validací zavedené analytické metody pro stanovením polycyklických aromatických uhlovodíků v cigaretových nedopalcích. Optimalizovaná metoda byla následně využita ke stanovení PAU v čerstvých cigaretových nedopalcích. Druhá část práce je věnována vývoji a optimalizaci metody ke stanovení metforminu ve vodném roztoku.

### 5.5.1 Optimalizace metody extrakce a stanovení PAU

Pro analýzu PAU v nedopalcích cigaret bylo zapotřebí optimalizovat podmínky extrakce a detekce. Pro extrakci čerstvých nedopalků byla modifikována již zavedená a validovaná metoda původně určená pro stanovení PAU z filtrů vzduchu na atmosférické věži. Byla provedena optimalizace koncentrace VS použitého při extrakci, objemu nástřiku vzorku a citlivosti fotonásobiče FLD detekce. V původní metodě byl použit roztok VS o koncentraci 100 µg/l. Pro účely této metody byly vyzkoušeny dvě vyšší koncentrace VS (1000 a 2000 µg/l). K analýzám byl vybrán roztok VS\_C o koncentraci 1000 µg/l. Pro tuto koncentraci byly píky VS v chromatogramu dostatečně intenzivní a zároveň se svou intenzitou významně nelišily od nejintenzivnějších píků stanovovaných látek. Mezi reálnými vzorky je značná variabilita v zastoupení jednotlivých PAU. Z tohoto důvodu bylo cílem optimalizace vyvinout metodu tak, aby při 1, resp. 2 různých velikostech nástřiku bylo možné analyzovat vzorek s přijatelnou hodnotou podílu signálu k šumu a intenzitou jednotlivých analytů v extraktech z různých druhů cigaret. Objem nástřiku vzorku byl pro reálné vzorky optimalizován na 10, resp. 15 µl. Čisté nedopalky, nedopalky značky LD a LM byly analyzovány při velikosti nástřiku 15 µl. Nedopalky balených cigaret a značky Marlboro byly analyzovány při objemu nástřiku vzorku 10 µl, protože při vyšším objemu byly píky některých analytů tzv. uřezané.

Současně byla optimalizována citlivost fotonásobiče FLD detekce pro jednotlivé analyty. Bylo potřeba nalézt takové podmínky, při kterých se bude saturace detektoru pohybovat v rozmezí 30 – 70%. V Tab. 5 je uvedeno porovnání hodnot citlivostí fotonásobiče původní metody a metody optimalizované.

Největší rozdíl v nastavených hodnotách oproti původní metodě byl u PAU s nižší molekulovou hmotností. Ve vzorcích dosahovaly vyšších koncentrací, a proto bylo zapotřebí nastavit nižší citlivost fotonásobiče. S nově nastavenými hodnotami citlivosti byla analyzována kalibrace ve třech nezávislých opakováních, 4 druhy cigaretových nedopalků po třech vzorcích a čisté nedopalky ve třech opakováních.

Tab. 5: Optimalizace citlivosti fotonásobiče FLD detekce

Analyt	Původní metoda	Optimalizovaná metoda	Analyt	Původní metoda	Optimalizovaná metoda
NA	6	1	BA	5	6
AY	4	2	CH	3	3
AE	4	2	BbF	7	6
FR	8	5	BkF	3	6
FE	3	3	BaP	4	6
AN	8	6	DA	6	6
FL	6	5	BP	8	7
PR	5	6	IP	8	7

### 5.5.2 Validace metody pro stanovení PAU

Po optimalizaci analytické metody, tedy změně nastavení citlivosti fotonásobiče fluorescenčního detektoru, byla provedena validace analytické metody. Byly připraveny kalibrační roztoky ve třech nezávislých opakováních v koncentračním rozsahu 0,100 – 500 µg/l, nástřik vzorku k analýze byl 90 µl. Příprava kalibračních roztoků je uvedena v kapitole 5.3.3. Hodnocenými validačními parametry byla linearita, správnost, přesnost, mez stanovitelnosti a rozsah. Pro výpočty a vyhodnocení dat byl použit program MS Excel a Chromeleon.

#### Linearita

Linearitu lze definovat jako schopnost metody poskytnout v daném rozsahu přijatelnou lineární korelaci mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu. Lineární závislost odezvy detektoru na koncentraci analytu lze vyjádřit rovnicí kalibrační křivky. Tento vztah definuje rovnice (1), kde  $y$  značí odezvu detektoru,  $c$  udává koncentraci analytu,  $a$  je směrnice kalibrační křivky,  $q$  udává úsek na ose  $y$  (intercept) (Kahoun 2020).

$$y = a \times c + q \quad (1)$$

Vypočtené hodnoty kalibračních přímk, směrnic a interceptu pro řadu kalibračních roztoků jsou uvedeny v příloze A. Hodnocení linearit kalibrační závislosti bylo provedeno na základě hodnot korelačního koeficientu ( $R$ ) a QC koeficientu. Vypočtené hodnoty byly uznány jako vyhovující po porovnání s kritérii přijatelnosti, které jsou  $R \geq 0,9900$  a  $QC \leq 5,00\%$ . V Tab. 6 jsou uvedeny hodnoty korelačních koeficientů a QC koeficientů pro jednotlivé analyty. Pro všechny analyty byla splněna požadovaná kritéria.

Tab. 6: Korelační koeficienty a QC koeficienty analytů

Analyt	Korelační koeficient [1]	QC koeficient [%]	Analyt	Korelační koeficient [1]	QC koeficient [%]
NA	0,99996	1,30	BA	0,99997	0,878
AY	0,99998	0,963	CH	0,99996	0,924
AE	0,99998	1,12	BbF	0,99997	0,922
FR	0,99998	1,08	BkF	0,99989	1,33
FE	0,99999	0,766	BaP	0,99995	1,00
AN	0,99997	0,908	DA	0,99997	0,838
FL	0,99996	1,10	BP	0,99996	1,05
PR	0,99997	0,973	IP	0,99980	2,40

### Správnost a přesnost

Jako další parametry pro validaci byly vyhodnoceny správnost a přesnost. Správnost vyjádřená jako výtěžnost (Re) byla vypočítána z podílu experimentálně zjištěné koncentrace analytu a referenční hodnoty koncentrace analytu ve vzorku. Hodnota (Re) se uvádí v procentech jako průměr výtěžností pro jednotlivá opakování. Výsledné hodnoty byly porovnány s kritérii přijatelnosti pro jednotlivé koncentrační úrovně. Rozmezí koncentrací 0,100 – 5,00; 10,0 – 50,0; 100 – 500 µg/l odpovídají intervaly kritérií přijatelnosti 40 – 120; 60 – 112; 80 – 110 % dle (Association of Analytical Communities. Official Methods of Analysis 2016; Kahoun 2020). V příloze B jsou uvedeny konkrétní hodnoty pro řadu kalibračních roztoků. U indeno[1,2,3-c,d]pyrenu (IP) při koncentraci 0,100 µg/l byla hodnota Re 164 % a tudíž nesplňovala kritérium přijatelnosti 40 – 120 %. Proto tato koncentrační úroveň nebyla zahrnuta do koncentračního rozsahu daného analytu. S výjimkou IP se všechny hodnoty analytů nacházely v intervalu kritéria přijatelnosti.

Přesnost byla vyjádřena jako opakovatelnost metody, která představuje těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky analýz referenčního vzorku získanými za podmínek opakovatelnosti (Nováková et al. 2021). Pro vyhodnocení přesnosti byla použita hodnota vypočtené relativní směrodatné odchylky (RSD). Dle kritérií přijatelnosti platí pro koncentrace 0,100 – 5,00 µg/l  $\leq 30\%$ , pro 10,0 – 50,0 µg/l  $\leq 21\%$  a pro 100 – 500 µg/l  $\leq 15\%$ . Vypočtené hodnoty RSD pro zmíněné koncentrační úrovně se pohybují v intervalech 0 – 25 %, 0 – 1 % a 0 – 1 %. Procentuální hodnoty RSD pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v příloze C. Všechny hodnoty splňují kritéria přijatelnosti.

## Rozsah

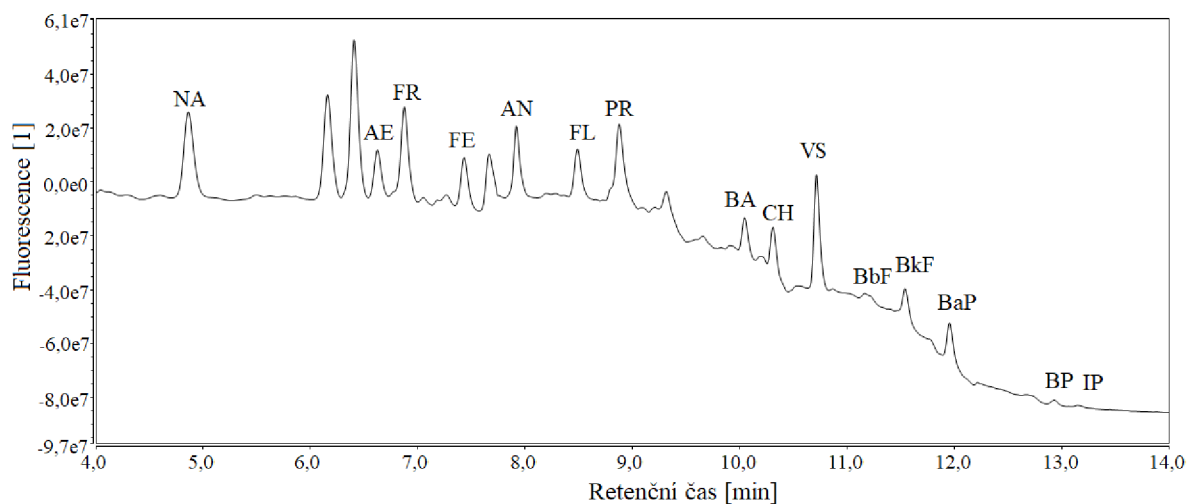
Kalibrační řada roztoků zahrnuje 12 koncentračních úrovní v rozmezí 0,100 – 500 µg/l. Na základě vyhodnocení linearity, správnosti, přesnosti a meze stanovitelnosti byl pro každý analyt určen pracovní rozsah. Mez stanovitelnosti byla hodnocena na základě podílu signálu a šumu (S/N), pro který platí kritérium přijatelnosti  $(S/N) \geq 10$  (Kahoun 2020). Rozsahy pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v Tab. 7. V intervalu pracovního rozsahu je metoda aplikovatelná s přijatelnou nejistotou měření.

Tab. 7: Pracovní rozsah analytů

Analyt	Koncentrační rozsah [µg/l]	Analyt	Koncentrační rozsah [µg/l]
NA	1,00 – 500	BA	0,100 – 10,0
AY	2,00 – 500	CH	0,100 – 10,0
AE	0,100 – 50,0	BbF	0,100 – 10,0
FR	0,200 – 50,0	BkF	0,100 – 2,00
FE	0,200 – 50,0	BaP	0,100 – 5,00
AN	0,100 – 10,0	DA	0,100 – 10,0
FL	0,100 – 10,0	BP	0,100 – 10,0
PR	0,100 – 10,0	IP	0,200 – 10,0

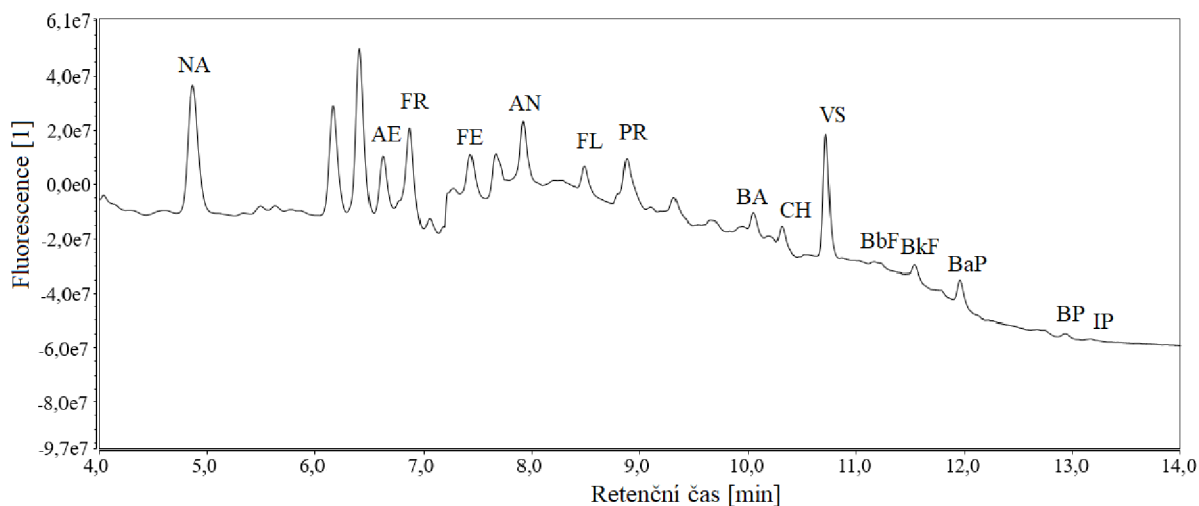
### 5.5.3 Stanovení koncentrace PAU ve vzorcích nedopalků

Po optimalizaci a validaci byla metoda využita pro analýzu reálných vzorků cigaretových nedopalků. Výsledný chromatogram analýzy extraktu PAU z cigaretového nedopalku značky LD je znázorněn na Obr. 3.



Obr. 3: Chromatogram cigaretového nedopalku LD (Vz\_6)

Na Obr. 4 je znázorněn chromatogram analýzy extraktu PAU z nedopalku značky LM.



Obr. 4: Chromatogram cigaretového nedopalku LM (Vz\_14)

V chromatogramech jsou znázorněny jednotlivé analyty detekované FLD detekcí a dále byl sledován AY, který byl detekován pomocí UV/VIS detekce. Analyt DA není označen, protože jeho poměr (S/N) byl menší než 3, tedy pod mezí detekce. Hodnota (S/N) pro IP se nacházela nad mezí detekce, ale stále pod mezí stanovitelnosti.

Po provedení analýz reálných vzorků byly z výsledných hodnot v MS Excel vypočítány obsahy analytů v nedopalku v jednotkách  $\mu\text{g/g}$ . Tyto hodnoty jsou uvedeny v Tab. 8. Výsledný obsah analytů na nedopalek [ $\mu\text{g/g}$ ] byl vypočítán podílem obsahu analytů v nedopalku [ $\mu\text{g}/\text{nedopalek}$ ] a hmotností odpovídajícího nedopalku. Hmotností nedopalků před extrakcí jsou uvedeny v příloze D. Hodnota obsahu analytů v nedopalku [ $\mu\text{g}/\text{nedopalek}$ ] byla získána pomocí relativního obsahu analytu neboli podílu hmotnosti analytu a hmotnosti VS, který byl vynásoben hmotností VS přidané do extrakční směsi na začátku extrakce vzorků. Relativní obsah analytů byl vypočten pomocí rovnice kalibrační křivky získané na základě vyhodnocení analýz vlastních kalibračních roztoků (viz příloha A).

Obsahy analytů v nedopalcích se pohybovaly v odlišných hodnotách zejména u vzorků různých druhů cigaret. Suma PAU naměřených v nedopalcích se pohybuje v rozsahu 6,07 – 46,9  $\mu\text{g/g}$ . Tento výsledek je srovnatelný s hodnotami 14,4 – 35,9  $\mu\text{g/g}$  naměřenými v publikaci (Dobaradaran et al. 2019), která se zabývá porovnáním zastoupení obsahů 16 PAU v čerstvých nedopalcích a v nedopalcích shromážděných z městských ulic a okolí vodstva. Výsledek je též srovnatelný s celkovou hodnotou obsahu PAU 0,39  $\mu\text{g/g}$ , která byla naměřena v jednom vzorku cigaretového nedopalku na území Japonska (Moriwaki et al. 2009).

Analýza čistých nedopalků jednoznačně prokázala, že PAU vznikají v podstatné míře až v průběhu hoření tabáku. Hodnoty celkových obsahů PAU pro čisté nedopalky byly 0,577; 0,351 a 0,503  $\mu\text{g/g}$ , tedy o jeden až dva řády nižší než u čerstvých nedopalků.

Nejvyšší celkové množství PAU obsahují dle Tab. 8 nedopalky cigaret od značky Marlboro s obsahy 27,6; 41,0 a 46,9  $\mu\text{g/g}$  a nedopalky balených cigaret s obsahy 31,2; 38,1 a 40,7  $\mu\text{g/g}$ . Pro nedopalky značky LD a LM jsou celkové obsahy 16 PAU rovny 13,5; 18,1; 18,2  $\mu\text{g/g}$  a 6,07; 6,62 a 20,2  $\mu\text{g/g}$ .

V Tab. 9 jsou uvedeny procentuální zastoupení jednotlivých PAU ve vzorcích, které byly sestupně seřazeny podle jejich obsahů. Nejvyššího zastoupení dosahovaly analyty NA, FR, FE, AE a AY s hodnotami 63,6; 12,0; 7,36; 4,80 a 3,30 %. Tyto analyty patří mezi PAU s nízkou molekulární hmotností. Analyt AY byl stanoven pouze ve vzorcích nedopalků značky Marlboro, pro ostatní extrakty nebyl detekován. PAU s vysokou molekulární hmotností, např. BA, BaP, BkF, BbF a BP, tvořily dohromady z celku přibližně 1 %. Tedy podstatně menší část než nízkomolekulární PAU. Tyto výsledky se částečně shodují s výzkumem ve studii (Dobaradaran et al. 2019), v které nejvyššího zastoupení dosahují analyty NA, DA, IP, AE a FR. Příčinou rozdílných hodnot může být odlišný postup extrakce nedopalků a následné analýzy extraktů.

Mezi získanými hodnotami pro vzorky jednoho druhu cigaret je také určitá variabilita. Např. u nedopalků LM je značně odlišný obsah sumy i jednotlivých PAU mezi vzorky. Vz\_15 a Vz\_13 dosahují přibližně stejných hodnot, ale Vz\_14 má více než dvojnásobně vyšší zastoupení PAU. Nicméně přes rozdílnost hodnot obsahů jsou procentuální zastoupení PAU u všech tří vzorků velmi podobné. Příčinou ztráty PAU u Vz\_13 a Vz\_15 může být vyprchání analytů do okolí před sběrem vzorků. Ovšem v tomto případě by ke ztrátě PAU nedošlo rovnoměrně, protože PAU s nižší molekulovou hmotností jsou více těkavé a rozpustné ve vodě, což by se odrazilo na procentuálním zastoupení zejména NA (Abdel-Shafy a Mansour 2016). K získání informací o variabilitě obsahu PAU v nedopalcích cigaret stejné značky je třeba provést měření s větším počtem vzorků.

Součástí dosavadní práce bylo ověření výtěžnosti extrakce přidáním roztoku standardu do směsi extrakčního činidla s čistým nedopalkem. Dosavadní výsledky pro koncentrační hladinu 0,05  $\mu\text{g/g}$  dosahovaly vyšších hodnot výtěžností, v rozsahu 117 – 143 %. Této části práce je třeba se dále věnovat, ověřit výtěžnost na více koncentračních úrovních a s větším počtem opakování. V další fázi výzkumu je v plánu provést větší počet extrakcí čerstvých cigaretových nedopalků, následně jejich porovnání s dosud získanými daty a prověřit tak míru variability výsledků. Je rovněž důležité zvolit

vhodné statistické zpracování získaných dat. Následně bude proveden experiment s nedopalky exponovanými venkovními podmínkám (déšť, vzduch atd.) na půdě. Bude provedena extrakce PAU z nedopalků po delší venkovní expozici (2 – 3 měsíce) a rovněž extrakce PAU z půdy. Získané výsledky budou porovnány s obsahem PAU v půdě, na které nebyly umístěny cigaretové nedopalky po dobu venkovní expozice. Rovněž bude porovnán obsah PAU v nedopalcích po expozici s obsahem PAU v čerstvých nedopalcích. Modelový experiment s vnější expozicí byl již proveden za účelem získání zkušeností v rámci bakalářské práce. Získaná data a informace jsou v současné době zpracovávány.

Tab. 8: Obsahy analytů v nedopalcích [ $\mu\text{g/g}$ ]

Vzorek	NA	AY	AE	FR	FE	AN	FL	PR	BA	CH	BbF	BkF	BaP	DA	BP	IP	suma
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
Vz_1 čistý	-	-	0,00799	0,0206	0,188	0,0321	0,126	0,117	0,0209	0,0210	0,0163	0,00471	0,0109	0,00322	0,00721	-	0,577
Vz_2 čistý	-	-	0,00352	0,0100	0,0967	0,0189	0,0756	0,0717	0,0154	0,0197	0,0168	0,00476	0,0110	-	0,00663	-	0,351
Vz_3 čistý	-	-	0,0105	0,0199	0,151	0,0259	0,0970	0,0943	0,0230	0,0258	0,0253	0,00763	0,0155	-	0,00759	-	0,503
Vz_4 LD	10,5	-	0,861	1,96	1,34	0,342	0,397	0,408	0,0613	0,0863	0,0482	0,0166	0,0308	-	-	-	18,1
Vz_5 LD	8,34	-	0,621	1,45	1,11	0,314	0,4260	0,421	0,0519	0,0820	-	0,0209	0,0358	-	-	-	13,5
Vz_6 LD	9,93	-	0,702	1,81	1,45	0,388	0,578	0,724	0,0946	0,119	0,0773	0,0376	0,0606	-	0,0313	-	18,2
Vz_7 balená	14,9	-	1,42	3,92	2,40	0,909	0,785	1,27	0,128	0,172	0,0606	0,0695	0,110	-	0,0769	-	31,2
Vz_8 balená	20,1	-	1,77	5,12	2,74	0,813	0,819	1,22	0,112	0,198	0,111	0,0457	0,0736	-	-	-	38,1
Vz_9 balená	21,1	-	1,81	5,03	3,01	0,829	0,914	1,29	0,148	0,211	0,0880	0,0648	0,103	-	0,0704	-	40,7
Vz_10 Marlboro	23,3	5,56	2,07	5,17	2,94	0,840	0,681	-	0,0873	0,122	0,0491	0,0369	0,0594	-	0,0435	-	41,0
Vz_11 Marlboro	25,6	6,93	2,36	6,35	3,37	0,993	0,980	-	0,104	0,130	-	0,0353	0,0569	-	-	-	46,9
Vz_12 Marlboro	16,0	3,40	1,40	3,40	1,70	0,527	0,426	0,578	0,0591	0,089	-	0,0214	0,0356	-	-	-	27,6
Vz_13 LM	5,21	-	0,252	0,457	0,303	0,0785	0,106	0,158	0,0124	0,018	-	0,00497	0,0101	-	-	-	6,62
Vz_14 LM	14,9	-	0,879	1,88	1,23	0,347	0,286	0,471	0,0654	0,080	0,0397	0,0228	0,0380	-	0,0310	-	20,2
Vz_15 LM	4,43	-	0,241	0,640	0,326	0,0892	0,123	0,157	0,0148	0,017	0,00419	0,00620	0,0119	-	0,0127	-	6,07

V tab. 8 jsou uvedeny hodnoty pouze pro PAU s hodnotou  $(S/N) \geq 10$



Tab. 9: Procentuální zastoupení analytů ve vzorcích

Vzorek	NA	AY	AE	FR	FE	AN	FL	PR	BA	CH	BbF	BkF	BaP	DA	BP	IP
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Vz_4 LD	66,5	-	5,35	12,2	8,35	2,12	2,47	2,54	0,381	0,536	0,299	0,103	0,191	-	-	-
Vz_5 LD	64,8	-	4,83	11,2	8,61	2,44	3,31	3,27	0,403	0,638	-	0,162	0,278	-	-	-
Vz_6 LD	62,1	-	4,39	11,29	9,05	2,43	3,61	4,52	0,591	0,742	0,483	0,235	0,379	-	0,196	-
Vz_7 balená	56,8	-	5,44	15,0	9,17	3,47	3,00	4,83	0,480	0,657	0,231	0,265	0,419	-	0,294	-
Vz_8 balená	60,7	-	5,36	15,5	8,27	2,46	2,48	3,67	0,339	0,599	0,335	0,138	0,222	-	-	-
Vz_9 balená	60,9	-	5,22	14,5	8,66	2,39	2,64	3,71	0,428	0,608	0,254	0,187	0,297	-	0,203	-
Vz_10 Marlboro	55,8	13,3	4,95	12,4	7,03	2,01	1,63	1,90	0,209	0,293	0,118	0,0883	0,142	-	0,104	-
Vz_11 Marlboro	53,5	14,5	4,93	13,3	7,05	2,08	2,05	1,90	0,217	0,272	-	0,0738	0,119	-	-	-
Vz_12 Marlboro	57,9	12,3	5,06	12,3	6,15	1,91	1,54	2,10	0,214	0,322	-	0,0777	0,129	-	-	-
Vz_13 LM	78,8	-	3,80	6,91	4,58	1,19	1,60	2,40	0,187	0,273	-	0,0752	0,152	-	-	-
Vz_14 LM	73,5	-	4,34	9,27	6,06	1,72	1,41	2,33	0,323	0,396	0,196	0,112	0,188	-	0,153	-
Vz_15 LM	72,9	-	3,97	10,5	5,37	1,47	2,03	2,58	0,244	0,286	0,0691	0,102	0,196	-	0,208	-
Průměr	63,6	3,30	4,80	12,0	7,36	2,14	2,31	2,98	0,335	0,469	0,165	0,135	0,226	-	0,0965	-
Pořadí	1	5	4	2	3	8	7	6	10	9	13	12	11	15	14	15

#### 5.5.4 Optimalizace podmínek chromatografické separace metforminu

Na základě informací z literární rešerše ke stanovení metforminu byly v experimentální části bakalářské práce odzkoušeny tři chromatografické kolony, jejichž výběr byl uskutečněn dle publikací (Gedawy et al. 2019; Snow 2019; Trass a Orłowicz 2016; Kumari a Bandhakavi 2020; Dayyih et al. 2018b, Pameela et al. 2018, Izzaty et al. 2014; Merck 2021). Jednalo se o kolony: HILIC, Kinetex Evo C18 a Luna SCX. Byla použita metoda RP-HPLC za izokratické eluce se spektrofotometrickou detekcí. Mezi optimalizované parametry patřily typ stacionární fáze, objem nástřiku vzorku, složení a průtok mobilní fáze, teplota kolonového prostoru a vlnová délka detekce. Vlnová délka detekce byla nastavována na základě publikací a upravována podle změřeného absorpčního spektra při použitých podmínkách. Cílem optimalizace bylo získat intenzivní, symetrický pík standardu v chromatogramu v optimálním retenčním čase. Ideální hodnota faktoru symetrie píku se nachází v rozmezí 0,8 – 1,5. Optimální retenční čas analytu udává hodnota kapacitního poměru látky, který je určen poměrem látkového množství sloučeniny ve stacionární fázi k jejímu látkovému množství ve fázi mobilní. Optimální hodnota této veličiny se nachází v rozsahu 2 – 5. Tento vztah lze vyjádřit rovnicí (2), kde  $k$  značí kapacitní poměr [1],  $t_R$  je hodnota retenčního času [min] a  $t_M$  udává hodnotu mrtvého retenčního času [min] (Kahoun 2020).

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2)$$

První použitou kolonou k analýze byla kolona pro hydrofilní interakční chromatografii HILIC na základě (Merck 2021). Tato kolona je určená pro polární sloučeniny. MFA byl vodný roztok mravenčanu amonného o koncentraci 0,0100 mol/l a jako MFB byl použit acetonitril. Procentuální obsah MFB byl 95 %, resp. 50 %. Byla provedena zkušební analýza pracovního roztoku standardu M1 (roztok standardu v ACN). Objem nástřiku vzorku byl 5, resp. 20  $\mu$ l, průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, teplota kolonového prostoru 25 °C a nastavené vlnové délky UV detekce byly 218, 227 a 232 nm.

Analýzu při objemu nástřiku vzorku 20  $\mu$ l, procentuálním zastoupení 50 % MFB, průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min, teplotě kolonového prostoru 25 °C a vlnové délce detekce 232 nm by bylo možné aplikovat pro analýzu roztoku metforminu v acetonitrilu. Asymetrie píku dosahovala hodnoty 1,9, tedy mírně nad přijatelnou hodnotu tohoto faktoru. Retenční čas byl roven 4,73 min a kapacitní poměr 1,96.

Kolona HILIC byla použita i pro analýzu pracovního roztoku standardu M2 (roztok standardu ve vodě). MFA byl opět vodný roztok mravenčanu amonného o koncentraci

0,0100 mol/l a MFB byl acetonitril. Procentuální zastoupení MFB bylo optimalizováno v hodnotách 45 %, 50 % a 55 %. Průtok mobilní fáze byl vyzkoušen v hodnotách 0,50; 0,75; 1,0 ml/min, teplota kolonového prostoru byla 25, 30 a 35 °C, objem nástřiku vzorku byl 10, resp. 20 µl a nastavené vlnové délky UV detekce byly 218, 227, 232 nm.

Optimalizací podmínek nebylo dosaženo požadovaných výsledků. Pro získání symetrického píku je podstatné, aby bylo rozpouštědlo vzorku svým složením podobné složení mobilní fáze z hlediska poměru vodné a organické části. Vzhledem k použité stacionární fázi bylo zastoupení organické mobilní fáze vysoké a faktor symetrie nebyl v přijatelných hodnotách. Z tohoto důvodu není metoda vhodná ke stanovení standardu ve zcela vodném roztoku. Dalším negativem této metody z ekologických a také ekonomických důvodů je vysoký obsah ACN v mobilní fázi.

Dále byla na základě publikace (Snow 2019) vyzkoušena chromatografická kolona Kinetex Evo C18 pro analýzu vodného roztoku standardu (M2). MFA byl vodný roztok dihydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci 0,0150 mol/l a jako MFB byl použit acetonitril. Procentuální zastoupení MFB bylo optimalizováno v hodnotách 0; 5 a 15 %. Průtok mobilní fáze byl 0,75 ml/min, teplota kolonového prostoru byla nastavena na 25 °C, objem nástřiku vzorku byl 20 µl a vlnové délky UV detekce byly nastaveny na 218, 227, 230 a 236 nm. Na této koloně nebyl analyt zadržován, vždy se vyloučil již v mrtvém objemu. Kolona Kinetex Evo C18 tedy není k analýze obsahu metforminu vhodná, protože nedochází k zadržování analytu ve stacionární fázi.

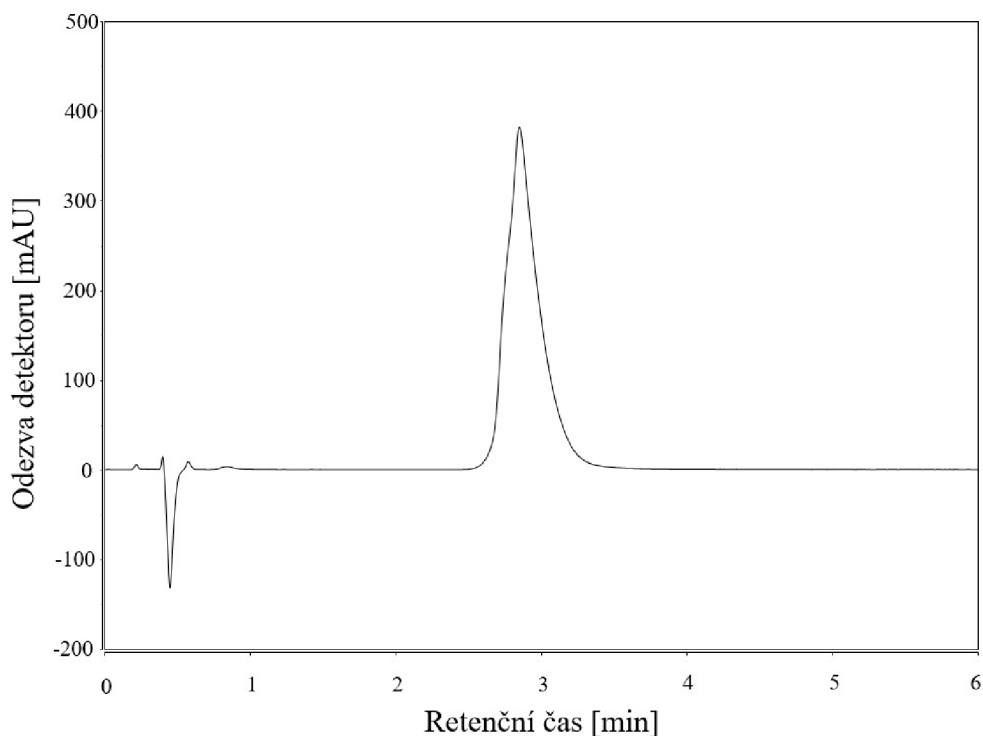
Poslední použitou kolonou pro analýzu vodného standardu M2 byla na základě publikace (Trass a Orłowicz 2016) Luna SCX. Optimalizovanými parametry byly složení a průtok mobilní fáze, velikost nástřiku, vlnová délka detekce. Jako mobilní fáze byl použit vodný roztok dihydrogenfosforečnanu sodného, jehož koncentrace byla optimalizována v hodnotách 0,100; 0,150 a 0,200 mol/l. Hodnota pH mobilní fáze byla upravena kyselinou fosforečnou přibližně na hodnotu 3. Průtok MF byl 1,5 ml/min nebo 2 ml/min. Optimalizací složení MF na hodnotu koncentrace dihydrogenfosforečnanu sodného 0,200 mol/l a průtoku MF na hodnotu 2 ml/min bylo dosaženo retence analytu v čase 2,85 min a kapacitního poměru 4,7. Nástřik vzorku byl optimalizován v hodnotách 20; 40 a 60 µl. Zvýšením objemu nástřiku vzorku bylo dosaženo vyšší intenzity a plochy píku. Důsledkem bylo také mírné zvýšení faktoru symetrie na hodnotu 1,4, což stále splňuje podmínky pro přijatelnou symetrii píku. Vlnová délka detekce byla nejprve nastavena na základě literární rešerše (Gedawy et al. 2019; Snow 2019; Trass a Orłowicz 2016) a následně optimalizována na

základě změření celého absorpčního spektra a určení jeho maxima. V rozsahu 195 – 236 nm byla nejvyšší intenzita detekce u vlnové délky 195 nm.

V Tab. 10 jsou uvedeny výsledné optimalizované parametry metody a na Obr. 5 je zobrazen chromatogram analýzy roztoku metforminu za separačních podmínek uvedených v Tab. 10.

Tab. 10: Optimalizované parametry chromatografické separace roztoku standardu metforminu

<b>Optimalizovaný parametr</b>	<b>Hodnota</b>
Kolona	Luna SCX
Rozměry	150×3 mm; 5 μm
Vzorek	0,0500 mg/ml metformin ve vodě
Objem nástřiku vzorku	60 μl
Mobilní fáze	0,200 mol/l fosfátový pufr (pH 3)
Průtok MF	2 ml/min
Teplota kolonového prostoru	25 °C
Vlnová délka UV/VIS detekce	195 nm



Obr. 5: RP-HPLC chromatogram 0,0500 mg/ml metforminu ve vodě

Pík metforminu ve výsledném chromatogramu má faktor symetrie 1,4, retenční čas je roven 2,85 min a kapacitní poměr je 4,7. V případě potřeby analýzy s vyšším retenčním časem metforminu by bylo vhodné použít v metodě MF s koncentrací 0,150 mol/l a průtok mobilní fáze 1,5 ml/min. Vyšší retenční čas analytu metforminu je žádoucí pro případnou aplikaci vyvinuté metody pro analýzu vzorků metforminu při sledování jeho fotodegradačních produktů. Zkušenosti naznačují, že degradační produkty lze očekávat před samotným píkem původní látky.

## 6 Závěr

Teoretická část práce je věnována principu a využití HPLC, významu stanovení PAU v cigaretových nedopalcích, zpracování informací a literární rešerši k analýze metforminu ve vodných vzorcích. V rámci seznámení se s kapalinovou chromatografií byl popsán princip separace sloučenin a postup analytů a MF systémem HPLC. Důraz byl kladen na charakteristiku analytické kolony a stacionární fáze. Dále byly zpracovány informace k 16 prioritním PAU, k jejich zastoupení v cigaretových nedopalcích a k jejich roli kontaminantů životního prostředí. Závěr teoretické části je věnován významu metforminu ve farmakologii a jeho fyzikálně-chemickým vlastnostem. Ke stanovení metforminu byla vypracována literární rešerše, která shrnuje informace k optimalizaci a zavedení metody v dostupných publikacích.

Prvním cílem praktické části byla optimalizace podmínek FLD detekce, velikosti nástříku a procesu extrakce PAU z nedopalků za účelem následného stanovení PAU v cigaretových nedopalcích pomocí kapalinové chromatografie. Byla provedena validace analytické metody pro řadu kalibračních roztoků připravených na 12 koncentračních úrovních. Parametry hodnocení byly linearita, správnost, přesnost a mez stanovitelnosti. Na základě parametrů validace a kritérií přijatelnosti byl určen rozsah metody pro jednotlivé analyty, které byly NA: 1,00 – 500 µg/l; AY: 2,00 – 500 µg/l; AE: 0,100 – 50,0 µg/l; FR, FE: 0,200 – 50,0 µg/l; AN, FL, PR, BA, CH, BbF: 0,100 – 10,0 µg/l; BkF: 0,100 – 2,00 µg/l; BaP 0,100 – 5,00 µg/l; DA, BP: 0,100 – 10,0 µg/l a IP: 0,200 – 10,0 µg/l. Optimalizovanou a validovanou metodou byly analyzovány reálné vzorky, konkrétně se jednalo o 4 druhy cigaretových nedopalků a čisté nedopalky po třech vzorcích. Obsahy celkového množství 16 PAU v nedopalcích se nacházely v rozsahu 6,07 – 46,9 µg/g. Největší množství PAU bylo detekováno u naftalenu (NA) a dalších PAU s nízkou molekulovou hmotností (AY, AE a FR). S rostoucí molekulovou hmotností významně klesá relativní zastoupení vyextrahovaných PAU z nedopalků cigaret. Výsledné sumární hodnoty obsahů PAU v cigaretových nedopalcích byly srovnatelné s hodnotami ve studii (Dobaradaran et al. 2019). Relativní zastoupení jednotlivých PAU se v porovnání s touto studií lišilo zejména u AY a IP (acenaftylen a indeno[1,2,3-c,d]pyren).

V další fázi výzkumu bude věnována větší pozornost výtěžnosti extrakce na různých koncentračních úrovních. Dosavadní výsledky pro koncentrační hladinu 0,05 µg/g dosahovaly vyšších hodnot výtěžností, v rozsahu 117 – 143 %. Je v plánu provést větší počet extrakcí čerstvých cigaretových nedopalků a porovnat získaná data s dosavadními, prověřit tak míru variability výsledků. Je rovněž důležité zvolit vhodné statistické zpracování

získaných dat. Následně bude proveden experiment s nedopalky exponovanými venkovním podmínkám (déšť, vzduch atd.) na půdě.

Druhým cílem předložené bakalářské práce bylo zavedení analytické metody vhodné ke stanovení metforminu ve vodném vzorku. Na základě literární rešerše byly vyzkoušeny tři chromatografické kolony. Metoda vhodná k analýze probíhala na koloně Luna SCX s rozměry 150×3 mm a velikostí částic 5 μm. Objem nástřiku vzorku byl optimalizován na 60 μl. Použitou mobilní fází byl fosfátový pufr s koncentrací 0,200 mol/l a upraveným pH na hodnotu 3. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 2 ml/min, teplota kolonového prostoru na 25 °C a vlnová délka detekce na 195 nm. Zavedená metoda pro stanovení metforminu je vhodná pro kvantitativní hodnocení úbytku této sloučeniny ve vodných vzorcích. Bude využívána pro analýzu standardů při sledování a hodnocení fotochemických reakcí metforminu.

## 7 Seznam použitých literárních zdrojů

ABDEL-SHAFY, H. I., MANSOUR, M. S. M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 107–123.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>

ALSHISHANI, A., SALHIMI, S. M., SAAD, B., 2018. Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled with hydrophilic interaction chromatography for the determination of biguanides in biological and environmental samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1073, 51–59.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.12.013>

ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS, 2016 [online]. Guidelines for Standard Method Performance Requirements [cit. 9.4.2022].

Dostupné z: [http://www.eoma.aoac.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf)

BEZPEČNOST POTRAVIN A-Z, 2022 [online]. [cit. 16.3.2022].

Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76519.aspx>

CAS COMMON CHEMISTRY. CAS, divize Americké chemické společnosti, 2021 [online]. (CAS RN: 657-24-9). Licencováno pod mezinárodní licenci Attribution-Noncommerce 4.0. [cit. 15.3.2022].

Dostupné z: [https://commonchemistry.cas.org/detail?cas\\_rn=657-24-9](https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=657-24-9)

DAYYIH, W. A., HAMAD, M., MALLAH, E., DAYYIH, A. A., AWAD, R., ZAKARIA, Z., ARAFAT, T., 2018. Method development and validation of vildagliptin and metformin HCL in pharmaceutical dosage form by reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(7), 2965.

Dostupné z: [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9\(7\).2965-72](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9(7).2965-72)



DOBARADARAN, S., SCHMIDT, T. C., LORENZO-PARODI, N., JOCHMANN, M. A., NABIPOUR, I., RAEISI, A., STOJANOVIĆ, N., MAHMOODI, M., 2019. Cigarette butts: An overlooked source of PAHs in the environment? *Environmental Pollution*, 249, 932–939.  
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.097>

DOBARADARAN, S., SCHMIDT, T. C., LORENZO-PARODI, N., KAZIUR-CEGLA, W., JOCHMANN, M. A., NABIPOUR, I., LUTZE, H. V., TELGHEDER, U., 2020. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) leachates from cigarette butts into water. *Environmental Pollution*, 259, 113916.  
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113916>

FOUCHECOURT, M. O., ARNOLD, M., BERNY, P., VIDEMANN, B., RETHER, B., RIVIERE, J. L., 1999. Assessment of the bioavailability of PAHs in rats exposed to a polluted soil by natural routes: induction of EROD activity and DNA adducts and PAH burden in both liver and lung. *Environmental Research Section A*, 80, 330–339.

GEDAWY, A., AL-SALAMI, H., DASS, C. R., 2019. Development and validation of a new analytical HPLC method for simultaneous determination of the antidiabetic drugs, metformin and gliclazide. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(1), 315–322.  
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2018.06.007>

GRYTSAI, O., RONCO, C., BENHIDA, R., 2021. Synthetic accesses to biguanide compounds. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 17(i), 1001–1040.  
Dostupní z: <https://doi.org/10.3762/bjoc.17.82>

HUSSAR, E., RICHARDS, S., LIN, Z. Q., DIXON, R. P., JOHNSON, K. A., 2012. Human health risk assessment of 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in soils of chattanooga, Tennessee, USA. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223(9), 5535–5548.  
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1265-7>

IZZATY, R. E., ASTUTI, B., CHOLIMAH, N., 2014. Development and validation of analytical method for simultaneous estimation of miglitol and metformin hydrochloride in tablet dosage form. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952., 5(11), 5–24. Dostupné z: [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5\(11\).4820-24](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(11).4820-24)

KAHOUN, D., 2020. Úloha č.5: Stanovení fenolu a  $\alpha$  - naftolu ve vodě metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na obrácených fázích se spektrofotometrickou detekcí v ultrafialové oblasti (RP-HPLC-UV). 5, 1–19.

KOSMA, C. I., LAMBROPOULOU, D. A., ALBANIS T. A. (2015). Occurrence of metformin and guanyrea in wastewaters in Greece. 3-5.

KŘÍŽEK, M., ŠÍMA, J., 2015. Analytická chemie. České Budějovice: Jihočeská univerzita - Zemědělská fakulta. ISBN 978-80-7394-486-5.

KUMARI, K. S., BANDHAKAVI, S., 2020. Development and validation of stability-indicating RP-HPLC method for the simultaneous determination of ertugliflozin pidolate and metformin hydrochloride in bulk and tablets. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 1–10.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00079-1>

LAURA, S., 2019 [online]. Applications, USP Dissolution Test 3 for Metformin Hydrochloride Tablets. TN-1249 [3.11.2021].

Dostupné z: [www.phenomenex.com/behappy](http://www.phenomenex.com/behappy)

MASIH, J., SINGHVI, R., KUMAR, K., JAIN, V. K., TANEJA, A., 2012. Seasonal Variation and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Indoor and Outdoor Air in a Semi Arid Tract of Northern India. *Aerosol and Air Quality Research*, 12, 515–525.

Dostupné z: <https://doi.org/10.4209/aaqr.2011.11.0192>

MERCK; CZECH REPUBLIC, 2022 [online]. [cit. 21.3.2022].

Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en>

MERCK; CZECH REPUBLIC, 2021 [online]. LC/MS Analysis of Melamine and Metformin on Ascentis Express HILIC [cit. 3.11.2021].

Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/protocol/analytical-chemistry/small-molecule-hplc/lc-ms-analysis-of-melamine-and-metformin-g005754>

METRY, M., SHU, Y., ABRAHAMSSON, B., CRISTOFOLETTI, R., DRESSMAN, J. B., GROOT, D. W., PARR, A., LANGGUTH, P., SHAH, V. P., TAJIRI, T., MEHTA, M. U., POLLI, J. E., 2021. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Metformin Hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(4), 1513–1526.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.01.011>

MORIWAKI, H., KITAJIMA, S., KATAHIRA, K., 2009. Waste on the roadside, ‘poi-sute’ waste: Its distribution and elution potential of pollutants into environment. *Waste Management*, 29(3), 1192–1197.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2008.08.017>

MUBEEN, G., NOOR, K., 2009. Spectrophotometric method for analysis of metformin hydrochloride. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(1), 100–102.

Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0250-474X.51947>

NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M., ČESLA, P., 2021. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, ISBN 978-80-270-8559-0.

NOVOTNY, T. E., LUM, K., SMITH, E., WANG, V., BARNES, R., 2009. Cigarettes butts and the case for an environmental policy on hazardous cigarette waste. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(5), 1691–1705.

Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijerph6051691>

PILÍK, P., 2018. Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na stanovení 16 indikátorových polycyklických aromatických uhlovodíků dle US EPA ve vodě pomocí HPLC-PDA-FLD, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Přírodovědecká fakulta.

PRAMEELA, K. L., RAMA KRISHNA VENI P., SATYANARAYANA, P. V. V., HARI BABU B., 2018. RP-HPLC method development and validation of azelnidipine, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research Vol. 9(1): 264-270.*

Dostupné z: <http://ijpsr.com/bft-article/rp-hplc-method-for-the-simultaneous-assay-of-metformin-and-benfotiamine-development-and-validation/?view=fulltext>

PRIMBS, T., GENUALDI S., SIMONICH S.M., 2008: *Environ. Toxicol. Chem.*, 27, 1267 – 272.

SHIMAZU, H., 2016. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Cigarettes and Cigarette Smoke. *Environment and Pollution*, 5(2), p15.

Dostupné z: <https://doi.org/10.5539/EP.V5N2P15>

SUBSTANCE DETAILS; SUBSTANCE REGISTRY SERVICES US EPA, 2022 [online]. [cit. 18.3.2022].

Dostupné z: [https://sor.epa.gov/sor\\_internet/registry/substreg/substance/details.do?displayPopup=&id=6012](https://sor.epa.gov/sor_internet/registry/substreg/substance/details.do?displayPopup=&id=6012)

TOMANIOVÁ, M., KOCOUREK, V., HAJŠLOVÁ, J., 1997. Polycyklické aromatické uhlovodíky v potravinách. *Chemické Listy* 91, 357 – 366.

TRASS, M., ORLOWICZ, S., 2016 [online]. Analysis of Metformin HCl Using a Luna SCX Ion-Exchange HPLC Column per the USP Monograph. [cit. 3.11.2021].

Dostupné z: [www.phenomenex.com](http://www.phenomenex.com)

TU Delft., 2021 [online]. Faculteit Civiele Techniek en Geowetenschappen. [cit. 3.11.2021].

Dostupné z:

<https://www.tudelft.nl/citg/over-faculteit/afdelingen/watermanagement/research/waterlab/equipment/high-performance-liquid-chromatography-hplc>

VU, A. T., TAYLOR, K. M., HOLMAN, M. R., DING, Y. S., HEARN, B., WATSON, C. H., 2015. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Mainstream Smoke of Popular U.S. Cigarettes. *Chemical Research in Toxicology*, 28(8), 1616–1626.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00190>

ZÁRUBA, K., 2016. *Analytická chemie 1. díl*. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 978-80-7080-950-1.

## 8 Přílohy

### Příloha A: Linearita

Analyt	Směrnice	Intercept	Koeficient determinace	Korelační koeficient	QC koeficient	Rovnice kalibrační křivky
NA	0,005782	0,001049	0,99991	0,99996	1,30	$y = 0,005782x + 0,001049$
AY	3,539E-09	-1,920E-09	0,99996	0,99998	0,963	$y = 3,539E-09x - 1,920E-09$
AE	0,03259	0,0003181	0,99997	0,99998	1,12	$y = 0,03259x + 0,0003181$
FR	0,02622	0,0008867	0,99996	0,99998	1,08	$y = 0,02622x + 0,0008867$
FE	0,01642	-7,215E-05	0,99998	0,99999	0,766	$y = 0,01642x - 0,00007215$
AN	0,07974	-0,002388	0,99994	0,99997	0,908	$y = 0,07974x - 0,002388$
FL	0,03928	-0,0008938	0,99991	0,99996	1,10	$y = 0,03928x - 0,0008938$
PR	0,06480	-0,001959	0,99993	0,99997	0,973	$y = 0,06480x - 0,001959$
BA	0,1500	-0,004495	0,99994	0,99997	0,878	$y = 0,1500x - 0,004495$
CH	0,1370	-0,003880	0,99993	0,99997	0,924	$y = 0,1370x - 0,003880$
BbF	0,04793	-0,001792	0,99994	0,99997	0,922	$y = 0,04793x - 0,001792$
BkF	0,4110	0,01458	0,99978	0,99989	1,33	$y = 0,4110x + 0,01458$
BaP	0,2682	-0,003784	0,99990	0,99995	1,00	$y = 0,2682x - 0,003784$
DA	0,09441	-0,003318	0,99995	0,99998	0,838	$y = 0,09441x - 0,003318$
BP	0,06777	-0,002762	0,99992	0,99996	1,05	$y = 0,06777x - 0,002762$
IP	0,03908	-0,002631	0,99959	0,99980	2,40	$y = 0,03908x - 0,002631$
<b>Kritéria přijatelnosti</b>			$\geq 0,98000$	$\geq 0,99000$	$\leq 5,00$	

Příloha B: Správnost

<b>c [µg/l]</b>	<b>0,100</b>	<b>0,200</b>	<b>0,500</b>	<b>1,00</b>	<b>2,00</b>	<b>3,50</b>	<b>5,00</b>	<b>10,0</b>	<b>50,0</b>	<b>100</b>	<b>250</b>	<b>500</b>
<b>Kritérium přijatelnosti</b>	<b>40-120 %</b>							<b>60-115 %</b>		<b>80-110 %</b>		
<b>NA</b>	-	-	-	83	91	97	98	99	98	100	101	100
<b>AY</b>	-	-	-	-	118	109	106	102	97	99	100	100
<b>AE</b>	65	79	90	94	98	101	101	102	100	-	-	-
<b>FR</b>	-	76	89	94	97	101	102	102	100	-	-	-
<b>FE</b>	-	88	93	96	98	101	101	101	100	-	-	-
<b>AN</b>	105	105	100	99	98	101	100	100	-	-	-	-
<b>FL</b>	102	103	96	102	98	101	100	100	-	-	-	-
<b>PR</b>	107	105	99	98	99	101	100	100	-	-	-	-
<b>BA</b>	105	105	99	99	99	100	100	100	-	-	-	-
<b>CH</b>	100	105	100	99	99	101	100	100	-	-	-	-
<b>BbF</b>	110	105	99	98	99	101	100	100	-	-	-	-
<b>BkF</b>	100	103	100	99	100	-	-	-	-	-	-	-
<b>BaP</b>	93	101	103	100	99	100	100	-	-	-	-	-
<b>DA</b>	108	105	99	98	100	100	100	100	-	-	-	-
<b>BP</b>	103	106	99	98	100	101	100	100	-	-	-	-
<b>IP</b>	164	110	100	97	97	100	100	100	-	-	-	-

## Příloha C: Přesnost

c [ $\mu\text{g/l}$ ]	0,100	0,200	0,500	1,00	2,00	3,50	5,00	10,0	50,0	100	250	500
Kritérium přijatelnosti	$\leq 30 \%$							$\leq 21 \%$		$\leq 15 \%$		
NA	-	-	-	0,81	2,8	0,95	1,1	0,54	0,21	0,41	0,40	0,46
AY	-	-	-	-	4,3	0,42	0,95	0,53	0,22	0,57	0,43	0,41
AE	12	1,5	0,82	1,3	1,2	1,2	0,84	0,40	0,35	-	-	-
FR	-	2,4	0,50	1,3	0,85	1,0	0,41	0,31	0,33	-	-	-
FE	-	3,9	1,1	2,0	1,2	1,0	0,41	0,49	0,30	-	-	-
AN	7,6	2,5	0,49	0,68	1,1	0,77	0,44	0,48	-	-	-	-
FL	4,2	0,82	1,2	0,76	1,6	1,3	0,26	0,34	-	-	-	-
PR	7,0	3,3	1,2	1,1	1,0	1,4	0,50	0,48	-	-	-	-
BA	8,2	3,3	1,1	1,1	0,92	0,71	0,66	0,60	-	-	-	-
CH	7,4	2,8	1,4	1,3	0,94	1,1	0,64	0,59	-	-	-	-
BbF	8,3	2,3	1,5	2,1	1,0	0,95	0,67	0,44	-	-	-	-
BkF	10	1,8	0,75	1,4	0,80	-	-	-	-	-	-	-
BaP	11	2,5	0,85	1,4	0,69	0,84	0,55	-	-	-	-	-
DA	12	1,1	0,42	1,8	0,60	0,97	0,75	0,44	-	-	-	-
BP	10	3,2	2,2	1,9	1,4	0,46	0,79	0,67	-	-	-	-
IP	25	6,2	8,6	2,1	1,6	2,6	1,5	1,2	-	-	-	-



Příloha D: Navážka cigaretových nedopalků

<b>Číslo vzorku a značka cigarety</b>	<b>Váha (g)</b>
Vz_1 čistý	0,1740
Vz_2 čistý	0,1752
Vz_3 čistý	0,1687
Vz_4 LD	0,1236
Vz_5 LD	0,1745
Vz_6 LD	0,2274
Vz_7 balená	0,2186
Vz_8 balená	0,1939
Vz_9 balená	0,1833
Vz_10 Marlboro	0,2390
Vz_11 Marlboro	0,2379
Vz_12 Marlboro	0,2453
Vz_13 LM	0,2636
Vz_14 LM	0,2148
Vz_15 LM	0,2692