

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Stanovení vybraných fenolů v cigaretových nedopalcích
pomocí kapalinové chromatografie**

Bakalářská práce

Josef Troup

Vedoucí práce: Ing. Pavla Fojtíková, Ph.D.

České Budějovice 2023

Troup, J., 2023: Stanovení vybraných fenolů v cigaretových nedopalcích pomocí kapalinové chromatografie . [Determination of selected phenolic compounds in cigarette butts by HPLC. Bc. Thesis, in Czech.] – 53 p, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

This bachelor thesis is dedicated to the introduction of a method for the determination of selected phenolic compounds in cigarette butts by HPLC/FLD and the subsequent usage to the analysis of real samples. The theoretical part includes information about phenolic compounds, parameters of chromatographic separation and method validation, comparison of previously established HPLC method for phenolic compounds determination. The experimental part deals with optimization of chromatographic separation, fluorescence detection and extraction of phenolic compounds from cigarette butts. The limits of detection and quantification and calibration ranges of target compounds were determined for the method. The established method was used for the quantification of phenols in cigarette butts.

Prohlášení

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

V Českých Budějovicích dne 10.4.2023

Josef Troup

Klíčová slova

Fenolické sloučeniny, hydrochinon, resorcinol, pyrokatechol, fenol, guajakol, p-kresol, m-kresol, o-kresol, kapalinová chromatografie, fluorescenční detekce, cigaretové nedopalky

Key words

Phenolic compounds, hydroquinone, resorcinol, pyrocatechol, phenol, guaiacol, p-cresol, m-cresol, o-cresol, liquid chromatography, fluorescence detection, cigarette butts

Poděkování

Chtěl bych poděkovat mé školitelce Ing. Pavle Fojtíkové, Ph.D. za odborné vedení, užitečné rady a poskytnuté zkušenosti. Velmi oceňuji její přátelský přístup a velkou trpělivost. Dále bych rád poděkoval studentské grantové agentuře za částečné financování této práce. V neposlední řadě bych rád poděkoval rodině a přátelům, kteří mě během dosavadního studia podporovali.

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíle práce	2
3 Teoretická část	3
3.1 Fenolické sloučeniny	3
3.1.1 Zdroje fenolů v životním prostředí.....	3
3.1.2 Toxikologie fenolů	4
3.1.3 Stanovované látky	5
3.2 Parametry chromatografické separace	7
3.3 Parametry validace metody	8
3.4 Použití HPLC pro stanovení vybraných fenolů	9
4 Experimentální část	13
4.1 Použité chemikálie	13
4.2 Použité instrumentální vybavení a spotřební materiál	13
4.3 Podmínky optimalizace metody	14
4.4 Příprava roztoků standardů	16
4.4.1 Příprava zásobních roztoků	16
4.4.2 Příprava směsných roztoků	17
4.5 Příprava roztoků kalibrační křivky	20
4.6 Fluorescenční detekce	20
4.7 Extrakce	21
5 Výsledky a diskuze	22
5.1 Optimalizace chromatografické separace	22
5.1.1 Kolona Kinetex F5 (150x3,0 mm; 2,6 μm).....	22

5.1.2 Kolona Chromservis Astra DM (150x3,0 mm; 3,0 μ m)	24
5.1.3 Kolona Phenomenex Luna C18 (250x4,6 mm; 5,0 μ m)	26
5.2 Nastavení fluorescenčního detektoru	27
5.3 Optimalizace objemu nástřiku a široká kalibrace	28
5.4 Optimalizace extrakce	29
5.5 Validace metody	30
5.6 Stanovení fenolů v reálných vzorcích.....	32
6 Závěr	38
7 Zdroje	40
8 Přílohy.....	45
Příloha A	45
Příloha B	45
Příloha C	46
Příloha D	47
Příloha E	48
Příloha F	49
Příloha G.....	50
Příloha H.....	51
Příloha I	52
Příloha J.....	53
Příloha K.....	53

Seznam zkratek

cig.	cigareta/nedopalek
FE	fenol
FLD	fluorescenční detektor
GU	guajakol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HY	hydrochinon
K_H	Henryho konstanta
K_{OW}	distribuční koeficient oktanol/voda
LOD_i	instrumentální mez detekce
LOD_m	mez detekce metody
LOQ_i	instrumentální mez stanovitelnosti
LOQ_m	mez stanovitelnosti metody
MK	m-kresol
MFA	mobilní fáze A
MFB	mobilní fáze b
OK	o-kresol
PDA	detektor fotodiodového pole
PFP	pentafluorfenyl
PK	p-kresol
PSR	pracovní směsný roztok
PVS	roztok vnitřního standardu pro roztoky kalibrační křivky
PY	pyrokatechol
RE	resorcinol
rozp.	voda s přidavkem kyseliny octové a kyseliny askorbové
UV	ultrafialové záření
VS	vnitřní standard
ZSR	zásobní směsný roztok
ZVS	roztok vnitřního standardu pro extrakci
λ	vlnová délka

1 Úvod

Za rok se prodá po celém světě více než 5,4 bilionu cigaret (WHO 2017). Až 3 ze 4 cigaretových nedopalků končí v přírodě. Deštěm, větrem či vodními toky se následně dostávají i do méně obydlených oblastí (Blickley et al. 2016).

Základní části cigaretových nedopalků jsou filtr, zbytky tabáku, popel a papír. Acetát celulózy (filtr) má omezený potenciál k biodegradaci a v přírodě zůstává měsíce (Puls et al. 2011).

Cigarety obsahují několik tisíc sloučenin, z nichž minimálně 150 je považováno za vysoce toxické, převážně s karcinogenním a mutagenním potenciálem. Při hoření vznikají další stovky až tisíce sloučenin (Slaughter et al. 2011; Venugopal et al. 2021; Soleimani et al. 2022; FDA 2012). Hlavními toxickými látkami jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, nikotin, aromatické aminy, nitrosaminy, kovy, fenoly, karbonylové sloučeniny, alkoholy a nikotinové alkaloidy (Roder Green et al. 2014; Kurmus et al. 2021; FDA 2012).

Kouření způsobuje závažné zdravotní problémy aktivním i pasivním kuřákům. Vedle toho vytváří nebezpečí pro životní prostředí prostřednictvím vyhozených cigaretových nedopalků. Většina dosud publikovaných studií je zaměřena na obsah škodlivých látek v cigaretovém kouři. Pro hodnocení environmentálního rizika je zapotřebí rovněž výzkum obsahu škodlivých látek v nedopalcích a sledování jejich dalšího osudu v různých složkách životního prostředí. Jednou skupinou sloučenin nacházejících se v cigaretových nedopalcích jsou fenoly, které v cigaretách vznikají při hoření (Wu et al. 2012). Stanovením fenolů v cigaretových nedopalcích se zabývá předložená bakalářská práce.

2 Cíle práce

Cílem bakalářské práce je zavedení metody pro analýzu vybraných fenolů pomocí HPLC-FLD a následné využití této metody ke stanovení obsahu těchto látek v cigaretových nedopalcích.

Bakalářská práce má následující dílčí cíle:

- vývoj, optimalizace a validace analytické metody,
- extrakce fenolických látek z cigaretových nedopalků,
- analýza získaných extraktů pomocí HPLC-FLD s využitím zavedené metody.

3 Teoretická část

3.1 Fenolické sloučeniny

Alkoholy a fenoly jsou kyslíkaté deriváty organických sloučenin, ve kterých se nachází hydroxylová skupina navázaná na uhlík. Alkoholy mají hydroxylovou skupinu navázanou na sp^3 hybridizovaný uhlík, zatímco u fenolů je tato skupina vázána na benzenové jádro (McMurry 2015). Rozdílnost chemické struktury alkoholů a fenolů zásadním způsobem ovlivňuje jejich fyzikální a chemické vlastnosti.

Fenoly jsou převážně pevné nebo kapalné látky. Stejně jako alkoholy, i fenoly vytváří vodíkové vazby, což mimo jiné zvyšuje jejich bod varu a zvyšuje rozpustnost ve vodě. Podobně jako voda jsou fenolické sloučeniny jak slabé kyseliny, tak i slabé zásady. Oproti alkoholům jsou fenoly výrazně kyselejší z důvodu delokalizace záporného náboje ve fenoxidových iontech a z toho vyplývající stabilizaci těchto aniontů. Například 2,4,6-trinitrofenol má kyselost podobnou minerálním kyselinám (Pitter 1999; McMurry 2015). Na základě molárních hmotností dělíme fenoly na nízkomolekulární a vysokomolekulární.

Nízkomolekulární fenoly jsou dobře rozpustné ve vodě, ale velmi nestabilní. V alkalickém prostředí se mohou fenoly oxidovat. Při oxidaci fenolů vznikají karbonylové sloučeniny. Například oxidací fenolů s hydroxylovými skupinami v pozicích 1,2 a 1,4 vznikají chinony (Pitter 1999; McMurry 2015). Při chloraci vody s obsahem jednoduchých fenolů vznikají páchnoucí chlorfenoly. Při chloraci meta- substituovaných fenolů (např. resorcinol) vzniká chloroform v téměř kvantitativním množství. Při chloraci ortho- a para- substituovaných fenolů vzniká chloroform v menší míře, z čehož vyplývá vznik dalších, doposud neznámých, produktů (Gallard a von Gunten 2002). Průběh chlorace je ovlivněn mnoha faktory jako jsou koncentrace chloru, teplota, pH, reakční doba a chemická struktura fenolu účastnícího se reakce (Pitter 1999). Vysokomolekulární fenoly nejsou dobře rozpustné ve vodě, jedná se o barevné stabilní sloučeniny (Pitter 1999).

3.1.1 Zdroje fenolů v životním prostředí

Některé fenoly se nacházejí v přírodě přirozeně jako vonné látky, či jako součást obranných mechanismů některých organismů (McMurry 2015). Dále mohou v přírodě vznikat biosyntetickými či rozkladnými procesy. Jednoduché fenoly mohou vznikat také biochemickými transformacemi huminových látek (Pitter 1999).

Hlavním zdrojem fenolických sloučenin v životním prostředí je ovšem lidská činnost. Používají se při výrobě syntetických vláken nebo fenolových pryskyřic. Jsou součástí některých léčiv, například prostředků na bolest krku. Dále se používají i jako prostředky pro desinfekci vodovodních potrubních systémů, nebo jako antiseptika a pesticidy (IRZ 2021).

Kromě úniků těchto látek při jejich používání se dostávají do životního prostředí i spalovacími procesy, při kterých vznikají (např. spalovací motory, cigaretový kouř nebo požáry) nebo ztrátami při výrobě fenolů (IRZ 2021).

3.1.2 Toxikologie fenolů

Fenolické sloučeniny se velmi dobře vstřebávají kůží a sliznicemi. Při kontaktu fenolu s pokožkou závisí více na době a rozsahu expozice, než na koncentraci chemikálie. Vyvolat nekrózu může fenol již při jednorozhodné koncentraci. Působí neurotoxicky, hepatotoxicky i nefrotoxicky. Intoxikace fenolem je možná inhalací či dermální absorpcí. Akutní intoxikace vyvolává bolesti dutiny ústní a břicha. Systémové projevy intoxikace jsou mnohem nebezpečnější než lokální účinky fenolu, často končí smrtelně (Tichý 1998; McGachy 2021). Smrtelná dávka pro dospělého člověka je 2-10 g (Vopršalová a Žáčková 1996). K chronickým otravám nedochází příliš často. Kresoly, chlorfenoly a nitrofenoly jsou vysoce toxické látky, které narušují většinu životně důležitých funkcí. Benzendioly jsou velmi toxické při akutní intoxikaci. Při chronických otravách vyvolávají dermatitidy. Hydrochinon narušuje funkci oxygenas. Při akutní otravě resorcinolem dochází k methemoglobinemii (Tichý 1998; McGachy 2021).

Zásadní jsou účinky fenolů na vodní organismy. Akutní toxicita se velmi liší mezi jednotlivými organismy. Zatímco pro ryby a koryše mohou být fenolické sloučeniny vysoce toxické, pro bakterie a měkkýše jsou prakticky netoxické (Duan et al. 2018). Některé bakterie, houby a řasy mohou zásadním způsobem přispívat k biodegradaci fenolů (Jiang et al. 2007; Duan et al. 2018). Testy chronické toxicity fenolů probíhaly ve velmi malé míře. Byla provedena studie, která prokazuje poškození tkání *Oreochromis mossambicus* při působení malého množství fenolu po dobu 21 dní (Varadarajan et al. 2014). Fenoly mají nízké biokoncentrační faktory (u ryb <100), téměř nedochází k bioakumulaci. Toxicita je dána spíše přímým působením, než přenosem z potravy (REACH 2023; Rocha et al. 2016).


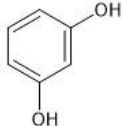
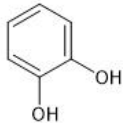
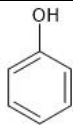
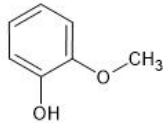

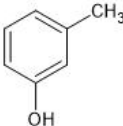
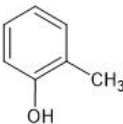
Mezi karcinogenní fenolické sloučeniny nacházející se v tabáku a cigaretovém kouři patří fenol, kresoly či pyrokatechol (FDA 2012).

3.1.3 Stanovované látky

Pro vývoj analytické metody umožňující stanovení fenolů v cigaretových nedopalcích byly konkrétní sloučeniny vybrány na základě literatury, která diskutovala jejich přítomnost a množství v cigaretovém kouři (Wu et al. 2012; Moldoveanu a Kiser 2007).

Systematické názvy, zkratky použité v práci, registrační čísla CAS a strukturní vzorce stanovovaných látek jsou uvedeny v Tab. 1 (PubChem 2023).

Tabulka 1: Systematické názvy, použité zkratky, registrační čísla CAS a strukturní vzorce stanovovaných látek

Analyt	Systematický název	CAS	Zkratky	Strukturní vzorec
hydrochinon	1,4-benzendiol	123-31-9	HY	
resorcinol	1,3-benzendiol	108-46-3	RE	
pyrokatechol	1,2-benzendiol	120-80-9	PY	
fenol	hydroxybenzen	108-95-2	FE	
guajakol	2-methoxyfenol	90-05-1	GU	
p-kresol	4-methylfenol	106-44-5	PK	
m-kresol	3-methylfenol	108-39-4	MK	
o-kresol	2-methylfenol	95-48-7	OK	

V Tab. 2 jsou uvedeny molární hmotnosti, rozpustnosti při 25 °C, logaritmy distribučních koeficientů oktanol/voda, Henryho konstanty a hustoty stanovovaných látek (PubChem 2023).

Tabulka 2: Molární hmotnosti, rozpustnosti, logaritmy distribučních koeficientů oktanol/voda, Henryho konstanty a hustoty stanovovaných látek

Analyt	M (g/mol)	Rozpustnost (g/l)	log K_{ow} (1)	K_H (atm×m ³ /mol)	Hustota (g/cm ³)
hydrochinon	110,11	72,0	0,59	$4,73 \times 10^{-11}$	1,330
resorcinol	110,11	717	0,80	$9,88 \times 10^{-11}$	1,278
pyrokatechol	110,11	461	0,88	$1,2 \times 10^{-9}$	1,334
fenol	94,11	82,8	1,46	$3,33 \times 10^7$	1,072
guajakol	124,14	18,7	1,32	$1,2 \times 10^{-6}$	1,129
p-kresol	108,14	21,5	1,94	1×10^{-6}	1,034
m-kresol	108,14	22,7	1,96	$8,6 \times 10^{-7}$	1,034
o-kresol	108,14	25,9	1,95	$1,2 \times 10^{-6}$	1,047

Z hodnot Henryho konstant a distribučních koeficientů oktanol/voda lze určit distribuce fenolů v životním prostředí. Všechny vybrané fenoly mají nízké hodnoty Henryho konstanty, což indikuje jejich nízký potenciál k vypařování. S rostoucím distribučním koeficientem oktanol/voda roste schopnost látky ukládat se v půdě. Všechny vybrané fenoly patří primárně mezi vodní polutanty.

Na základě literatury a následného ověření byl jako vnitřní standard vybrán 4-chlorfenol (Moldoveanu a Kiser 2007). Vnitřní standard, jeho strukturní vzorec a základní informace jsou uvedeny v Tab. 3 (PubChem 2023).

Tabulka 3: Základní informace o vnitřním standardu

Analyt	Systematický název	Molární hmotnost [g/mol]	Strukturní vzorec
4-chlorfenol	4-chlorfenol	128,55	

3.2 Parametry chromatografické separace

Při optimalizaci chromatografické separace byla věnována pozornost retenčním časům analytů, tvaru a symetrie píků a rozlišení jednotlivých píků.

Retenční čas (t_r) je doba, která uplyne mezi nástřikem vzorku a maximem eluční křivky (vrcholem píku) daného analytu. Retenční čas analytu je konstantní pouze pro určitý chromatografický systém a podmínky. Jeho hodnota je zjišťována pomocí standardních referenčních látek. Alternativou k retenčnímu času je retenční objem, což je objem mobilní fáze, který proteče systémem za t_r (Nováková a Douša 2021b).

Míru retence vyjadřuje kapacitní poměr (k). Doporučený kapacitní poměr by měl být vyšší než 2 (Nováková a Douša 2021b; Kahoun 2022). Výpočet kapacitního poměru je naznačen v rovnici 1

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad (1),$$

kde k je kapacitní poměr (1), t_r je retenční čas analytu (min) a t_m je mrtvý retenční čas (min). Mrtvý retenční čas je retenční čas sloučeniny, která se nezadržuje na koloně a tudíž se pohybuje rychlostí mobilní fáze (Kahoun 2022; Nováková a Douša 2021b).

Úspěšnost separace jednotlivých analytů popisujeme rozlišením ($R_{1,2}$). Optimální hodnoty rozlišení se nastavují podle potřeb konkrétní práce, obvykle 1,5 až 2 (Kahoun 2022; Nováková a Douša 2021b). Výpočet rozlišení je naznačen v rovnici 2

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{t_{r1} - t_{r2}}{w_1 - w_2} \quad (2),$$

kde $R_{1,2}$ je rozlišení dvou sousedních píků látek 1 a 2 (1), t_{r1} a t_{r2} jsou retenční časy těchto sousedních látek (min), w_1 a w_2 jsou šířky píků látek 1 a 2 na základní linii (min) (Kahoun 2022; Nováková a Douša 2021b).

Dalším sledovaným parametrem je symetrie píku. Tvar chromatografického píku popisuje asymetrie píku. Tu lze vyjádřit pomocí faktoru asymetrie (A), který by se měl pohybovat v rozmezí 0,8 až 1,5 (Nováková a Douša 2021b). Výpočet faktoru asymetrie je naznačen v rovnici 3

$$A = \frac{t}{f} \quad (3),$$

kde A je faktor asymetrie (1), t je šířka sestupné části píku v 5 % jeho výšky (min) a f je šířka vzestupné části píku v 5 % jeho výšky (min) (Nováková a Douša 2021b).

3.3 Parametry validace metody

Linearita vyjadřuje přijatelnou lineární korelaci mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu ve vzorku v daném rozsahu. Pro vyhodnocení linearity byl použit korelační koeficient (R), QC koeficient a hodnota difference teoretické a vypočtené hodnoty. Kritériem přijatelnosti pro korelační koeficient bylo $R > 0,9900$ a pro QC koeficient $QC < 5\%$ (Nováková a Douša 2021a; AOAC 2016). Kalibrační křivka byla použita ve tvaru rovnice 4

$$y = k \times c + q \quad (4),$$

kde k je směrnice kalibrační přímky (1), y je poměr plochy píků analytu a vnitřního standardu (1), c je poměr množství analytu a vnitřního standardu ve vialce (1) a q je úsek na ose y (1) (Kahoun 2022; Nováková a Douša 2021a).

Jako další parametr pro určení rozsahu metody byla použita difference, která je definována jako procentuální rozdíl naměřené a teoretické hodnoty koncentrace. Pro nejnižší kalibrační bod nesmí difference přesáhnout 20 % a pro další kalibrační body nesmí přesáhnout 15 % (FDA 2018).

Mez detekce (LOD) je koncentrace analytu ve vzorku, kterou lze detekovat, ale nelze ji stanovit s dostatečnou přesností a správností. Výška signálu analytu o koncentraci na úrovni meze detekce se rovná trojnásobku výšky šumu. Instrumentální mez detekce byla vypočtena z výsledků analýzy nejméně koncentrovaného roztoku kalibrační křivky (Nováková a Douša 2021a; Kahoun 2022). Po zahrnutí vlivu procesu extrakce a ředění byla následně spočtena mez detekce metody s jednotkou $\mu\text{g}/\text{cig}$. Mez stanovitelnosti (LOQ) je koncentrace analytu ve vzorku, kterou lze stanovit s dostatečnou přesností a správností. Výška signálu analytu o koncentraci na úrovni meze stanovitelnosti se rovná desetinásobku výšky šumu. Mez stanovitelnosti byla vypočtena z výsledků analýzy dvou nejméně koncentrovaných roztoků kalibrační křivky (Kahoun 2022; Nováková a Douša 2021a). Po zahrnutí vlivu procesu extrakce a ředění byla následně spočtena mez stanovitelnosti metody s jednotkou $\mu\text{g}/\text{cig}$.

Správnost metody je parametr definovaný jako těsnost shody mezi experimentálně zjištěnou hodnotou koncentrace analytu a referenční reálnou hodnotou koncentrace analytu. Přesnost metody je parametr definovaný jako těsnost shody mezi nezávislými výsledky zkoušek za předem specifikovaných stejných podmínek (Nováková a Douša 2021a). Kritéria přijatelnosti pro hydrochinon, resorcinol, pyrokatechol a fenol byla vzhledem ke koncentrační úrovni analytů 10^{-8} pro přesnost 21 % a pro správnost 60–115 % (AOAC 2016). Pro guajakol a izomery kresolu (koncentrační úroveň 10^{-9}) bylo kritérium přijatelnosti přesnosti 30 %

a správnosti 40–120 % Rozsah metody je koncentrační rozsah, pro který má metoda požadovanou linearitu, přesnost a správnost (Kahoun 2022; Nováková a Douša 2021a).

3.4 Použití HPLC pro stanovení vybraných fenolů

Před optimalizací metody byla provedena literární rešerše se zaměřením na publikace věnující se stanovení konkrétních nízkomolekulárních fenolů pomocí HPLC. Parametry sledované při rešerši byly primárně stacionární a mobilní fáze, typ eluce a typ detektoru. Dále byl sledován postup přípravy standardů, postup extrakce fenolů z cigaretového kouře, tabáku a cigaretových nedopalků.

Fenoly jsou často stanovovány v přírodních (Zhong et al. 2016; Liu et al. 2021) či odpadních vodách (Salcedo et al. 2019). Velké množství studií se věnuje výskytu fenolických kyselin a vysokomolekulární fenolů v rostlinách a rostlinných výrobcích (Zhu et al. 2023; Zhang et al. 2023; Jaiswal a Kumar 2022). Stanovování fenolů v tabáku, cigaretovém kouři či cigaretových nedopalcích se věnuje malé množství studií (Wu et al. 2012; Moldoveanu a Kiser 2007; Demirci A a Morkan B 2013).

Pro potřeby této práce bylo vybráno 6 studií, na jejichž základě byly nastaveny úvodní podmínky při optimalizaci metody. Základní parametry těchto studií jsou uvedeny v Tab. 4.

Při použití gradientové eluce, byla jako více polární mobilní fáze (MFA) použita voda s přídavkem kyseliny octové (Moldoveanu a Kiser 2007; Wu et al. 2012). Jedna z rešeršovaných publikací uvádí použití vody s přídavkem kyseliny fosforečné jako MFA (Zhong et al. 2016). Jako méně polární mobilní fáze (MFB) byl použit acetonitril s přídavkem kyseliny octové (Moldoveanu a Kiser 2007), methanol s přídavkem kyseliny octové (Wu et al. 2012), dále byl použit methanol (Zhong et al. 2016). Jako MFA je uváděno také použití vody s přídavkem 0,1% kyseliny trifluoroctové a jako MFB acetonitril s přídavkem 0,1% kyseliny trifluoroctové (Salcedo et al. 2019). Při použití isokratické eluce byla předem připravena směs vodné a organické fáze s úpravou pH. V jednom případě se jednalo o směs vody a methanolu v poměru 70:30, která byla následně okyselená kyselinou octovou (Demirci A a Morkan B 2013). Také byla jako mobilní fáze použita směs vody okyselené kyselinou octovou a acetonitrilu v poměru 62:38 (Liu et al. 2021).

Pro stanovení fenolických sloučenin jsou využívány různé kolony typu C18 (Moldoveanu a Kiser 2007; Demirci A a Morkan B 2013; Liu et al. 2021; Zhong et al. 2016; Salcedo et al. 2019) V jedné ze studií byla použita kolona s pentafluorofenylovou (PFP)

stacionární fázi (Wu et al. 2012). V tomto případě se podařilo rozdělení isomerů kresolu. Rozdělení těchto izomerů se u jedné z rešeršovaných publikací podařilo i při použití plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (Moldoveanu a Kiser 2007). Použité HPLC kolony měly délku 10 cm (Salcedo et al. 2019), 15 cm (Wu et al. 2012; Moldoveanu a Kiser 2007; Demirci A a Morkan B 2013) nebo 25 cm (Liu et al. 2021; Zhong et al. 2016). Velikost částic byla 3,5 až 5 μm pro kolony s C18 stacionární fázi (Moldoveanu a Kiser 2007; Demirci A a Morkan B 2013; Liu et al. 2021; Zhong et al. 2016; Salcedo et al. 2019) a 3 μm pro použitou PFP kolonu (Wu et al. 2012).

Jedním typem používaných detektorů byl UV detektor (Demirci A a Morkan B 2013; Zhong et al. 2016). Obě studie používající tento typ detektoru stanovovaly ze sloučenin, kterými se zabývá tato práce, pouze fenol. U jedné publikace byla mez detekce metody 2,17 $\mu\text{g}/\text{cig.}$, mez stanovitelnosti metody 7,28 $\mu\text{g}/\text{cig.}$ a koncentrační rozsah činil 1–15 mg/l (Demirci A a Morkan B 2013). Druhá publikace uvádí při stanovení koncentrace fenolů ve vodě mez detekce metody 0,11 $\mu\text{g}/\text{l}$ a koncentrační rozsah 0,5–500 $\mu\text{g}/\text{l}$ (Zhong et al. 2016).

Pro stanovení fenolů v odpadních vodách byl použit detektor fotodiodového pole (Salcedo et al. 2019). Mez stanovitelnosti této metody byla 5 $\mu\text{g}/\text{l}$ a kalibrační rozsah 5–1000 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Dále byl používán fluorescenční detektor (Wu et al. 2012; Moldoveanu a Kiser 2007; Liu et al. 2021). Meze detekce a meze stanovitelnosti metody se při použití tohoto detektoru pohybovaly v řádech setin až jednotek mikrogramů na cigaretu a kalibrační rozsahy mezi jednotkami až tisíci mikrogramů na litr při stanovením fenolů v cigaretovém kouři (Wu et al. 2012; Moldoveanu a Kiser 2007). Při použití FLD pro stanovení fenolů ve vodách, byly meze detekce a meze stanovitelnosti metody v řádu setin až desetin mikrogramů na litr a kalibrační rozsahy v řádech desetin až stovek mikrogramů na litr (Liu et al. 2021).

Pro přípravu zásobních roztoků standardů byl jako rozpouštědlo použit methanol (Salcedo et al. 2019; Demirci A a Morkan B 2013; Liu et al. 2021; Zhong et al. 2016) nebo voda okyselená 1% kyselinou octovou (Wu et al. 2012; Moldoveanu a Kiser 2007). Koncentrace zásobních roztoků se pohybovala ve stovkách miligramů na litr, nejčastěji 1000 mg/l (Wu et al. 2012; Moldoveanu a Kiser 2007; Demirci A a Morkan B 2013; Liu et al. 2021; Zhong et al. 2016; Salcedo et al. 2019). Zásobní roztoky byly uchovávány při teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$ (Liu et al. 2021; Zhong et al. 2016) nebo -18 $^{\circ}\text{C}$ (Salcedo et al. 2019).

Při stanovování fenolů v cigaretovém kouři, byl kouř zachytáván na extrakčních filtrech, které byly následně extrahovány na třepače po dobu 30 minut (Wu et al. 2012;

Moldoveanu a Kiser 2007). Jako extrakční činidlo byla použita voda s přídavkem 1% kyseliny octové (Wu et al. 2012) nebo voda s přídavkem 1% kyseliny octové a 0,1% kyseliny askorbové (Moldoveanu a Kiser 2007). Roztok byl následně přefiltrován přes stříkačkový filtr. Při stanovování fenolů v tabáku, byl rozdrcený tabák extrahován po dobu 30 minut na třepačce. Jako extrakční činidlo byla použita voda s přídavkem 1% kyseliny octové (Wu et al. 2012). Při extrakci cigaretových nedopalků byl nejdříve odstraněn zbytek tabáku a papír z cigaretového nedopalku. Samotný filtr byl rozpuštěn ve 2 ml acetonitrilu v ultrazvukové lázni. Poté bylo přidáno 5 ml 1% kyseliny octové, přičemž vznikala sraženina, která byla přefiltrována. Filtrát byl doplněn destilovanou vodou na 7 ml roztoku. 1 ml tohoto roztoku byl následně přenesen na kolonu obsahující 1 g absorbentu XAD-4. Absorbent byl následně promyt 2 ml vody s přídavkem 1% kyseliny octové. Nakonec byl fenol vymýván pomocí methanolu (Demirci A a Morkan B 2013).

Tabulka 4: Podmínky chromatografických analýz citovaných publikací

Citace	Matrice	Stacionární fáze	MFA	MFB	Detekce	LOD _m (µg/cig.)	LOQ _m (µg/cig.)	Kalibrační rozsah (µg/l)
(Demirci A a Morkan B 2013)	nedopalky	C18	1% kyselina octová ve směsi vody a methanolu (70:30)	-	UV	2,17 µg/cig.	7,28 µg/cig.	FE 1000–15000
(Moldoveanu a Kiser 2007a)	cigaretový kouř	C18	1% kyselina octová ve vodě	1% kyselina octová v acetonitrilu	FLD	0,10–1,62 µg/cig.	0,30–4,86 µg/cig.	PY, HY, RE 60-9000 FE, OK, PK, MK, GU 150–2250
(Wu et al. 2012)	cigaretový kouř, tabák	PFP	1% kyselina octová ve vodě	1% kyselina octová v methanolu	FLD	0,02–0,46 µg/cig.	0,06–1,53 µg/cig.	HY, PY, FE, GU 15–10000 OK, PK, MK, RE 5–3000
(Liu et al. 2021)	přírodní voda	C18	směs 2% kyseliny octové ve vodě a acetonitrilu (62:38)	-	FLD	0,06–0,17 µg/l	0,20–0,44 µg/l	FE 0,25–250 MK+PK 0,60–480 OK 0,50–450
(Zhong et al. 2016)	přírodní voda	C18	1% kyselina fosforečná ve vodě	methanol	UV	0,11 µg/l	-	FE 0,5–500
(Salcedo et al. 2019)	odpadní voda z ropných rafinérií	C18	0,1% kys. trifluoroctová ve vodě	0,1% kys. trifluoroctová v acetonitrilu	PDA	-	5 µg/l	MK+PK, OK, FE 5–1000

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

Pro tuto práci byly použity následující chemikálie:

- hydrochinon – čistota ≥ 99 % (Sigma Aldrich)
- resorcinol – čistota $\geq 98,5$ % (Sigma Aldrich)
- pyrokatechol – čistota $\geq 99,5$ % (Sigma Aldrich)
- fenol – čistota $\geq 99,5$ % (Sigma Aldrich)
- guajakol – čistota neuvedena (Sigma Aldrich)
- p-kresol – čistota ≥ 99 % (Sigma Aldrich)
- m-kresol – čistota $\geq 98,5$ % (Sigma Aldrich)
- o-kresol – čistota ≥ 98 % (Sigma Aldrich)
- 4-chlorfenol – čistota ≥ 98 % (Sigma Aldrich)
- methanol pro HPLC (Merck)
- acetonitril pro HPLC (Merck)
- kyselina octová – čistota 100 % (Merck)
- kyselina mravenčí – čistota ≥ 98 % (Merck)
- mravenčan amonný – čistota ≥ 99 % (Sigma Aldrich)
- kyselina askorbová - čistota ≥ 99 % (Merck)
- kyselina trifluoroctová - čistota ≥ 99 % (Fluka)
- Milli-Q voda generována přístrojem Smart2Pure 6 UV/UF (Thermo Fisher Scientific)

4.2 Použité instrumentální vybavení a spotřební materiál

Pro tuto práci bylo použito následující instrumentální vybavení a spotřební materiál:

- Kapalinový chromatograf Thermo Scientific UltiMate 3000 se zásobníkem mobilní fáze, čerpadlem mobilní fáze, nástřikovým modulem, vyhřívaným kolonovým prostorem, spektrofotometrickým detektorem a fluorescenčním detektorem
- Ovládání přístroje a vyhodnocení dat bylo provedeno programem Chromeleon 7.2
- Chromatografické kolony Phenomenex Luna C18 (250x4,6 mm; 5,0 μm), Chromservis Astra DM (150x3,0 mm; 3,0 μm) a Kinetex F5 (150x3,0 mm; 2,6 μm) vybavené vhodnou předkolonkou
- Výrobník milliQ vody: Smart2Pure 6 UV/UF (Thermo Fisher Scientific)

- Analytické váhy: MS105DU (Mettler Toledo TM)
- pH metr Orion Star A111 (Thermo Scientific)
- Orbitální třepačky Orbit 1000 (Labnet)
- Centrifuga Sigma 3-30KS (Sigma)
- Automatické dávkovací pipety Eppendorf Research Plus o objemech 10–100, 100–1000, 500–5000 μ l, 1–10 ml (Eppendorf)
- Automatické dávkovací pipety BioPette PLUS o objemech 2–20, 200–2000 μ l (Labnet)
- Skleněné dávkovací stříkačka o objemu: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 μ l (Hamilton)
- Odměrné sklo, skleněné nádoby na extrakci, skleněné nádoby na mobilní fázi, kádinky
- plastové špičky, mikrozkuřavky Eppendorf, krimpovací vialky s hliníkovým uzávěrem s pryžovým septem
- Pinzeta, krimpovací kleště

4.3 Podmínky optimalizace metody

Pro potřeby této práce byly připraveny čtyři typy MFA a sedm typů MFB. Složení použitých mobilních fází A je uvedeno v Tab. 5 a složení mobilních fází B je uvedeno v Tab. 6.

Tabulka 5: Složení mobilních fází A

Označení mobilní fáze	Složení mobilní fáze
MFA ₁	1% kyselina octová ve vodě
MFA ₂	0,5% kyselina octová ve vodě
MFA ₃	2 mM mravenčan amonný + 0,1% kyselina mravenčí ve vodě
MFA ₄	0,1% kyselina trifluoroctová ve vodě

Tabulka 6: Složení mobilních fází B

Označení mobilní fáze	Složení mobilní fáze
MFB ₁	1% kyselina octová v methanolu
MFB ₂	1% kyselina octová v acetonitrilu
MFB ₃	0,5% kyselina octová v methanolu
MFB ₄	0,1% kyselina trifluoroctová v methanolu
MFB ₅	0,1% kyselina trifluoroctová v acetonitrilu
MFB ₆	methanol
MFB ₇	acetonitril

Pro chromatografickou kolonu Kinetex F5 byly použity 4 kombinace mobilních fází. Nejprve byla použita jako MF voda s přídatkem 1 obj.% kyseliny octové (MFA₁) a methanol

s přídavkem 1 obj.% kyseliny octové (MFB₁) (Wu et al. 2012). Byly zkoušeny gradientové eluce s lineárním i skokovým zvýšením obsahu MFB v mobilní fázi v rozmezí od 0 do 60 %. Teplota v kolonovém prostoru byla nastavována v rozmezí od 25 °C do 35 °C. Dalším složením mobilních fází byla voda s přídavkem 0,1 obj.% kyseliny trifluoroctové (MFA₄) a acetonitril (MFB₇). Pro tyto MF byly zkoušeny gradientové eluce s postupným zvyšováním obsahu MFB (0–30 % a 15–45 % MFB). Teplota v kolonovém prostoru byla nastavována v rozmezí od 25 °C do 45 °C. Třetím složením mobilních fází na této koloně byla voda s přídavkem 0,1 obj.% kyseliny trifluoroctové (MFA₄) a acetonitril s přídavkem 0,1 obj.% kyseliny trifluoroctové (MFB₅) (Salcedo et al. 2019). Pro toto složení MF byly zkoušeny gradientové eluce s lineárním i skokovým zvýšením obsahu MFB v mobilní fázi v rozmezí od 0 do 60 %. Teplota v kolonovém prostoru byla nastavována v rozmezí od 30 °C do 40 °C. Posledním složením MF na této koloně byla voda s přídavkem 0,1 obj.% kyseliny trifluoroctové (MFA₄) a methanol s přídavkem 0,1 obj.% kyseliny trifluoroctové (MFB₄). Byly opět zkoušeny gradientové eluce s lineárním i skokovým zvýšením obsahu MFB v mobilní fázi v rozmezí od 0 do 60 %. Teplota v kolonovém prostoru byla nastavena na 30 °C. Průtok MF při všech analýzách na této koloně byl 0,4 ml/min.

Pro chromatografickou kolonu Chromservis Astra DM byly použity čtyři kombinace mobilních fází. První použité složení MF byla voda s přídavkem 1 obj.% kyseliny octové (MFA₁) a methanol s přídavkem 1 obj.% kyseliny octové (MFB₁) (Wu et al. 2012). Pro toto složení MF byly zkoušeny gradientové eluce s lineárním i skokovým zvýšením obsahu MFB v rozmezí od 12 do 100 % MFB. Teplota v kolonovém prostoru byla 25 °C nebo 35 °C. Druhým složením MF byla voda s přídavkem 1 obj.% kyseliny octové (MFA₁) a acetonitril s přídavkem 1 obj.% kyseliny octové (MFB₂) (Moldoveanu a Kiser 2007). Pro tuto MF byly zkoušeny gradientové eluce se skokovým zvýšením obsahu MFB v rozmezí 12 až 45 % MFB. Teplota v kolonovém prostoru byla nastavena na 35 °C. Dalším složením MF byla voda s přídavkem 0,5 obj.% kyseliny octové (MFA₂) a methanol s přídavkem 0,5 obj.% kyseliny octové (MFB₃). Pro tuto MF byly zkoušeny gradientové eluce se skokovým zvýšením obsahu MFB v rozmezí 12 až 45 % MFB. Teplota v kolonovém prostoru byla nastavena na 35 °C. Následně bylo použito složení MF doporučené výrobcem stacionární fáze. MFA byla voda s přídavkem 0,1 obj.% kyseliny mravenčí a 2 mmol/l mravenčanu amonného (MFA₃). Jako MFB byl použit methanol (MFB₆). Byly zkoušeny gradientové eluce s lineárním i skokovým zvýšením obsahu MFB v rozmezí od 12 do 60 % MFB. Teplota v kolonovém prostoru byla nastavena na 25 °C nebo 35 °C. Průtok na této koloně byl nastaven na 0,5 ml/min.

Pro 25 cm dlouhou chromatografickou kolonu Phenomenex Luna C18 byly použity dvě kombinace mobilních fází. Prvním složením MF na této koloně byla voda s přidavkem 0,1 obj.% kyseliny trifluoroctové (MFA₄) a methanol s přidavkem 0,1 obj.% kyseliny trifluoroctové (MFB₄). Byly opět zkoušeny gradientové eluce s lineárním zvýšením obsahu MFB v mobilní fázi v rozmezí od 5 do 60 %. Teplota v kolonovém prostoru byla nastavena na 35 °C. Druhým složením MF na této koloně byla voda s přidavkem 0,1 obj.% kyseliny trifluoroctové (MFA₄) a acetonitril s přidavkem 0,1 obj.% kyseliny trifluoroctové (MFB₅). Pro toto složení MF byly zkoušeny gradientové eluce s lineárním zvýšením obsahu MFB v mobilní fázi v rozmezí od 5 do 60 % MFB. Teplota v kolonovém prostoru byla nastavena na 35 °C. Průtok na této koloně byl nastaven na 1 ml/min.

Pro přehlednost jsou složení mobilních fází, použité teploty a průtoky MF pro jednotlivé kolony shrnuty v Tab. 7.

Tabulka 7: Kombinace mobilních fází, použité teploty a průtoky MF pro jednotlivé kolony

Kolona	Kombinace mobilních fází				Teploty (°C)	Průtok MF (ml/min)
Kinetex F5	MFA ₁ MFB ₁	MFA ₄ MFB ₇	MFA ₄ MFB ₄	MFA ₄ MFB ₅	25–45	0,4
Astra DM	MFA ₁ MFB ₁	MFA ₁ MFB ₂	MFA ₂ MFB ₃	MFA ₃ MFB ₆	25–35	0,5
Luna C18	MFA ₄ MFB ₄	MFA ₄ MFB ₅	-	-	35	1,0

4.4 Příprava roztoků standardů

4.4.1 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky standardů fenolu, resorcinolu, pyrokatecholu, guajakolu, p-kresolu, m-kresolu, o-kresolu o koncentraci zhruba 1000 mg/l byly připraveny navážením přesně asi 5 mg analytu do 5 ml odměrné baňky. Odměrná baňka byla doplněna po rysku methanolem, ve kterém byl analyt rozpuštěn.

Zásobní roztok standardu hydrochinonu o koncentraci zhruba 1000 mg/l byl připraven navážením přesně asi 5 mg analytu do 5 ml odměrné baňky. Odměrná baňka byla doplněna

po rysku vodou s přidavkem kyseliny octové (1 obj. %) a kyseliny askorbové (1 mg/ml), ve které byl analyt rozpuštěn.

Zásobní roztok standardu 4-chlorfenolu (VS) byl připraven navážením přesně asi 50 mg analytu do 5 ml odměrné baňky. Odměrná baňka byla doplněna po rysku methanolem, ve kterém byl analyt rozpuštěn. Zásobní roztoky byly uchovávány při teplotě -80 °C. Přehled přípravy zásobních roztoků je uveden v Tab. 8.

Tabulka 8: Příprava zásobních roztoků standardů a vnitřního standardu

Analyt	Čistota (%)	Navážka (mg)	Objem (ml)	Koncentrace (mg/l)	Rozpouštědlo
hydrochinon	99	4,89	5	968	1% k.octová 1 mg/ml k. askorbová voda
resorcinol	98,5	5,27	5	1038	CH ₃ OH
pyrokatechol	99	4,75	5	941	CH ₃ OH
fenol	99,5	5,48	5	1091	CH ₃ OH
guajakol	100	5,63	5	1126	CH ₃ OH
p-kresol	99	5,04	5	998	CH ₃ OH
m-kresol	99	5,73	5	1135	CH ₃ OH
o-kresol	98	4,77	5	935	CH ₃ OH
4-chlorfenol	98	49,07	5	9618	CH ₃ OH

Roztok vnitřního standardu pro extrakci o koncentraci 1000 mg/l (ZVS) byl připraven odpipetováním 2,6 ml zásobního roztoku 4-chlorfenolu do 25 ml odměrné baňky. Odměrná baňka byla doplněna po rysku vodou s přidavkem kyseliny octové (1 obj. %) a kyseliny askorbové (1 mg/ml).

Roztok vnitřního standardu pro roztoky kalibrační křivky o koncentraci 10 mg/l (PVS) byl připraven odpipetováním 0,1 ml ZVS do 10 ml odměrné baňky. Odměrná baňka byla doplněna po rysku vodou s přidavkem kyseliny octové (1 obj. %) a kyseliny askorbové (1 mg/ml).

4.4.2 Příprava směsných roztoků

Zásobní směsný roztok standardů (ZSR) o koncentraci analytů 5 mg/l byl připraven odpipetováním přesného objemu jednotlivých analytů do 10 ml odměrné baňky, která byla následně doplněna po rysku vodou s přidavkem kyseliny octové (1 obj. %) a kyseliny askorbové (1 mg/ml). Pipetované objemy zásobních roztoků analytů pro přípravu zásobního směsného roztoku jsou uvedeny v Tab. 9.

Tabulka 9: Přehled přípravy zásobního směšného roztoku

Analyt	Koncentrace zásobních roztoků (mg/l)	Objem (μl)	Koncentrace ZSR (mg/l)
hydrochinon	968	51,6	5,00
resorcinol	1038	48,2	5,00
pyrokatechol	941	53,2	5,00
fenol	1091	45,9	5,00
guajakol	1126	44,4	5,00
p-kresol	998	50,1	5,00
m-kresol	1135	44,1	5,00
o-kresol	935	53,5	5,00

Ze zásobního směšného roztoku byl připraven pracovní směšný roztok (PSR) odpipetováním 1 ml ZSR do 25 ml odměrné baňky a následným doplněním vodou s přídavkem kyseliny octové (1 obj. %) a kyseliny askorbové (1 mg/ml) po rysku.

Byl připraven obohacovací směšný roztok, který byl použit k přípravě obohacených roztoků reálných vzorků, použitých k vypočtení přesnosti a správnosti metody. Koncentrovaný směšný roztok pro obohacování (Spike 1) byl připraven odpipetováním přesného objemu jednotlivých analytů do 25 ml odměrné baňky, která byla následně doplněna po rysku vodou s přídavkem kyseliny octové (1 obj. %) a kyseliny askorbové (1 mg/ml). Pipetované objemy analytů pro přípravu koncentrovaného obohacovacího směšného roztoku jsou uvedeny v Tab. 10.

Tabulka 10: Přehled přípravy koncentrovaného obohacovacího směsného roztoku

Analyt	Koncentrace zásobních roztoků (mg/l)	Objem (μl)	Koncentrace Spike1 (mg/l)
hydrochinon	968	129,1	5,00
resorcinol	1038	48,2	2,00
pyrokatechol	941	132,9	5,00
fenol	1091	114,6	5,00
guajakol	1126	44,4	2,00
p-kresol	998	25,1	1,00
m-kresol	1135	22,0	1,00
o-kresol	935	53,5	2,00

Pracovní obohacovací roztok (Spike 2) byl připraven odpipetováním 1 ml Spike 1 do 10 ml odměrné baňky a následným doplněním vodou s přidavkem kyseliny octové (1 obj. %) a kyseliny askorbové (1 mg/ml) po rysku. Koncentrace analytů v pracovním obohacovacím roztoku jsou uvedeny v Tab. 11.

Tabulka 11: Koncentrace analytů v pracovním obohacovacím roztoku

Analyt	Koncentrace Spike2 (μg/l)
hydrochinon	500
resorcinol	200
pyrokatechol	500
fenol	500
guajakol	200
p-kresol	100
m-kresol	100
o-kresol	200

4.5 Příprava roztoků kalibrační křivky

Pro analýzu roztoků kalibrační křivky byly připraveny roztoky o 11 koncentracích ve 4 nezávislých opakováních. Tyto roztoky byly připraveny napipetováním vypočteného množství vody s přidavkem kyseliny octové (1 obj. %) a kyseliny askorbové (1 mg/ml) do vialky z čirého skla a následným dávkováním pracovního směsného roztoku (PSR) a roztoku vnitřního standardu (PVS) pro roztoky kalibrační křivky pomocí dávkovacích stříkaček Hamilton. Objemy vody s přidavkem kyseliny octové a kyseliny askorbové (v Tab. 12 jako „rozp.“), PSR a PVS pro jednotlivé koncentrace roztoků kalibrační křivky jsou uvedeny v Tab. 12.

Tabulka 12: Přehled přípravy roztoků kalibrační křivky

Koncentrační roztok	Objem rozp. (μl)	Objem PSR (μl)	Objem PVS (μl)	Koncentrace analytů (μg/l)	Koncentrace VS (μg/l)
1	895	5	100	1,00	1000
2	890	10	100	2,00	1000
3	875	25	100	5,00	1000
4	850	50	100	10,0	1000
5	800	100	100	20,0	1000
6	725	175	100	35,0	1000
7	650	250	100	50,0	1000
8	525	375	100	75,0	1000
9	400	500	100	100	1000
10	275	625	100	125	1000
11	150	750	100	150	1000

4.6 Fluorescenční detekce

Nejprve byla proměřena absorpční spektra analytů. Pro každý analyt byly vybrány excitační vlnové délky jako maxima absorpčních spekter. Následně byla proměřena emisní spektra jednotlivých analytů, při konstantní excitační vlnové délce. Měřením emisního spektra bylo získáno maximum - hodnota emisní vlnové délky pro následné měření excitačního spektra. Excitační spektra byla proměřena za konstantní emisní vlnové délky pro každý analyt. Z těchto spekter byly určeny excitační maxima. Měření excitačních a emisních spekter umožnilo vhodnou volbu excitační a emisní vlnové délky a emisního filtru. Vhodný emisní filtr byl

zvolen mezi excitační a emisní vlnovou délkou, případně pod excitační vlnovou délkou. Senzitivita byla nastavena za účelem co nejnižšího vlivu šumu a zároveň aby nedocházelo k přesycení detektoru (Franz a Jendreizik 2010; Pilík 2018).

4.7 Extrakce

Výběr způsobu extrakce a složení extrakčního činidla proběhl na základě literární rešerše (Wu et al. 2012; Moldoveanu a Kiser 2007; Demirci A a Morkan B 2013). Každý cigaretový nedopalek byl zvážen a pomocí pinzety přenesen do extrakční nádoby o objemu 500 ml vyrobené z tmavého skla. Následně bylo přidáno 500 ml vody s přídavkem kyseliny octové (1 obj. %) a kyseliny askorbové (1 mg/ml) a 0,5 ml ZVS. Extrakční nádoba byla přenesena na orbitální třepačku s nastavenou rychlostí 200 otáček/min. Extrakce probíhala 24 hodin. Po extrakci byl odebrán 1 ml extrakčního činidla do mikrozkušavky. Vzorek byl následně centrifugován relativní centrifugační silou $20627\times g$ po dobu 15 minut. Do krimpovací vialky bylo odebráno 100 μ l vzorku a přidáno 900 μ l vody s přídavkem kyseliny octové (1 obj. %) a kyseliny askorbové (1 mg/ml). Pro vzorky obohacené přídavkem standardů bylo do krimpovací vialky odebráno 100 μ l vzorku, přidáno 100 μ l pracovního obohacovacího roztoku a 800 μ l vody s přídavkem kyseliny octové (1 obj. %) a kyseliny askorbové (1 mg/ml).

5 Výsledky a diskuze

Tato kapitola je věnována popisu a zhodnocení vývoje metody, optimalizace metody a jejího použití k analýze reálných vzorků. Nejprve proběhla optimalizace chromatografické separace osmi vybraných fenolů a vnitřního standardu, při které byly sledovány retenční časy jednotlivých analytů, separace píků a symetrie píků. Pozornost byla věnována hlavně výběru optimální stacionární fáze a složení mobilní fáze. Tato část práce byla prováděna s použitím UV detekce. Po optimalizaci chromatografické separace bylo možné nalézt optimální podmínky fluorescenční detekce. Pro všechny analyty byly nalezeny emisní a excitační vlnové délky. Na jejich základě byly určeny vhodné optické filtry.

Při optimalizaci extrakce byl volen způsob a délka extrakce, typ a objem extrakčního činidla. V průběhu celé práce byla věnována zvýšená pozornost stabilitě hydrochinonu. Validační parametry sledované při validaci metody byly mez detekce a mez stanovitelnosti metody, linearita, přesnost a správnost.

Po validaci byla analytická metoda použita ke stanovení vybraných fenolů v nedopalcích různých značek cigaret.

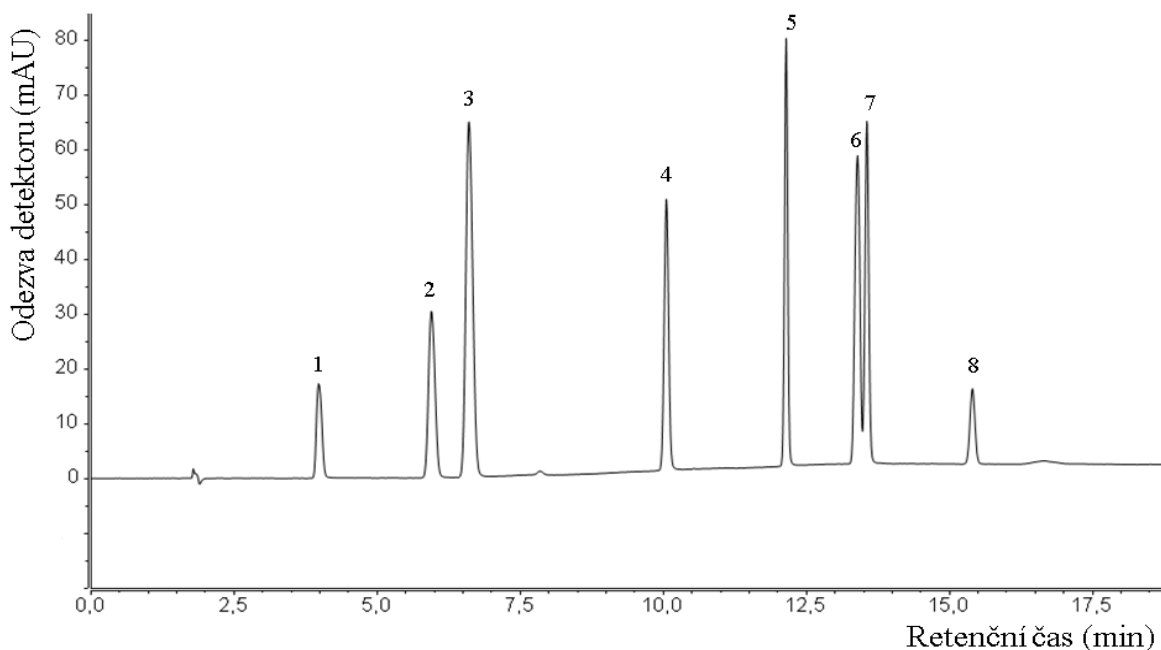
5.1 Optimalizace chromatografické separace

5.1.1 Kolona Kinetex F5 (150x3,0 mm; 2,6 μm)

Jako první byla při optimalizaci chromatografické separace použita kolona Kinetex F5 s PFP (pentafluorofenyl) stacionární fází. Tato kolona byla použita na základě literární rešerše (Wu et al. 2012). Na této koloně byly použity 4 kombinace mobilních fází (viz kapitola 4.3).

Mobilní fáze A byla voda okyselená kyselinou octovou nebo kyselinou trifluoroctovou. Mobilní fáze B byl methanol okyselený kyselinou octovou nebo kyselinou trifluoroctovou, acetonitril a acetonitril okyselený kyselinou trifluoroctovou. Teplota kolonového prostoru byla optimalizována v rozsahu 25–45 °C. Separace probíhala při gradientové eluci, gradient byl v průběhu měněn. Při prvních analýzách bylo zjištěno pořadí analytů v chromatogramu a problematické parametry analytů. Na základě těchto zjištění byly jednotlivé kroky optimalizace vedeny snahou dosáhnout co nejvyššího kapacitního poměru hydrochinonu, separace resorcinolu a pyrokatecholu, separace izomerů kresolu a snížení retence vnitřního standardu 4-chlorfenolu.

Se snižováním teploty docházelo k zvýšení kapacitního poměru hydrochinonu, ale k zhoršení separace resorcinolu a pyrokatecholu a nemělo zásadní vliv na separaci kresolů. Hydrochinon byl na koloně zadržován více při použití kyselější mobilní fáze. Při analýzách s mobilní fází modifikovanou kyselinou trifluoroctovou byl kapacitní poměr hydrochinonu vyšší než při použití kyseliny octové jako modifikátoru MF. Pro nižší obsah mobilní fáze s vyšší eluční silou (MFB) docházelo k mírnému zvyšování kapacitního poměru, ale ke zhoršení symetrie píků analytů. Pro kolonu Kinetex F5 se nepodařilo najít optimální podmínky, při kterých by došlo k dostatečnému kapacitnímu poměru hydrochinonu a současně separace analytů kresolu na základní linii. Nejvyšší kapacitní poměr hydrochinonu, kterého se podařilo dosáhnout, byl 1,5. Píky třech izomerů kresolu se nepodařilo rozdělit na základní linii. Faktor asymetrie pro jednotlivé analyty byl v rozmezí 1,0–1,2. Na Obr. 1 je chromatogram analýzy s gradientovou elucí za použití MFA₄ a MFB₄, s lineárním zvýšením obsahu MFB od 0 % do 25 %. Průtok byl nastaven na 0,4 ml/min. Teplota kolonového prostoru byla nastavena na 40 °C. Objem nástřiku vzorku při analýze byl 5 µl. Vlnová délka UV detekce při analýze byla 265 nm.



Obrázek 1: Chromatogram analýzy na koloně Kinetex F5

(pořadí píků - (1) hydrochinon, (2) resorcinol, (3) pyrokatechol, (4) fenol, (5) guajakol, (6) p+m-kresol, (7) o-kresol, (8) 4-chlorfenol (VS) ; c = 1 mg/l)

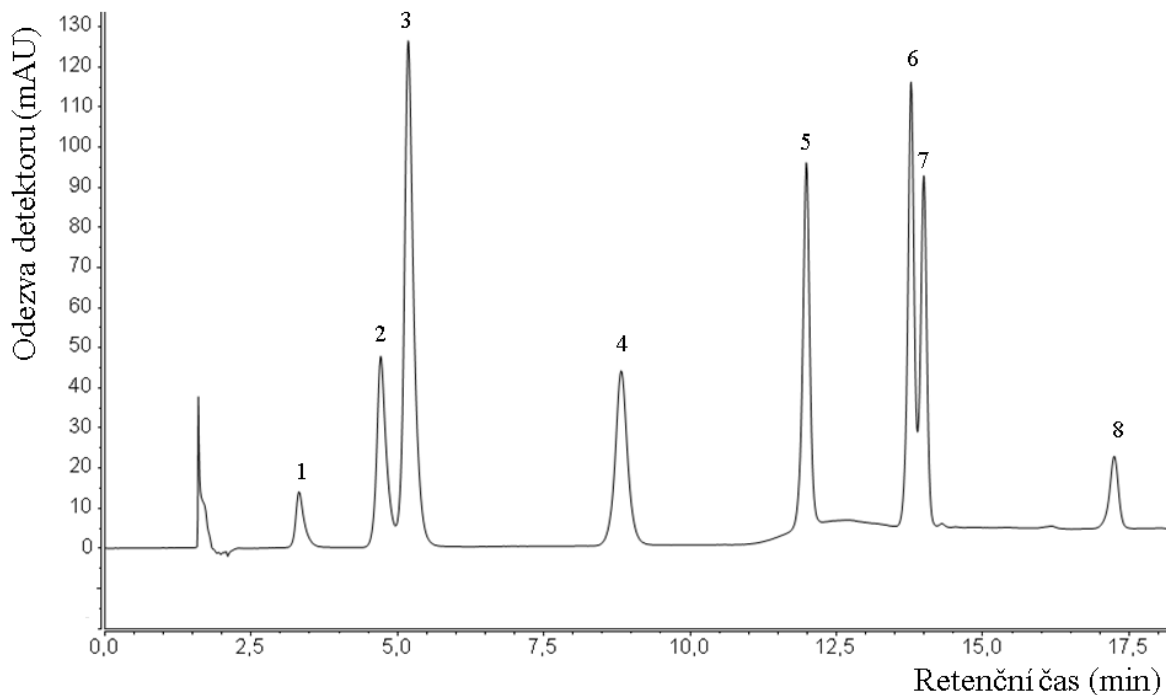
V publikaci (Wu et al. 2012), na základě které byla vybrána kolona s PFP stacionární fází, se podařilo rozdělení tří izomerů kresolu na jednotlivé píky, což se v této práci nepodařilo. V publikaci byla použita kolona s plně porézními částicemi stacionární fáze, v této práci byla naopak použita kolona s povrchově porézními (core-shell) částicemi.

5.1.2 Kolona Chromservis Astra DM (150x3,0 mm; 3,0 μm)

Kolona Chromservis Astra DM byla použita na základě doporučení výrobce. Pro tuto kolonu byly použity 4 kombinace mobilních fází (viz kapitola 4.3).

Mobilní fáze A byla voda okyselená kyselinou octovou nebo mravenčanový pufr, mobilní fáze B byl methanol s nebo bez přídavku kyseliny octové a acetonitril s přídavkem kyseliny octové. Teplota kolonového prostoru byla optimalizována v rozsahu 25–35 °C. Separace probíhala při gradientové eluci, gradient byl v průběhu měněn. Pořadí píků na této koloně bylo schodné jako na koloně Kinetex F5. Docházelo ke koeluci pyrokatecholu s resorcinolem a izomerů kresolu. Jednotlivé kroky optimalizace byly opět vedeny snahou dosáhnout co nejvyššího rozlišení těchto analytů, kapacitního poměru hydrochinonu a snížení retence vnitřního standardu 4-chlorfenolu.

S rostoucím obsahem MFB (z 22 na 12 %) klesal kapacitní poměr hydrochinonu. Při vyšší teplotě v kolonovém prostoru docházelo k zlepšení separace resorcinolu a pyrokatecholu, ale k zhoršení separace izomerů kresolu. Při použití acetonitrilu v MFB byly oproti použití methanolu píky lépe separovány, ale snížil se kapacitní poměr hydrochinonu. Pro kolonu Chromservis Astra DM se nepodařilo najít optimální podmínky, při kterých by došlo k dostatečnému kapacitnímu poměru analytu s nejnižším retenčním časem. Nejvyšší kapacitní poměr, kterého se podařilo dosáhnout byl 0,7. Rovněž se nepodařila separace píků třech izomerů kresolu a dvojice píků resorcinolu a pyrokatecholu. Tyto píky se nepodařilo rozdělit na základní linii. Faktor asymetrie pro jednotlivé analyty byl v rozmezí 0,87–1,5. Na Obr. 2 je chromatogram, analýzy s gradientovou elucí za použití MFA₂ a MFB₃, s lineárním zvýšením obsahu MFB od 12 do 45 %. Teplota kolonového prostoru při analýze byla nastavena na 35 °C a průtok MF byl 0,5 ml/min. Objem nástřiku při analýze byl 10 μl . Vlnová délka UV detekce při analýze byla 265 nm.



Obrázek 2: Chromatogram analýzy na koloně Chromservis Astra DM

(pořadí píků - (1) hydrochinon, (2) resorcinol, (3) pyrokatechol, (4) fenol, (5) guajakol, (6) p+m-kresol, (7) o-kresol, (8) 4-chlorfenol (VS); c=1 mg/l)

Optimalizace separace fenolů na stacionární fázi Astra DM byla prováděna i v laboratořích výrobce stacionární fáze. Firma Chromservis měla zájem provést hlubší analýzu možnosti separace o-, m- a p-kresolu na nově vyvinuté patentované stacionární fázi s dvojitou modifikací. Pro separaci byl použit jako mobilní fáze 2mM mravenčanový pufr v kombinaci s acetonitrilem, voda s 0,1 obj.% TFA a acetonitril s 0,1 obj.% TFA. Byla použita jak isokratická eluce tak gradientová eluce, separace probíhala při 25 °C nebo 35 °C. Na základě poskytnutých výsledků lze konstatovat, že se vždy ve skupině kresolů podařilo maximálně oddělit o-kresol od píku obsahujícího m-kresol a p-kresol, v horším případě byl jeden slitý pík (Chromservis s.r.o. 2022).

V laboratořích firmy Chromservis byla testována rovněž separace vybraných fenolů na koloně s bifenylovou stacionární fázi a s mobilní fázi na bázi methanolu a vody. Pro tuto kolonu nebylo dosaženo dostatečného kapacitního poměru pro hydrochinon. Naopak 4-chlorfenol měl v porovnání s ostatními analyty retenční čas nepřiměřeně vysoký. Při snaze o separaci skupiny kresolů docházelo ke koeluci hydrochinonu a resocinonu a bylo dosaženo maximálně oddělení o-kresolu od píku obsahujícího m-kresol a p-kresol (Chromservis s.r.o. 2022).

5.1.3 Kolona Phenomenex Luna C18 (250x4,6 mm; 5,0 µm)

Kolona Phenomenex Luna C18 byla použita na základě literární rešerše (Moldoveanu a Kiser 2007; Demirci A a Morkan B 2013). Pro tuto kolonu byly použity 2 kombinace mobilních fází (viz kapitola 4.3).

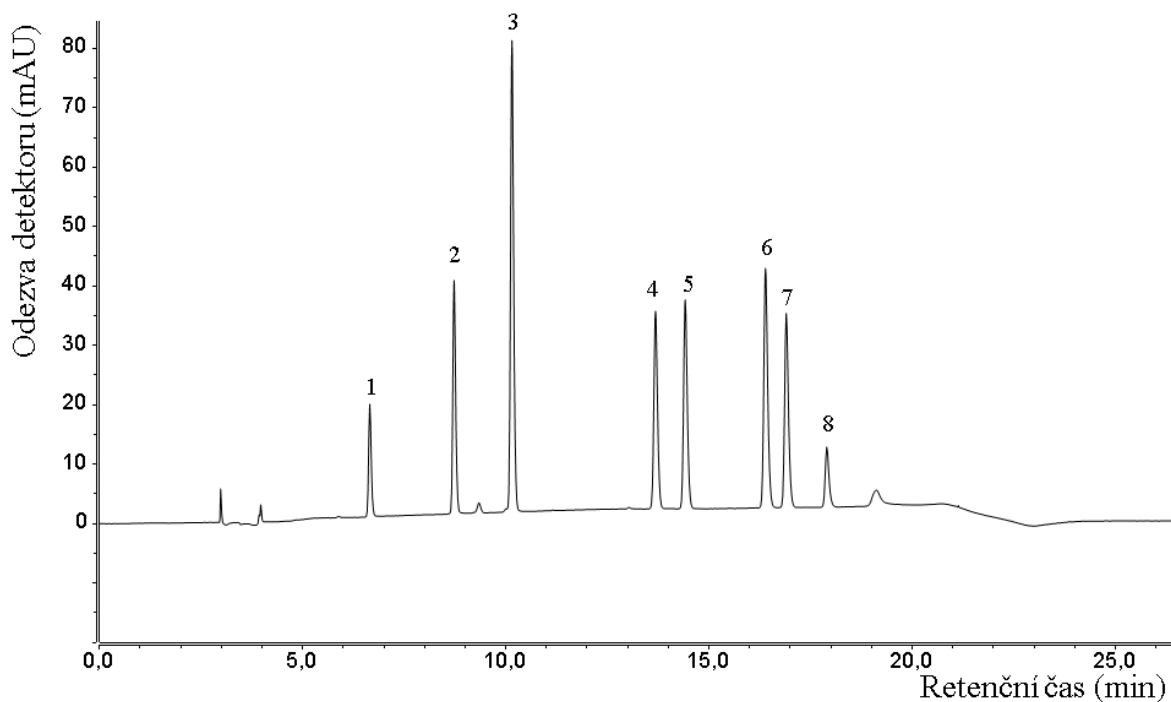
Mobilní fáze A byla voda okyselená kyselinou trifluoroctovou, mobilní fáze B byl methanol okyselený kyselinou trifluoroctovou nebo acetonitril okyselený kyselinou trifluoroctovou. Teplota kolového prostoru byla nastavena na 35 °C. Separace probíhala při gradientové eluci, gradient byl v průběhu optimalizace měněn. Na základě informací získaných při předchozích analýzách byly jednotlivé kroky optimalizace vedeny snahou dosáhnout co nejvyššího kapacitního poměru hydrochinonu, separace resorcinolu a pyrokatecholu, separace kresolů a snížení retence vnitřního standardu 4-chlorfenolu.

Při použití metanolu nedocházel k separaci třech izomerů kresolů. Při použití acetonitrilu se podařilo oddělit pík o-kresolu od píku směsi p-kresolu a m-kresolu. Z analýz prováděných na této koloně byla vybrána nejvhodnější metoda na základě hodnoty kapacitního poměru hydrochinonu a rozlišení jednotlivých píků. Podařilo se dosáhnout kapacitního poměru hydrochinonu pouze 1, ale z analýz reálných vzorků bylo zjištěno, že nedochází k významné interferenci analytu s matricí a kapacitní poměr je tudíž pro účely této práce dostatečný. Nepodařilo se rozdělit p-kresol a m-kresol. Tyto analyty vytvářely jeden symetrický pík, dále byly stanovovány jako suma. Nejnižší hodnota rozlišení byla 2,9 pro píky analytů o-kresolu a p+m-kresolu. Faktor asymetrie pro jednotlivé analyty byl v rozmezí 1,2–1,3. Parametry výsledné analýzy jsou uvedeny v Tab. 13.

Tabulka 13: Podmínky výsledné analýzy

Kolona	Phenomenex Luna C18 (250x4,6 mm; 5,0 µm)
MFA	voda s přídavkem 0,1 obj.% kyseliny trifluoroctové
MFB	acetonitril s přídavkem 0,1 obj.% kyseliny trifluoroctové
Průtok	1
Teplota (°C)	35
Gradient	0. až 18. minuta z 5 na 60 % MFB, 18. až 29. minuta stabilizace při 5 % MFB

Chromatogram výsledné analýzy je zobrazen na Obr.3. Vlnová délka UV detekce při analýze byla 265 nm.



Obrázek 3: Chromatogram výsledné analýzy při optimálních podmínkách separace (pořadí píků - (1) hydrochinon, (2) resorcinol, (3) pyrokatechol, (4) fenol, (5) guajakol, (6) p+m-kresol, (7) o-kresol, (8) 4-chlorfenol (VS) ; c=1 mg/l)

V publikaci, kde byla použita kolona s C18 stacionární fází pro rozdělení těchto fenolů, se také nepodařilo rozdělit p-kresol a m-kresol na dva samostatné píky (Moldoveanu a Kiser 2007). V publikaci byla použita 15 cm dlouhá kolona. Jako MFA byla použita voda s přídavkem 1% kyselinou octovou a MFB byl acetonitril s přídavkem 1% kyseliny octové. Obsah MFB na začátku analýzy byl 4 % a lineárně se zvyšoval na 31 % v 10,5 min a 100 % v 15,5 min. V čase analýzy 20 min klesl obsah MFB na 4 % a probíhala stabilizace do 27 min. Průtok MF byl nastaven na 1,4 ml/min (Moldoveanu a Kiser 2007).

5.2 Nastavení fluorescenčního detektoru

Optimalizace fluorescenční detekce proběhla za účelem získání co nejvyššího poměru signálu analytu k šumu na základní linii.

Pro hydrochinon byla zvolena excitační vlnová délka na 289 nm a emisní vlnová délka na 330 nm. Pro ostatní analyty byla excitační vlnová délka nastavena v rozmezí 271–275 nm a emisní vlnová délka v rozmezí 300–313 nm. Pro vnitřní standard byla zvolena excitační vlnová délka 229 nm a emisní vlnová délka na 312 nm. Tyto výsledky jsou srovnatelné

s vlnovými délkami udávanými literaturou (Moldoveanu a Kiser 2007; Wu et al. 2012). V literatuře byly vlnové délky při detekci rozděleny do několika oken, v této práci bylo jedno společné okno použito pro izomery kresolů. Ostatní analyty měly samostatná okna. Citlivost detektoru byla nastavena pro jednotlivé analyty na hodnotu 6 resp. 8. Nastavení citlivosti bylo provedeno po optimalizaci objemu nástřiku (viz kapitola 5.3). Pro všechny analyty byl nastaven emisní filtr o vlnové délce 280 nm. Nastavené parametry fluorescenční detekce jsou uvedeny v Tab. 14.

Tabulka 14: Parametry fluorescenční detekce

Analyt	Retenční čas (min)	Excitační λ (nm)	Emisní λ (nm)	Citlivost (1)	Emisní filtr (nm)
hydrochinon	6,7	289	330	8	280
resorcinol	8,7	275	306	8	280
pyrokatechol	10,1	275	313	8	280
fenol	13,7	271	300	6	280
guajakol	14,4	274	310	8	280
p+m-kresol	16,4	273	302	6	280
o-kresol	16,9	273	302	6	280
4-chlorfenol	17,9	229	312	6	280

5.3 Optimalizace objemu nástřiku a široká kalibrace

Při optimalizaci objemu nástřiku vzorku byl sledován vliv velikosti nástřiku na symetrii píků. Byly zkoušeny objemy nástřiku 10, 25, 50, 75 a 100 μl při koncentraci směsného roztoku 1 mg/l. Byl vybrán nástřik 100 μl . Při tomto nástřiku byly hodnoty faktoru asymetrie pro všechny analyty v rozsahu 1,2–1,3. Maximální objem nástřiku následně umožnil dosažení co nejnižší hodnoty meze stanovitelnosti. Nízká hodnota meze stanovitelnosti je žádoucí pro analýzu vzorků s nízkým obsahem analytu. Pro koncentrované vzorky je výhodou případná možnost jejich ředění mobilní fází. Tím dochází k omezení či potlačení případného nežádoucího vlivu matrice vzorku.

Pro určení rozsahu kalibračních roztoků byla provedena široká kalibrace v rozsahu 0,5–500 $\mu\text{g/l}$. Z široké kalibrace byl vybrán rozsah kalibračních roztoků 1–150 $\mu\text{g/l}$ na základě přesycení detektoru pro horní hranici kalibrace a poměru signálu k šumu pro dolní hranici kalibrace. Koncentrace VS v kalibračních roztocích byla nastavena tak, aby plocha píku VS byla srovnatelná s plochou píků analytů při vyšších koncentracích.

5.4 Optimalizace extrakce

Při optimalizaci extrakce byla věnována pozornost způsobu extrakce, typu a množství extrakčního činidla a době extrakce.

Byly zkoušeny extrakce ultrazvukem a na třepačce. Vzhledem k době, která byla pro extrakci potřeba a náročnosti extrakce ultrazvukem (udržování konstantní teploty), byla vybrána extrakce na třepačce.

Jako extrakční činidlo byla zkoušena voda s přidavkem 1 obj.% kyseliny octové (Wu et al. 2012). Druhým použitým činidlem byla voda s přidavkem 1 obj.% kyseliny octové a kyseliny askorbové (1 mg/ml) (Moldoveanu a Kiser 2007). Vybráno bylo činidlo s přidavkem kyseliny octové a kyseliny askorbové. Bez přidavku kyseliny askorbové docházelo k rozpadu hydrochinonu, pravděpodobně oxidaci (Sirajuddin et al. 2007). Extrakce probíhala v objemu 500 ml extrakčního činidla.

Proběhla analýza vzorků odebraných v časech extrakce 1, 2, 3, 4, 10, 24, 48 hodin. Před analýzou byly vzorky odstředěny na centrifuze a následně ředěny 10krát. Doba extrakce byla zvolena na základě výsledků nejpomaleji extrahujících se analytů, tak aby se podařilo extrahovat minimálně 98 % každého analytu. Jako 100 % bylo považováno množství analytu ve vzorku extraktu s délkou extrakce 48 hodin. V Tab. 15 jsou uvedena množství extrahovaných analytů v jednotlivých časech extrakce.

Tabulka 15: Optimalizace délky extrakce

Analyt	Délka extrakce (hod)						
	1	2	3	4	10	24	48
	Vyextrahované množství (%)						
hydrochinon	80	85	87	89	94	101	100
resorcinol	-	-	-	-	-	-	-
pyrokatechol	75	80	82	85	90	99	100
fenol	70	80	85	89	98	100	100
guajakol	67	76	82	86	99	99	100
p+m-kresol	57	66	73	78	91	99	100
o-kresol	55	67	73	78	92	98	100

Již po jedné hodině bylo vyextrahováno 55–80 % analytů, rychlost extrakce následně klesala. Pro pyrokatechol a fenol bylo dosaženo 98 % vyextrahovaného množství, již po 10 hodinách. Mírně větší vyextrahované množství hydrochinonu po 24 hodinách než po 48 hodinách je pravděpodobně důsledkem oxidace tohoto analytu. Na základě výsledků byla

doba extrakce nastavena na 24 hodin. Ve vzorcích cigaretových nedopalků se nepodařilo stanovit resorcinol.

5.5 Validace metody

Metoda byla validována pomocí validačních parametrů, kterými byly mez detekce a mez stanovitelnosti, linearita a kalibrační rozsah, přesnost a správnost. Kritéria přijatelnosti byla použita dle Association of Analytical Communities (AOAC 2016) a Food and Drug Administration (FDA 2018).

Pro nalezení mezí detekce a stanovitelnosti a lineární oblasti v závislosti odezvy detektoru na koncentraci analytu pro jednotlivé analyty byly připraveny roztoky kalibrační křivky v rozsahu 1–150 µg/l ve 4 opakováních (viz kapitola 4.5).

Pro výpočet mezí detekce a stanovitelnosti byly použity stanovené hodnoty poměru signálu a šumu při analýze kalibračních roztoků a koncentraci 1, resp. 2 µg/l. Primární data jsou uvedena v Přílohách A a B. Instrumentální meze detekce (LOD_i) byly pro jednotlivé analyty stanoveny v rozmezí 0,33–0,62 µg/l a instrumentální meze stanovitelnosti (LOQ_i) v rozmezí 1,1–2,3 µg/l. Kalibrační body s koncentracemi analytů nižšími než instrumentální meze stanovitelnosti pro jednotlivé analyty byly vyřazeny z rozsahu metody.

Rozsah metody byl určen na základě výpočtu rozdílu (diference) mezi teoretickou a vypočtenou hodnotou kalibračního roztoku. Primární data jsou uvedena v Přílohách C až I. Hodnota difference neodpovídala kritériu přijatelnosti pro kalibrační bod hydrochinonu o koncentraci 2 µg/l, což byl nejnižší kalibrační bod hydrochinonu nad instrumentální mezi stanovitelnosti. Průměrná hodnota difference pro tento kalibrační bod byla 44,3 %. Tento bod byl tedy z koncentračního rozsahu pro hydrochinon vyřazen. Pro všechny ostatní analyty odpovídaly hodnoty difference kritériím přijatelnosti (méně než 20 % pro nejnižší kalibrační bod, méně než 15 % pro ostatní kalibrační body). Dalším parametrem omezujícím rozsah metody bylo nasycení fluorescenčního detektoru. Tento parametr snižoval horní hranici kalibračního rozsahu pro některé analyty (hydrochinon, fenol, guajakol, p+m-kresol a o-kresol).

Korelační koeficienty pro jednotlivé analyty byly v rozmezí 0,9988–1,000 a pro všechny analyty odpovídaly kritériu přijatelnosti (>0,9900). QC koeficienty pro jednotlivé analyty byly v rozmezí 0,797–4,24 %, pro všechny analyty odpovídaly kritériu přijatelnosti (<5,0 %).

Korelační koeficient a QC koeficienty jsou uvedeny v Tab. 16.

Tabulka 16: Korelační koeficienty a QC koeficienty

Analyt	Korelační koeficient (1)	QC koeficient (%)
hydrochinon	0,9988	3,71
resorcinol	0,9999	0,926
pyrokatechol	0,9999	0,930
fenol	1,000	0,797
guajakol	0,9989	4,24
p+m-kresol	1,000	0,851
o-kresol	0,9999	0,856

Metoda byla lineární v rozsahu 5–100 µg/l pro hydrochinon, 5–150 µg/l pro resorcinol, 5–150 µg/l pro pyrokatechol, 2–125 µg/l pro fenol, 2–125 µg/l pro guajakol, 2–150 µg/l pro sumu p+m-kresolu a 5–125 µg/l pro o-kresol. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 17. Dle literatury byl rozsah metody při použití FLD detekce v jednotkách až tisícovkách mikrogramů na litr (Wu et al. 2012) respektive desítkách až tisícovkách mikrogramů na litr (Moldoveanu a Kiser 2007). V publikaci stanovující fenoly v přírodních vodách pomocí HPLC s fluorescenční detekcí byly uvedeny rozsahy metody v desetínách až stovkách mikrogramů na litr (Liu et al. 2021). Rozsahy uváděné v literatuře jsou o jeden až dva řády širší než rozsahy stanovené v této práci.

Z LOD_i a nejnižších bodů kalibračních rozsahů byly po zahrnutí procesu extrakce a ředění spočteny meze detekce metody (LOD_m) a meze stanovitelnosti metody (LOQ_m). Hodnoty LOD_i byly stanoveny v rozmezí 1,7–3,1 µg/cig. a LOQ_m v rozmezí 10–25 µg/cig. V literatuře zabývající se stanovením fenolů v cigaretovém kouři pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s fluorescenční detekcí se meze metody pohybovaly v rozmezí setin až jednotek mikrogramů na cigaretu (Wu et al. 2012; Moldoveanu a Kiser 2007).

Pro vyhodnocení přesnosti a správnosti byly provedeny analýzy roztoků reálných vzorků s přidavkem pracovního obohacovacího roztoku a bez přidavku pracovního obohacovacího roztoku v 6 opakováních (Kahoun 2022; Nováková a Douša 2021a). Vzhledem k nečistotám v mobilní fázi při analýze roztoků pro přesnost a správnost nebylo možné určit tyto parametry pro hydrochinon a sumu p+m-kresolu. Vyhodnocení přesnosti a správnosti pro tyto analyty proběhlo z analýz roztoků reálných vzorků s přidavkem pracovního obohacovacího roztoku a bez pracovního obohacovacího roztoku pouze ve 3 opakováních. Podklady pro výpočet jsou uvedeny v Přílohách J a K. Správnost metody pro

jednotlivé analyty byla v rozmezí 86–104%. Bylo tedy splněno kritérium přijatelnosti pro správnost. Přesnost metody pro jednotlivé analyty byla v rozmezí 0,8–2,5%. Bylo tedy splněno kritérium přijatelnosti pro přesnost. Nejhorších hodnot QC koeficientu, přesnosti i správnosti bylo dosaženo pro guajakol. Pravděpodobným důvodem je mírné chvostování píku tohoto analytu. Faktor asymetrie pro guajakol činil 1,27. Koncentrace resorcinolu v reálných vzorcích byla pod mezí detekce a nebylo tudíž možné vypočítat přesnost a správnost.

Shrnutí výsledků validace je uvedeno v Tab. 17.

Tabulka 17: Parametry validace metody

Analyt	LOD _m (µg/cig.)	LOQ _m (µg/cig.)	Kalibrační rozsah (µg/l)	Přesnost (%)	Správnost (%)
hydrochinon	1,7	25	5–100	1,0	103
resorcinol	2,2	25	5–150	-	-
pyrokatechol	3,1	25	5–150	1,5	104
fenol	2,3	10	2–125	0,8	103
guajakol	2,1	10	2–125	2,5	86
p+m-kresol	2,0	10	2–150	1,3	98
o-kresol	3,0	25	5–125	1,9	92

5.6 Stanovení fenolů v reálných vzorcích

Koncentrace vybraných fenolů byla určena v nedopalcích 5 různých značek, které byly před analýzou uchovávány při teplotě -18 °C několik dní až několik měsíců.

Byla provedena analýza čistého nedopalku. Při této analýze nebyly stanoveny fenolické sloučeniny, čímž byl potvrzen předpoklad, že fenoly do nedopalku přecházejí při kouření.

Koncentrace fenolů v nedopalcích cigaret značky Camel byly stanovovány ve 3 nedopalcích. Dva z těchto nedopalků byly uchovávány po dobu pěti dní, následně proběhla extrakce a analýza extraktu v 6 opakováních. Třetí nedopalek cigarety značky Camel byl uchováván po dobu šesti dní a následně analyzován ve 3 opakováních. Z výsledků těchto analýz byla určena přesnost a správnost metody (viz kapitola 5.5).

Koncentrace fenolů v nedopalcích cigaret značky Viceroy byly stanovovány ve 3 nedopalcích. Tyto nedopalky byly uchovány po dobu 7 dní a následně analyzovány ve 3 opakováních.

Další analyzovaný nedopalek byl značky Marlboro. Nedopalek byl uchován po dobu 3 dní a následně analyzován ve 3 opakováních.

Dále byly analyzovány 2 nedopalky cigaret značky Chesterfield. Jednalo se o Chesterfield blue a Chesterfield red. Vzorky byly uchovány po dobu 3 dní a následně analyzovány ve 3 opakováních.

Koncentrace zapsané v Tab. 18 jsou udávány jako aritmetický průměr koncentrací vypočtených z jednotlivých opakování \pm dvojnásobek směrodatné odchylky pro vzorky analyzované ve 3, respektive 6 opakováních.

Tabulka 18: Koncentrace stanovené v cigaretových nedopalcích

Značka	Doba uchování vzorku	Počet opakování	Koncentrace (µg/cig.)						
			HY	RE	PY	FE	GU	PK+MK	OK
Camel Ž.	6 dní	6	-	< 2,20	130,9 ± 4,0	208,1 ± 3,3	34,4 ± 1,7	-	34,0 ± 1,3
Camel Ž.	6 dní	6	-	< 2,20	133,7 ± 4,9	208,1 ± 4,1	32,1 ± 1,9	-	36,1 ± 1,0
Camel Ž.	5 dní	3	84,7 ± 1,8	< 2,20	96,7 ± 2,9	143,9 ± 1,4	22,57 ± 0,76	38,19 ± 0,98	26,72 ± 0,34
Viceroy	7 dní	3	146,0 ± 3,0	< 2,20	204,1 ± 3,7	243,9 ± 6,2	35,23 ± 0,73	62,5 ± 1,9	37,79 ± 0,52
Viceroy	7 dní	3	119,5 ± 4,0	< 2,20	166,2 ± 9,2	199 ± 13	29,2 ± 1,8	53,3 ± 3,8	30,8 ± 4,5
Viceroy	7 dní	3	157,5 ± 5,6	< 2,20	221,2 ± 2,9	267,8 ± 6,7	39,6 ± 1,2	66,4 ± 3,9	42,4 ± 1,1
Marlboro	3 dny	3	41,71 ± 0,49	< 2,20	45,6 ± 1,4	64,6 ± 1,6	10,30 ± 0,29	20,77 ± 0,68	11,27 ± 0,60
Chesterfield r.	3 dny	3	49,8 ± 1,5	< 2,20	54,0 ± 2,5	80,6 ± 2,0	12,61 ± 0,97	24,50 ± 0,66	14,93 ± 0,34
Chesterfield b.	3 dny	3	67,5 ± 3,6	< 2,20	95,52 ± 0,38	144,5 ± 3,8	26,03 ± 0,68	41,0 ± 1,7	28,6 ± 1,4

Koncentrace resorcinolu byla pro všechny nedopalky stanovena pod mezí detekce. Koncentrace fenolů v cigaretových nedopalcích byly stanoveny v rozmezí 41,71–157,5 $\mu\text{g}/\text{cig.}$ pro hydrochinon; 45,6–221,2 $\mu\text{g}/\text{cig.}$ pro pyrokatechol; 64,6–267,8 $\mu\text{g}/\text{cig.}$ pro fenol; 10,30–39,6 $\mu\text{g}/\text{cig.}$ pro guajakol; 20,77–66,4 $\mu\text{g}/\text{cig.}$ pro sumu p+m-kresolů a 11,27–42,4 $\mu\text{g}/\text{cig.}$ pro o-kresol. Rozdíl koncentrací jednotlivých analytů mezi nedopalkem značky Marlboro (nedopalek s nejnižšími koncentracemi) a nedopalkem značky Viceroy (nedopalek s nejvyššími koncentracemi) byl zhruba tři až pěti násobný. V rámci nedopalků jedné značky stejného typu byl rozdíl koncentrací do 53 %.

Při stanovení koncentrací fenolů v cigaretových nedopalcích byly dle literatury stanoveny koncentrace fenolu v rozmezí 9,78–17 $\mu\text{g}/\text{cig.}$ (Demirci A a Morkan B 2013; Venugopal et al. 2021), koncentrace p-kresolu 607 $\mu\text{g}/\text{cig.}$ a koncentrace o-kresolu 2,7 $\mu\text{g}/\text{cig.}$ (Venugopal et al. 2021). V cigaretovém kouři byly koncentrace fenolů vybraných pro tuto práci stanoveny v jednotkách až stovkách mikrogramů na cigaretu (Wu et al. 2012; Moldoveanu a Kiser 2007).

V Tab. 19 jsou uvedeny relativní zastoupení fenolů v cigaretovém nedopalku. Jako 100 % je považována suma koncentrací vybraných kresolů. Koncentrace resorcinolu je brána jako 0 $\mu\text{g}/\text{cig.}$ V Tab. 19 nejsou uvedeny výsledky dvou nedopalků značky Camel, u kterých nebyla určena koncentrace hydrochinonu a sumy p+m-kresolu.

Tabulka 19: Relativní zastoupení fenolů v nedopalku

Značka	Doba uchování vzorku	Počet opakování	Relativní zastoupení (%)					
			HY	PY	FE	GU	PK+MK	OK
Camel Ž.	5 dní	3	20,5	23,4	34,9	5,47	9,25	6,47
Viceroy	7 dní	3	20,0	28,0	33,4	4,83	8,57	5,18
Viceroy	7 dní	3	20,0	27,8	33,3	4,88	8,91	5,15
Viceroy	7 dní	3	19,8	27,8	33,7	4,98	8,35	5,33
Marlboro	3 dny	3	21,5	23,5	33,3	5,30	10,7	5,80
Chesterfield r.	3 dny	3	21,1	22,8	34,1	5,33	10,4	6,31
Chesterfield b.	3 dny	3	16,7	23,7	35,8	6,46	10,2	7,09

Pro nedopalky analyzované v této práci je relativní zastoupení v rozmezí 16,7–21,5% pro hydrochinon; 22,8–28,0 % pro pyrokatechol; 33,3–35,8 % pro fenol; 4,83–6,46 % pro guajakol; 8,57–10,7 % pro p+m-kresol a 5,15–7,09 % pro o-kresol. Nejvíce zastoupený byl fenol, dále pyrokatechol a hydrochinon. Tyto tři analyty tvořili až 85 % všech stanovovaných fenolů.

V cigaretovém kouři bylo dle literatury průměrné relativní zastoupení hydrochinonu 36,1 %; resorcinolu 0,79 %; pyrokatecholu 41,6 %; fenolu 9,27 %; guajakolu 1,58 %; p+m-kresolu 9,74 % a o-kresolu 2,71 % (Wu et al. 2012; Moldoveanu a Kiser 2007). V cigaretovém kouři byl nejvíce zastoupen pyrokatechol, dále hydrochinon a fenol. Suma těchto tří fenolů činila zhruba 87 % všech analytů.

6 Závěr

V této práci byla zavedena metoda pro stanovení vybraných fenolů (fenol, resorcinol, o-kresol, p-kresol, m-kresol, hydrochinon, guajakol a pyrokatechol) v cigaretových nedopalcích pomocí kapalinové chromatografie. Jako vnitřní standard byl použit 4-chlorfenol.

V teoretické části byly sepsány základní informace o fenolických sloučeninách, jejich toxikologické účinky a základní informace o fenolech stanovovaných v této práci. Dále byla shrnuta problematika cigaretových nedopalků. Parametry chromatografické separace vyhodnocované při optimalizaci metody byly kapacitní poměr, rozlišení a faktor asymetrie. Definice těchto parametrů jsou uvedeny v teoretické části. Před vývojem metody byla provedena rešerše publikací, které se zabývaly stanovením fenolických sloučenin. Sledován byl hlavně typ stacionární fáze, složení a gradient mobilní fáze a způsob detekce.

Při optimalizaci chromatografické separace byly použity tři různé chromatografické kolony. Pro každou chromatografickou kolonu bylo použito několik typů složení mobilních fází. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na koloně Phenomenex Luna C18 (250x4,6 mm; 5,0 μm). Použité složení mobilní fáze byla voda s přidavkem 0,1 obj.% kyseliny trifluoroctové (MFA) a acetonitril s přidavkem 0,1 obj.% kyseliny trifluoroctové (MFB). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/min, teplota v kolonovém prostoru byla 35 °C.

Cigaretové nedopalky byly extrahovány po dobu 24 hodin na třepačce. Jako extrakční činidlo byla použita voda s přidavkem 1 obj.% kyseliny octové a kyseliny askorbové (1 mg/ml). Objem extrakčního činidla byl 500 ml.

Pro jednotlivé analyty byla při validaci nalezena mez detekce, mez stanovitelnosti, koncentrační rozsah metody, přesnost a správnost. Metoda byla lineární v koncentračním rozsahu 5–100 $\mu\text{g/l}$ pro hydrochinon, 5–150 $\mu\text{g/l}$ pro resorcinol, 2–150 $\mu\text{g/l}$ pro pyrokatechol, 2–125 $\mu\text{g/l}$ pro fenol, 2–125 $\mu\text{g/l}$ pro guajakol, 2–150 $\mu\text{g/l}$ pro sumu p+m-kresolu a 5–125 $\mu\text{g/l}$ pro o-kresol.

Pomocí zavedené metody byly stanoveny koncentrace analytů v cigaretových nedopalcích pěti různých značek. Koncentrace fenolů v cigaretových nedopalcích byly stanoveny v rozmezí 41,71–157,5 $\mu\text{g/cig.}$ pro hydrochinon; 45,6–221,2 $\mu\text{g/cig.}$ pro pyrokatechol; 64,6–267,8 $\mu\text{g/cig.}$ pro fenol; 10,30–39,6 $\mu\text{g/cig.}$ pro guajakol; 20,77–66,4 $\mu\text{g/cig.}$ pro sumu p+m-kresolů a 11,27–42,4 $\mu\text{g/cig.}$ pro o-kresol. Koncentrace resorcinolu byla při všech analýzách cigaretových nedopalků pod mezí detekce.

Zavedená analytická metoda bude dále využita při sledování rychlosti uvolňování fenolů z cigaretových nedopalků do okolí na základě jejich expozice vnějším podmínkám (vzduch různé teploty, déšť, typ podloží atp.). Rovněž bude snaha testovat možnost zkrácení doby extrakce rozříznutím cigaretového nedopalku.

7 Zdroje

AOAC, 2016. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance.

Dostupné z: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf

BLICKLEY, L. C., CURRIE, J. J. a KAUFMAN, G. D., 2016. Trends and drivers of debris accumulation on Maui shorelines: Implications for local mitigation strategies. *Marine Pollution Bulletin*. **105**(1), 292-298. Dostupné z: doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2016.02.007

DEMIRCI, A. a MORKAN, B., 2013. Analysis of Phenol in Cigarette Filter Tar Using QuEChERS Sample Preparation and High-Performance Liquid Chromatography/UV Detection System. *Asian Journal of Chemistry*. **25**(12), 6531-6534.

Dostupné z: <https://asianpubs.org/index.php/ajchem/article/view/7781>

DUAN, W., MENG F., CUI H., LIN, Y., WANG, G. a WU, J., 2018. Ecotoxicity of phenol and cresols to aquatic organisms: A review. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2018.03.089

FDA, 2012. Harmful and Potentially Harmful Constituents in Tobacco Products and Tobacco Smoke; Established List.

Dostupné z: <https://www.federalregister.gov/documents/2012/04/03/2012-7727/harmful-and-potentially-harmful-constituents-in-tobacco-products-and-tobacco-smoke-established-list>

FDA, 2018. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Contains Nonbinding.

Dostupné z: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>

FRANZ, H. a JENDREIZIK, V., 2010. Fluorescence Method Development Handbook . *Thermo Fisher Scientific*.

GALLARD, H. a VON GUNTEN, U., 2002. Chlorination of Phenols: Kinetics and Formation of Chloroform. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 884–890.

CHROMSERVIS S.R.O., 2022. Písemné sdělení.

IRZ, 2021. Integrovaný registr znečišťování. Dostupné z: <https://www.irz.cz>

JAISWAL, N. a KUMAR, A., 2022. HPLC in the discovery of plant phenolics as antifungal molecules against *Candida* infection related biofilms. *Microchemical Journal* .**179**.

Dostupné z: doi:10.1016/J.MICROC.2022.107572

JIANG, Y., WEN, J., BAI, J., JIA X. a HU, Z., 2007. Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. *Journal of Hazardous Materials*. **147**(1–2), 672–676. Dostupné z: doi:10.1016/J.JHAZMAT.2007.05.031

MCMURRY, J., 2015. Organická chemie. *VUTIUM*.

KAHOUN, D., 2022. Laboratorní cvičení z analytické chemie. *Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*

KIM, K. Y., LEE, E. a KIM, Y., 2019. The Association between Bisphenol A Exposure and Obesity in Children-A Systematic Review with Meta-Analysis. *International journal of environmental research and public health*. **16**(14). Dostupné

z: doi:10.3390/IJERPH16142521

KURMUS, H., MOHAJERANI, A. a GRIST, S., 2021. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Fired Clay Bricks Incorporating Cigarette Butts. *Materials 2021*, **14**(8), 2032.

Dostupné z: doi:10.3390/MA14082032

LINHART, I., 2019. Základní pojmy v toxikologii, ekologii a ekotoxikologii. *VŠCHT*.

LIU, W., XIE, M., HAO, X., XU, Q., JIANG, X., LIU, T. a WANG, M., 2021. Rapid synergistic cloud point extraction for simultaneous determination of five polar phenols in environmental water samples via high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Microchemical Journal*. **164**. Dostupné z: doi:10.1016/J.MICROC.2021.105963

MCGACHY, Lenka, 2021. Toxikologie a ekotoxikologie I. *VŠCHT*.

MCMURRY, John, 2015. Organická chemie. *VUTIUM*.

MOLDOVEANU, S. C. a KISER, M., 2007. Gas chromatography/mass spectrometry versus liquid chromatography/fluorescence detection in the analysis of phenols in mainstream cigarette smoke. *Journal of Chromatography A*. **1141**(1), 90–97. Dostupné

z: doi:10.1016/j.chroma.2006.11.100

NOVÁKOVÁ, L. a DOUŠA, M., 2021a. Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. *Česká chromatografická škola*.

NOVÁKOVÁ, L. a DOUŠA, M., 2021b. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. *Česká chromatografická škola*.

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. *Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*

PITTER, P., 1999. Hydrochemie. *VŠCHT*.

PUBCHEM, 2023. *National Library of Medicine* [vid. 2022-11-18].

Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

PULS, J., WILSON, S. A., a HÖLTER, D., 2011. Degradation of Cellulose Acetate-Based Materials: A Review. *Journal of Polymers and the Environment*. **19**(1), 152–165.

Dostupné z: doi:10.1007/S10924-010-0258-0

REACH, 2023. *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals* [vid. 2023-03-24].

Dostupné z: https://reachonline.eu/REACH/EN/REACH_EN/articleXIII.html

RODER GREEN, A. L., PUTSCHEW, A. a NEHLS, T., 2014. Littered cigarette butts as a source of nicotine in urban waters. *Journal of Hydrology*. **519**, 3466–3474.

Dostupné z: doi:10.1016/J.JHYDROL.2014.05.046

ROCHA, A. C. S., REIS-HENRIQUES, M. A., GALHANO, V., FERREIRA, M. a GUIMARÃES, L., 2016. Toxicity of seven priority hazardous and noxious substances (HNSs) to marine organisms: Current status, knowledge gaps and recommendations for future research. *Science of The Total Environment*. **542**, 728–749.

Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2015.10.049

SALCEDO, G. M., KUPSKI, L., DEGANG, L., MARUBE, L. C., CALDAS, S. S. a PRIMEL, E. G., 2019. Determination of fifteen phenols in wastewater from petroleum refinery samples using a dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography with a photodiode array detector. *Microchemical Journal*. **146**, 722–728.

Dostupné z: doi:10.1016/J.MICROC.2019.01.075

- SIRAJUDDIN, M., BHANGER, I., NIAZ, A., SHAH, A. a RAUF, A., 2007. Ultra-trace level determination of hydroquinone in waste photographic solutions by UV–vis spectrophotometry. *Talanta*. **72**(2), 546–553.
Dostupné z: doi:10.1016/J.TALANTA.2006.11.021
- SLAUGHTER, E., GERSBERG, R. M., WATANABE, K., RUDOLPH, J., STRANSKY, Ch. a NOVOTNY, T.E., 2011. Toxicity of cigarette butts, and their chemical components, to marine and freshwater fish. *Tobacco Control*. **20**(1), 25–29.
Dostupné z: doi:10.1136/TC.2010.040170
- SOLEIMANI, F., DOBARADARAN, S., DE-LA-TORRE, G.E., SCHMIDT, T.C. a SAEEDI, R., 2022. Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: A comprehensive systematic review. *Science of The Total Environment*. **813**.
Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2021.152667
- TICHÝ, M., 1998. Toxikologie pro chemiky. Karolinum.
- VARADARAJAN, R., SANKAR, H., JOSE, J. a PHILIP, B., 2014. Sublethal effects of phenolic compounds on biochemical, histological and ionoregulatory parameters in a tropical teleost fish *Oreochromis mossambicus* (Peters). *International Journal of Scientific and Research Publications*. **4**(3).
- VENUGOPAL, P. D., HANNA, S. K., GAGLIANO, G. G., a CHANG, H. W., 2021. No butts on the beach: Aquatic toxicity of cigarette butt leachate chemicals. *Tobacco Regulatory Science*. **7**(1), 17–30 Dostupné z: doi:10.18001/TRS.7.1.2
- VOPRŠÁLOVÁ, M. a ŽÁČKOVÁ, P., 1996. Základy toxikologie pro farmaceuty. Karolinum.
- WHO, 2017. Monitoring tobacco use and prevention policies.
Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255874/9789241512824-eng.pdf>
- WU, J., RICKERT, W. S. a MASTERS, A., 2012. An improved high performance liquid chromatography-fluorescence detection method for the analysis of major phenolic compounds in cigarette smoke and smokeless tobacco products. *Journal of Chromatography A*. **1264**, 40–47. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2012.09.060

ZHANG, Y., CAO, C., YANG, Z., JIA, G., LIU, X., LI, X., CUI, Z. a LI, A., 2023. Simultaneous determination of 20 phenolic compounds in propolis by HPLC-UV and HPLC-MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*. **115**.

Dostupné z: doi:10.1016/J.JFCA.2022.104877

ZHONG, Ch., HE, M., LIAO, H., CHEN, B., WANG, Ch. a HU, B., 2016. Polydimethylsiloxane/covalent triazine frameworks coated stir bar sorptive extraction coupled with high performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the determination of phenols in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*. **1441**, 8–15. Dostupné z: doi:10.1016/J.CHROMA.2016.02.073

ZHU, Z., LI, X., ZHANG, Y., WANG, J., DAI F. a WANG, W., 2023. Profiling of phenolic compounds in domestic and imported extra virgin olive oils in China by high performance liquid chromatography-electrochemical detection. *LWT*. **174**.

Dostupné z: doi:10.1016/J.LWT.2023.114424

8 Přílohy

Příloha A

Primární data pro výpočet mezí detekce

Analyt	Koncentrace (µg/l)	Průměr S/N	LOD _i (µg/l)
hydrochinon	1,00	9,21	0,33
resorcinol	1,00	6,78	0,44
pyrokatechol	1,00	4,84	0,62
fenol	1,00	6,66	0,45
guajakol	1,00	7,37	0,41
p+m-kresol	1,00	7,68	0,39
o-kresol	1,00	5,00	0,60

Příloha B

Primární data pro výpočet mezí stanovitelnosti

Analyt	Koncentrace (µg/l)	Průměr S/N	LOQ _i (µg/l)
hydrochinon	1,00	9,21	1,1
resorcinol	2,00	12,7	1,6
pyrokatechol	2,00	8,67	2,3
fenol	2,00	11,3	1,8
guajakol	1,00	7,37	1,4
p+m-kresol	1,00	7,68	1,3
o-kresol	2,00	9,66	2,1

Příloha C

Primární data pro hodnocení linearitu hydrochinonu

Analyt	Rovnice kalibrační křivky	Korelační koeficient
hydrochinon	$y = 0,0100 \times c + 0,0120$	0,9988

Koncentrační úroveň	Teoretická koncentrace (µg/l)	Poměr odezvy analytu a VS (1)	Vypočtená koncentrace (µg/l)	Diference (%)
K3A	5,00	0,05429	4,22	-15,6
K3B	5,00	0,05332	4,12	-17,5
K3C	5,00	0,05483	4,27	-14,5
K3D	5,00	0,05520	4,31	-13,8
K4A	10,0	0,1050	9,28	-7,23
K4B	10,0	0,1045	9,23	-7,65
K4C	10,0	0,1073	9,51	-4,94
K4D	10,0	0,1069	9,47	-5,35
K5A	20,0	0,2124	20,0	-0,0148
K5B	20,0	0,2092	19,7	-1,61
K5C	20,0	0,2114	19,9	-0,506
K5D	20,0	0,2109	19,8	-0,783
K6A	35,0	0,3686	35,6	1,67
K6B	35,0	0,3663	35,4	1,01
K6C	35,0	0,3673	35,5	1,29
K6D	35,0	0,3682	35,5	1,55
K7A	50,0	0,5203	50,7	1,43
K7B	50,0	0,5232	51,0	2,02
K7C	50,0	0,5256	51,3	2,50
K7D	50,0	0,5256	51,3	2,50
K8A	75,0	0,7719	75,8	1,10
K8B	75,0	0,7835	77,0	2,65
K8C	75,0	0,8008	78,7	4,94
K8D	75,0	0,7898	77,6	3,47
K9A	100	0,9977	98,4	-1,64
K9B	100	0,9673	95,3	-4,67
K9C	100	1,0183	100	0,409
K9D	100	0,9821	96,8	-3,20

Příloha D

Primární data pro výpočet linearitu resorcinolu

Analyt	Rovnice kalibrační křivky	Korelační koeficient
resorcinol	$y = 0,00845 \times c + 0,0000724$	0,9999

Koncentrační úroveň	Teoretická koncentrace (µg/l)	Poměr odezvy analytu a VS (1)	Vypočtená koncentrace (µg/l)	Diference (%)
K2A	2,00	0,01629	1,92	-4,04
K2B	2,00	0,01755	2,07	3,40
K2C	2,00	0,01653	1,95	-2,62
K2D	2,00	0,01627	1,92	-4,15
K3A	5,00	0,04191	4,95	-0,984
K3B	5,00	0,04318	5,10	2,02
K3C	5,00	0,04281	5,06	1,14
K3D	5,00	0,04317	5,10	2,00
K4A	10,0	0,08413	9,95	-0,522
K4B	10,0	0,08363	9,89	-1,12
K4C	10,0	0,08486	10,0	0,333
K4D	10,0	0,08418	9,95	-0,463
K5A	20,0	0,1686	19,9	-0,266
K5B	20,0	0,1681	19,9	-0,588
K5C	20,0	0,1707	20,2	0,951
K5D	20,0	0,1690	20,0	-0,0288
K6A	35,0	0,2956	35,0	-0,0830
K6B	35,0	0,2955	35,0	-0,110
K6C	35,0	0,2986	35,3	0,930
K6D	35,0	0,2960	35,0	0,0594
K7A	50,0	0,4194	49,6	-0,747
K7B	50,0	0,4229	50,0	0,0715
K7C	50,0	0,4221	49,9	-0,107
K7D	50,0	0,4236	50,1	0,229
K8A	75,0	0,6265	74,1	-1,16
K8B	75,0	0,6335	75,0	-0,0621
K8C	75,0	0,6498	76,9	2,52
K8D	75,0	0,6327	74,9	-0,179
K9A	100	0,8458	100	0,0759
K9B	100	0,8419	99,6	-0,381
K9C	100	0,8398	99,4	-0,633
K9D	100	0,8415	99,6	-0,428
K10A	125	1,063	126	0,659
K10B	125	1,058	125	0,128
K10C	125	1,051	124	-0,480
K10D	125	1,058	125	0,195

Příloha E

Primární data pro výpočet linearitu pyrokatecholu

Analyt	Rovnice kalibrační křivky	Korelační koeficient
pyrokatechol	$y = 0,00634 \times c + 0,00147$	0,9999

Koncentrační úroveň	Teoretická koncentrace (µg/l)	Poměr odezvy analytu a VS (I)	Vypočtená koncentrace (µg/l)	Diference (%)
K3A	5,00	0,03175	4,78	-4,48
K3B	5,00	0,03229	4,86	-2,76
K3C	5,00	0,03172	4,77	-4,58
K3D	5,00	0,03186	4,79	-4,14
K4A	10,0	0,06186	9,52	-4,76
K4B	10,0	0,06357	9,79	-2,05
K4C	10,0	0,06377	9,83	-1,74
K4D	10,0	0,06317	9,73	-2,69
K5A	20,0	0,1291	20,1	0,623
K5B	20,0	0,1272	19,8	-0,833
K5C	20,0	0,1292	20,2	0,757
K5D	20,0	0,1283	20,0	-0,00207
K6A	35,0	0,2248	35,2	0,619
K6B	35,0	0,2204	34,5	-1,34
K6C	35,0	0,2242	35,1	0,340
K6D	35,0	0,2234	35,0	0,0205
K7A	50,0	0,3173	49,8	-0,387
K7B	50,0	0,3198	50,2	0,390
K7C	50,0	0,3203	50,3	0,556
K7D	50,0	0,3205	50,3	0,610
K8A	75,0	0,4706	74,0	-1,36
K8B	75,0	0,4788	75,3	0,378
K8C	75,0	0,4901	77,1	2,74
K8D	75,0	0,4801	75,5	0,636
K9A	100	0,6391	101	0,561
K9B	100	0,6377	100	0,327
K9C	100	0,6357	100	0,0270
K9D	100	0,6350	99,9	-0,0928
K10A	125	0,8018	126	0,977
K10B	125	0,7982	126	0,520
K10C	125	0,7934	125	-0,0913
K10D	125	0,7930	125	-0,141
K11A	150	0,9506	150	-0,218

Příloha F

Primární data pro výpočet linearity fenolu

Analyt	Rovnice kalibrační křivky	Korelační koeficient
fenol	$y = 0,00844 \times c - 0,00566$	1,000

Koncentrační úroveň	Teoretická koncentrace (µg/l)	Poměr odezvy analytu a VS (1)	Vypočtená koncentrace (µg/l)	Diference (%)
K2A	2.00	0.02220	1.95	-2.31
K2B	2.00	0.02110	1.82	-8.81
K2C	2.00	0.02155	1.88	-6.14
K2D	2.00	0.02162	1.89	-5.73
K3A	5.00	0.04641	4.81	-3.73
K3B	5.00	0.04625	4.79	-4.10
K3C	5.00	0.04602	4.77	-4.66
K3D	5.00	0.04660	4.84	-3.29
K4A	10.0	0.08925	9.87	-1.26
K4B	10.0	0.08949	9.90	-0.975
K4C	10.0	0.09092	10.1	0.717
K4D	10.0	0.08899	9.84	-1.57
K5A	20.0	0.1747	20.0	-0.145
K5B	20.0	0.1750	20.0	0.00351
K5C	20.0	0.1750	20.0	0.033
K5D	20.0	0.1749	20.0	-0.061
K6A	35.0	0.3007	34.8	-0.432
K6B	35.0	0.3031	35.1	0.399
K6C	35.0	0.3026	35.1	0.214
K6D	35.0	0.3009	34.9	-0.348
K7A	50.0	0.4280	49.9	-0.219
K7B	50.0	0.4267	49.7	-0.519
K7C	50.0	0.4328	50.5	0.910
K7D	50.0	0.4292	50.0	0.0582
K8A	75.0	0.6304	73.8	-1.61
K8B	75.0	0.6404	75.0	-0.0245
K8C	75.0	0.6525	76.4	1.88
K8D	75.0	0.6421	75.2	0.235
K9A	100	0.8500	99.7	-0.262
K9B	100	0.8473	99.4	-0.579
K9C	100	0.8448	99.1	-0.871
K9D	100	0.8458	99.2	-0.760
K10A	125	1.070	126	0.588
K10B	125	1.064	125	-0.0259
K10C	125	1.061	125	-0.313
K10D	125	1.067	125	0.304
K11A	150	1.271	150	-0.316
K11B	150	1.272	150	-0.291

Příloha G

Data pro výpočet linearity guajakolu

Analyt	Rovnice kalibrační křivky	Korelační koeficient
guajakol	$y = 0,0125 \times c - 0,0000712$	0,9989

Koncentrační úroveň	Teoretická koncentrace (µg/l)	Poměr odezvy analytu a VS (1)	Vypočtená koncentrace (µg/l)	Diference (%)
K2A	2,00	0,02846	2,29	14,6
K2B	2,00	0,02777	2,24	11,8
K2C	2,00	0,02784	2,24	12,1
K2D	2,00	0,02619	2,11	5,45
K3A	5,00	0,06203	4,99	-0,236
K3B	5,00	0,06214	5,00	-0,0594
K3C	5,00	0,06215	5,00	-0,0553
K3D	5,00	0,06134	4,93	-1,35
K4A	10,0	0,1196	9,62	-3,85
K4B	10,0	0,1183	9,51	-4,94
K4C	10,0	0,1223	9,83	-1,72
K4D	10,0	0,1200	9,65	-3,53
K5A	20,0	0,2462	19,8	-1,09
K5B	20,0	0,2419	19,4	-2,83
K5C	20,0	0,2420	19,4	-2,77
K5D	20,0	0,2409	19,4	-3,23
K6A	35,0	0,4271	34,3	-1,97
K6B	35,0	0,4260	34,2	-2,22
K6C	35,0	0,4289	34,5	-1,57
K6D	35,0	0,4267	34,3	-2,05
K7A	50,0	0,6066	48,7	-2,54
K7B	50,0	0,6027	48,4	-3,18
K7C	50,0	0,6143	49,3	-1,32
K7D	50,0	0,6104	49,0	-1,94
K8A	75,0	0,9677	77,7	3,65
K8B	75,0	0,9863	79,2	5,64
K8C	75,0	1,003	80,6	7,41
K8D	75,0	0,9808	78,8	5,04
K9A	100	1,319	106,0	5,96
K9B	100	1,233	99,1	-0,949
K9C	100	1,225	98,4	-1,59
K9D	100	1,222	98,2	-1,83
K10A	125	1,533	123	-1,48
K10B	125	1,536	123	-1,28
K10C	125	1,526	123	-1,95
K10D	125	1,529	123	-1,75

Příloha H

Primární data pro výpočet linearitu p+m-kresolu

Analyt	Rovnice kalibrační křivky	Korelační koeficient
p+m-kresol	$y = 0,0137 \times c + 0,000614$	1,000

Koncentrační úroveň	Teoretická koncentrace (µg/l)	Poměr odezvy analytu a VS (I)	Vypočtená koncentrace (µg/l)	Diference (%)
K2A	2,00	0,02885	2,07	3,38
K2B	2,00	0,02758	1,97	-1,26
K2C	2,00	0,02788	2,00	-0,164
K2D	2,00	0,02826	2,02	1,22
K3A	5,00	0,06947	5,04	0,845
K3B	5,00	0,06861	4,98	-0,419
K3C	5,00	0,06920	5,02	0,444
K3D	5,00	0,06913	5,02	0,334
K4A	10,0	0,1349	9,84	-1,64
K4B	10,0	0,1362	9,93	-0,739
K4C	10,0	0,1383	10,1	0,828
K4D	10,0	0,1355	9,88	-1,22
K5A	20,0	0,2752	20,1	0,541
K5B	20,0	0,2721	19,9	-0,613
K5C	20,0	0,2743	20,0	0,213
K5D	20,0	0,2727	19,9	-0,385
K6A	35,0	0,4794	35,1	0,171
K6B	35,0	0,4770	34,9	-0,340
K6C	35,0	0,4797	35,1	0,228
K6D	35,0	0,4784	35,0	-0,0380
K7A	50,0	0,6831	50,0	-0,0452
K7B	50,0	0,6841	50,0	0,0942
K7C	50,0	0,6867	50,2	0,472
K7D	50,0	0,6870	50,3	0,527
K8A	75,0	1,006	73,6	-1,82
K8B	75,0	1,023	74,8	-0,213
K8C	75,0	1,046	76,5	2,06
K8D	75,0	1,027	75,2	0,218
K9A	100	1,364	99,8	-0,188
K9B	100	1,362	99,7	-0,284
K9C	100	1,362	99,7	-0,285
K9D	100	1,362	99,7	-0,329
K10A	125	1,715	126	0,454
K10B	125	1,711	125	0,207
K10C	125	1,701	124	-0,417
K10D	125	1,711	125	0,214

Příloha I

Analyt	Rovnice kalibrační křivky	Korelační koeficient
o-kresol	$y = 0.00910 \times c - 0.000117$	0.9999

Koncentrační úroveň	Teoretická koncentrace (µg/l)	Poměr odezvy analytu a VS (1)	Vypočtená koncentrace (µg/l)	Diference (%)
K3A	5,00	0,04552	5,00	-0,0712
K3B	5,00	0,04586	5,03	0,682
K3C	5,00	0,04488	4,93	-1,47
K3D	5,00	0,04494	4,93	-1,33
K4A	10,0	0,08966	9,83	-1,70
K4B	10,0	0,09033	9,90	-0,969
K4C	10,0	0,09044	9,92	-0,845
K4D	10,0	0,08965	9,83	-1,71
K5A	20,0	0,1828	20,0	0,128
K5B	20,0	0,1819	19,9	-0,329
K5C	20,0	0,1817	19,9	-0,481
K5D	20,0	0,1801	19,7	-1,34
K6A	35,0	0,3176	34,8	-0,602
K6B	35,0	0,3186	34,9	-0,284
K6C	35,0	0,3190	34,9	-0,162
K6D	35,0	0,3188	34,9	-0,217
K7A	50,0	0,4544	49,8	-0,477
K7B	50,0	0,4569	50,0	0,0860
K7C	50,0	0,4583	50,2	0,388
K7D	50,0	0,4580	50,2	0,331
K8A	75,0	0,6675	73,1	-2,53
K8B	75,0	0,6803	74,5	-0,668
K8C	75,0	0,6990	76,6	2,07
K8D	75,0	0,6830	74,8	-0,275
K9A	100	0,9094	99,6	-0,415
K9B	100	0,9094	99,6	-0,418
K9C	100	0,9089	99,5	-0,473
K9D	100	0,9114	99,8	-0,194
K10A	125	1,147	126	0,524
K10B	125	1,145	125	0,333
K10C	125	1,137	125	-0,366
K10D	125	1,143	125	0,125
K11A	150	1,368	150	-0,155
K11B	150	1,363	149	-0,508
K11C	150	1,357	149	-0,936
K11D	150	1,358	149	-0,861

Příloha J

Primární data pro výpočet správnosti

Analyt	Koncentrace ve vialce bez Spike 2 (µg/l)					
	1	2	3	4	5	6
hydrochinon	17,1	16,7	17,0	-	-	-
resorcinol	-	-	-	-	-	-
pyrokatechol	26,4	26,4	25,5	26,0	26,0	26,6
fenol	41,0	41,9	41,8	41,6	41,4	41,6
guajakol	6,94	7,16	6,71	6,80	6,70	6,88
p+m-kresol	7,58	7,57	7,74	-	-	-
o-kresol	6,95	6,84	6,67	6,77	6,89	6,61

Analyt	Koncentrace ve vialce se Spike 2 (µg/l)					
	1	2	3	4	5	6
hydrochinon	68,2	67,8	68,6	-	-	-
resorcinol	-	-	-	-	-	-
pyrokatechol	82,8	76,5	77,8	75,9	78,7	77,8
fenol	94,1	92,5	93,7	91,5	93,6	93,0
guajakol	23,9	24,0	24,4	23,7	24,4	23,9
p+m-kresol	17,5	17,4	17,5	-	-	-
o-kresol	25,7	25,1	25,4	24,7	25,3	25,4

Příloha K

Primární data pro výpočet přesnosti

Analyt	Koncentrace (µg/cig.)					
	1	2	3	4	5	6
hydrochinon	85,4	83,7	85,0	-	-	-
resorcinol	-	-	-	-	-	-
pyrokatechol	132	132	128	130	130	133
fenol	205	210	209	208	207	208
guajakol	34,7	35,9	33,6	34,1	33,6	34,4
p+m-kresol	37,9	37,9	38,8	-	-	-
o-kresol	34,8	34,3	33,4	33,9	34,5	33,1