

**HPLC SEPARACE GENOTOXICKÝCH DERIVÁTŮ
NAFTALENU*****VERONIKA QUAISEROVÁ, JIŘÍ ZIMA
a JIŘÍ BAREK***UNESCO Laboratoř elektrochemie životního prostředí, ka-
tedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita
Karlova, Albertov 2030, 128 43 Praha 2*

Došlo dne 10.V.2000

Klíčová slova: HPLC, separace, naftalen, aminonaftaleny,
hydroxynaftaleny, nitronaftaleny, optimalizace**Úvod**

V současné době se do popředí zájmu environmentálních, lékařských a chemických věd dostává otázka vlivu chemických karcinogenů a mutagenů v životním a pracovním prostředí na zdraví lidské populace. Naftalen a jeho nitro- a aminoderiváty patří k prokázaným chemickým mutagenům¹⁻³, navíc 2-aminonaftalen je prokázaný karcinogen⁴. Metabolicky jsou transformovány na odpovídající hydroxyderiváty, které lze využít při biologickém monitorování expozice těmto škodlivým látkám^{5,6}. Proto roste poptávka po citlivých a selektivních metodách stanovení těchto látek ve složitých environmentálních i biologických matricích⁷⁻¹⁰. V předkládané práci byla věnována pozornost HPLC metodě rozdělení směsi naftalenu, 1-aminonaftalenu, 1-hydroxynaftalenu, 1-nitronaftalenu, 2-aminonaftalenu, 2-hydroxynaftalenu a 2-nitronaftalenu. Při hledání optimálních podmínek separace bylo využito kombinace predikce chromatografického chování studovaných látek pomocí programu ChromSword[®] s experimentálním ověřením předpověděných dat a upřesněním navržených podmínek. Program ChromSword[®] byl vyvinut firmou Merck pro optimalizaci podmínek separace v systému HPLC s reverzními fázemi, normálními fázemi a iontově-výměnnou HPLC¹¹. Výhodou této kombinace je rychlé nalezení optimálních podmínek separace s minimální spotřebou drahých rozpouštědel během optimalizace¹².

Experimentální část**Aparatura**

K měření byl použit kapalinový chromatograf LaChrom (Merck Hitachi, SRN) sestavený z vysokotlaké pumpy L-7100, interface D-7000 a UV-detektoru L-7400, ovládací software HPLC systém Manager (Hitachi, Japan) v prostředí WinNT (Microsoft Corp.) Dávkováno bylo dávkovacím ven-

tilem Rheodyne 7725i (Rheodyne, USA) s 20 μ l smyčkou. Látky byly separovány na koloně LiChrospher[®] 100 RP-18, 5 μ m, 125 mm \times 4 mm I.D. (Merck, SRN) při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,5 ml.min⁻¹. Vzduch byl z mobilní fáze odstraněn pomocí ultrazvuku. K měření pH mobilní fáze bylo použito přístroje Conductivity and pH-meter 4330 (Jenway, Anglie) s kombinovanou skleněnou elektrodou. Dále byl použit chromatografický optimalizační program ChromSword[®] verze 1.0 (Merck, SRN).

Reagencie

Naftalen, 1-aminonaftalen, 2-aminonaftalen, 1-hydroxynaftalen, 2-hydroxynaftalen, 1-nitronaftalen, 2-nitronaftalen (vše Aldrich). Zásobní roztoky látek o koncentraci 1.10⁻³ mol.l⁻¹ byly připraveny v methanolu p.a. (Lachema Brno), a byly uchovávány v temnu za laboratorní teploty. Pro chromatografii byl použit methanol a acetonitril „gradient grade“ (Merck Praha). Při sledování vlivu pH mobilní fáze na separaci byl použit fosfátový pufr tvořený 0,01 mol.l⁻¹ dihydrogenfosforečnanem sodným, jehož pH bylo upraveno koncentrovanou kyselinou fosforečnou na požadovanou hodnotu. K přípravě všech roztoků byla používána deionizovaná voda (Millipore Q-plus Systém, Millipore, USA).

Pracovní postupy

K separaci naftalenu, 1-aminonaftalenu, 2-aminonaftalenu, 1-hydroxynaftalenu, 2-hydroxynaftalenu, 1-nitronaftalenu a 2-nitronaftalenu byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou detekcí. Vzhledem k povaze studovaných látek byla pro separaci zvolena reverzní chromatografie na oktadecylové fázi chemicky vázané na silikagelu. Nalezení optimálních podmínek stanovení pro separaci bylo provedeno metodou postupné optimalizace jednotlivých složek a parametrů mobilní fáze klasickou experimentální metodou v kombinaci s chromatografickým optimalizačním programem ChromSword[®].

Mobilní fáze byly připraveny mísením příslušných objemových dílů vodné složky a organického modifikátoru. Při studiu vlivu pH na separaci bylo pH mobilní fáze upravováno změnou pH vodné složky, takže údaje týkající se pH mobilní fáze udávají pH vodné složky mobilní fáze. Měřeny byly roztoky jak jednotlivých látek o koncentraci 1.10⁻⁴ mol.l⁻¹, tak roztok směsi studovaných látek o koncentraci každé složky v roztoku 1.10⁻⁴ mol.l⁻¹. Mrtvý čas byl stanoven pomocí 1.10⁻⁴ mol.l⁻¹ vodného roztoku dusičnanu sodného při 240 nm. Detekce jednotlivých látek probíhala při vlnových délkách jejich absorpčních maxim. Směs látek byla detegována při společné vlnové délce 285 nm. Použitá kolona LiChrospher[®] 100 RP-18 nebyla termostatována.

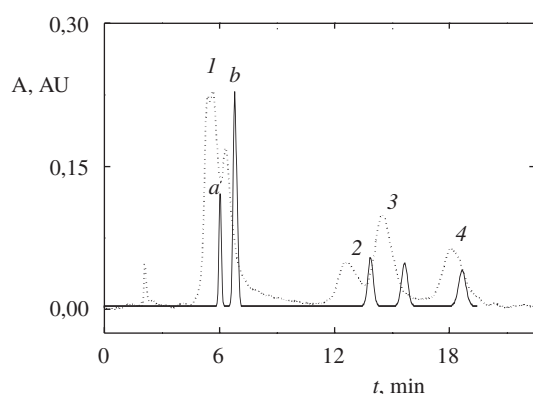
Při optimalizaci byla nejprve předpovězena separace studovaných látek v methanolu a následně také v acetonitrilu programem ChromSword[®], do kterého byly zadány struktury všech stanovovaných látek, typ kolony a methanol (acetonitril) jako organický modifikátor. Z těchto údajů byla teoreticky vypočtena závislost logaritmu retenčních faktorů látek na obsahu methanolu (acetonitrilu) v mobilní fázi a byl navržen

* Tato práce získala 3. místo v soutěži o cenu firmy Merck za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie 2.2.2000 v Brně

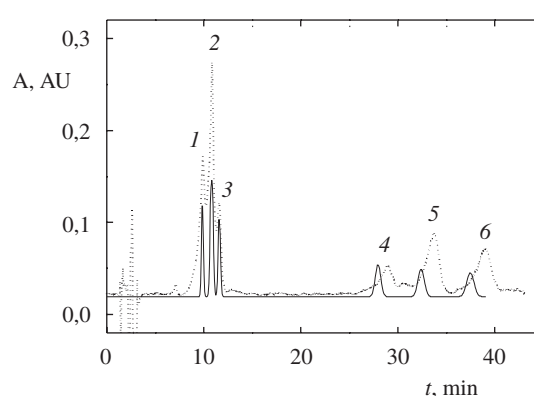
Tabulka I

Vliv obsahu methanolu v mobilní fázi na retenční časy (t_R , min) a logaritmy retenčních faktorů ($\log k$) naftalenu, 1-aminonaftalenu, 2-aminonaftalenu, 1-hydroxynaftalenu, 2-hydroxynaftalenu, 1-nitronaftalenu, 2-nitronaftalenu

Analyt	% MeOH							
	90		85		75		65	
	t_R	$\log k$	t_R	$\log k$	t_R	$\log k$	t_R	$\log k$
Naftalen	3,64	0,23	5,12	0,45	9,02	0,75	18,23	1,09
1-Aminonaftalen	2,56	-0,05	2,78	0,03	3,72	0,23	5,51	0,48
2-Aminonaftalen	2,54	-0,05	2,79	0,03	3,72	0,23	5,57	0,49
1-Hydroxynaftalen	2,59	-0,04	3,09	0,11	4,07	0,29	6,45	0,57
2-Hydroxynaftalen	2,55	-0,05	3,23	0,14	3,77	0,24	5,75	0,50
1-Nitronaftalen	3,21	0,14	4,57	0,38	6,50	0,57	12,56	0,91
2-Nitronaftalen	2,63	-0,02	5,17	0,45	7,22	0,63	14,52	0,98



Obr. 1. Chromatogram směsi 1-aminonaftalenu, 2-aminonaftalenu, 1-hydroxynaftalenu, 2-hydroxynaftalenu (1), 1-nitronaftalenu (2), 2-nitronaftalenu (3) a naftalenu (4) v mobilní fázi methanol–voda (65:35) experimentálně stanovený (přerušovaná čára) a teoreticky vypočtený programem ChromSword® (plná čára), kde *a* je 2-hydroxynaftalen a *b* je směs 1-aminonaftalenu, 2-aminonaftalenu, 1-hydroxynaftalenu



Obr. 2. Chromatogram směsi 2-hydroxynaftalenu (1), 1-aminonaftalenu a 2-aminonaftalenu (2), 1-hydroxynaftalenu (3), 1-nitronaftalenu (4), 2-nitronaftalenu (5) a naftalenu (6) v mobilní fázi acetonitril–voda (40:60) experimentálně stanovený (přerušovaná čára) a teoreticky vypočtený programem ChromSword® (plná čára)

optimální obsah organického modifikátoru v mobilní fázi. Experimentální ověření výpočtu bylo provedeno měřením závislosti retenčních charakteristik jednotlivých látek na obsahu methanolu (acetonitrilu) v mobilní fázi. V každé mobilní fázi byla také nastříkováána směs naftalenu a jeho derivátů. Poté byl teoretický výpočet upřesněn zadáním experimentálně naměřených retenčních dat.

Při studiu vlivu pH na separaci je optimalizační program ChromSword® schopen zohlednit vliv pH na chromatografické chování látek až po zadání alespoň dvou hodnot experimentálně naměřených při dvou různých pH. Proto byly nejprve měřeny retence látek při pH 7, 5 a 3 v mobilní fázi acetonitril – fosfátový pufr o daném pH. Naměřená retenční data byla zadána do optimalizačního programu. Z údajů byla teoreticky vypočtena závislost logaritmu retenčních faktorů látek a také závislost rozlišení limitujícího páru na pH. Z těchto závislostí byla nalezena oblast pH, kde by mělo být rozlišení limitujícího páru dostatečné pro jejich oddělení. Následně byl výpočet experimentálně ověřen.

Výsledky

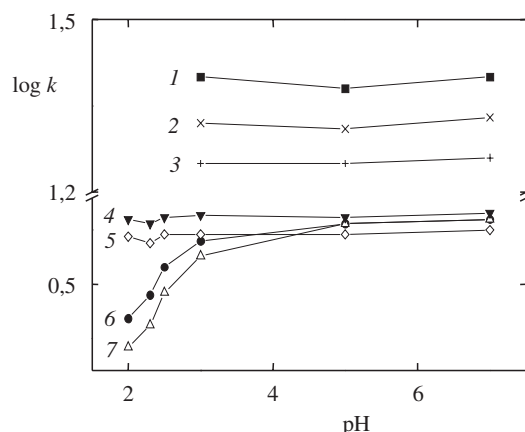
Vliv obsahu methanolu na eluční časy studovaných látek

Na chromatografické chování látek má rozhodující vliv obsah organického modifikátoru (rozpuštědla) v mobilní fázi. Pro počáteční experimenty byl zvolen jako organická složka mobilní fáze methanol. Nejprve bylo programem ChromSword® předpovězeno chromatografické chování studovaných látek v mobilní fázi methanol–voda. Tento program navrhl optimální obsah methanolu v mobilní fázi 68 %. Z teoretického výpočtu vyplynulo, že v této mobilní fázi by nemělo dojít k separaci všech složek dělené směsi. To bylo experimentálně potvrzeno měřením závislosti retenčních dat analytů na obsahu methanolu v mobilní fázi. Zjištěné retence látek a logaritmy jejich retenčních faktorů $\log k = \log [(t_R - t_M)/t_M]$ jsou uvedeny v tabulce I, ze které je patrné, že retence všech studovaných látek se snižují s rostoucím obsahem methanolu v mobilní fázi. Následně byl teoretický výpočet upřesněn vložení experimentálně stanovených dat. Obsah methanolu

Tabulka II

Vliv obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na retenční časy (t_R , min) a logaritmy retenčních faktorů ($\log k$) naftalenu, 1-aminonaftalenu, 2-aminonaftalenu, 1-hydroxynaftalenu, 2-hydroxynaftalenu, 1-nitronaftalenu, 2-nitronaftalenu

Analyt	% MeCN													
	90		85		75		65		55		45		40	
	t_R	$\log k$	t_R	$\log k$	t_R	$\log k$	t_R	$\log k$	t_R	$\log k$	t_R	$\log k$	t_R	$\log k$
Naftalen	3,31	0,09	4,01	0,23	5,24	0,42	7,43	0,62	11,81	0,86	22,84	1,18	39,39	1,38
1-Aminonaftalen	2,59	-0,13	2,85	-0,04	3,23	0,10	3,91	0,24	5,21	0,42	7,84	0,65	10,93	0,78
2-Aminonaftalen	2,60	-0,13	2,84	-0,02	3,22	0,10	3,89	0,24	5,25	0,43	8,00	0,66	10,97	0,78
1-Hydroxynaftalen	2,57	-0,14	2,67	-0,10	3,09	0,06	3,74	0,20	5,00	0,40	7,87	0,65	11,80	0,81
2-Hydroxynaftalen	2,53	-0,15	2,64	-0,11	2,99	0,03	3,51	0,16	4,57	0,34	6,81	0,58	10,04	0,73
1-Nitronaftalen	2,95	-0,01	3,46	0,12	4,32	0,30	5,89	0,49	9,13	0,73	17,22	1,04	29,25	1,25
2-Nitronaftalen	3,01	0,01	3,59	0,14	4,57	0,34	6,35	0,53	10,05	0,78	19,69	1,11	33,95	1,31

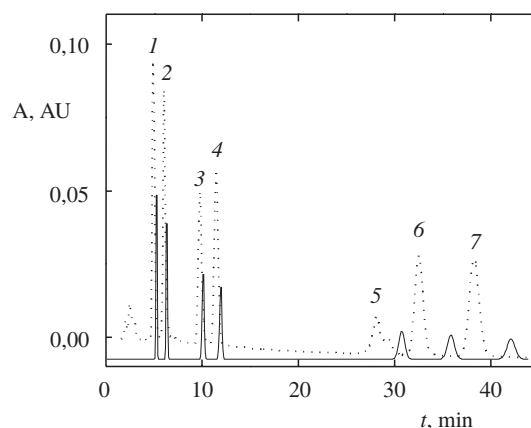


Obr. 3. Závislost logaritmu retenčních faktorů naftalenu (1), 2-nitronaftalenu (2), 1-nitronaftalenu (3), 1-hydroxynaftalenu (4), 2-hydroxynaftalenu (5), 1-aminonaftalenu (6) a 2-aminonaftalenu (7) na pH

v mobilní fázi byl optimalizován na 65 %, kde však došlo k úplnému oddělení pouze naftalenu a k částečnému oddělení 1-nitro- a 2-nitronaftalenu (viz obr. 1). Snížením obsahu methanolu pod 65 % by došlo k neúnosnému prodloužení retenčních časů. Vzhledem k nedostatečnému oddělení studovaných látek byla dále separace naftalenu a jeho derivátů studována v mobilní fázi acetonitril–voda.

Vliv obsahu acetonitrilu na eluční časy studovaných látek

V této fázi byla opět nejprve předpovězena separace látek programem ChromSword[®], kterým byl navržen optimální obsah acetonitrilu v mobilní fázi 51 %. Z tohoto teoretického výpočtu vyplynulo, že by nemělo dojít ke zlepšení separace látek oproti separaci ve fázi methanol–voda. Teoretický výpočet byl opět ověřován měřením retenčních časů analytů v závislosti na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v tabulce II, ze které vyplývá, že retence všech látek se snižuje s rostoucím obsahem acetonitrilu v mobilní fázi. Poté byl opět teoretický výpočet upřesněn vložím

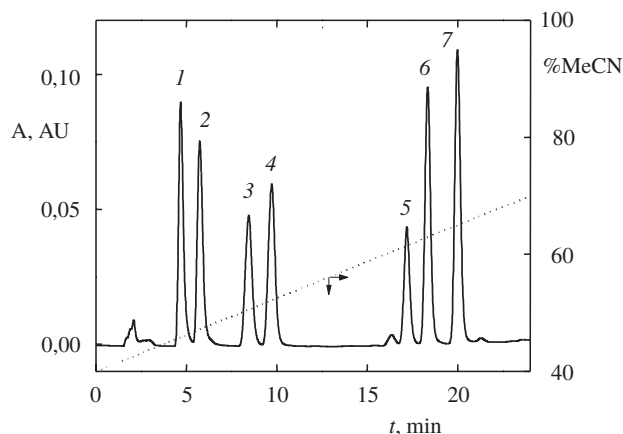


Obr. 4. Chromatogram směsi 2-aminonaftalenu (1), 1-aminonaftalenu (2), 2-hydroxynaftalenu (3), 1-hydroxynaftalenu (4), 1-nitronaftalenu (5), 2-nitronaftalenu (6) a naftalenu (7) experimentálně stanovený (přerušovaná čára) a teoreticky vypočtený programem ChromSword[®] (plná čára) v mobilní fázi acetonitril–fosfátový pufr o pH 2,3 (40:60)

experimentálně naměřených dat do optimalizačního programu. Obsah acetonitrilu v mobilní fázi byl optimalizován na 40 % (viz obr. 2). Z tohoto obrázku je patrné, že v této mobilní fázi oproti původní predikci došlo k úplné separaci naftalenu, 1-nitro- i 2-nitronaftalenu a také k částečnému oddělení 2-hydroxy- a 1-hydroxynaftalenu. Je patrné, že po vložení naměřených retenčních dat došlo ke zpřesnění teoretického výpočtu optimalizačního programu i když predikce úplného oddělení 2-hydroxynaftalenu a 1-hydroxynaftalenu nebyla experimentálně potvrzena. Snížení obsahu acetonitrilu pod 40 % by způsobilo výrazné prodloužení retenčních časů.

Vliv pH mobilní fáze

Vzhledem k tomu, že ani v mobilní fázi acetonitril–voda nedošlo k oddělení amino- a hydroxyderivátů naftalenu a protože tyto látky obsahují protonizovatelné a disociovatelné skupiny, byl dále studován vliv pH na jejich separaci. Protože optimalizační program ChromSword[®] je schopen zohlednit



Obr. 5. Chromatogram směsi 2-aminonafthalenu (1), 1-aminonafthalenu (2), 2-hydroxynafthalenu (3), 1-hydroxynafthalenu (4), 1-nitronafthalenu (5), 2-nitronafthalenu (6) a nafthalenu (7) s 24-min lineárním gradientem s obsahem 40 až 70 % acetonitrilu (pH vodné fáze 2,3). Přerušovanou čarou je vyznačen profil použitého gradientu

vliv pH na chromatografické chování látek až po zadání alespoň dvou hodnot experimentálně naměřených při dvou různých pH, byly nejprve měřeny retence látek při pH 7, 5 a 3. Všechna měření probíhala v mobilní fázi 40 % acetonitrilu – 60 % fosfátového pufru. S klesajícím pH byl pozorován vzrůst rozlišení píků amino- a hydroxyderivátů, ale k jejich úplnému oddělení nedošlo ani při pH 3. Naměřená retenční data byla zadána do optimalizačního programu a z údajů byla teoreticky nalezena oblast pH 2 až 2,6. Toto rozmezí pH bylo zvoleno tak, aby rozlišení všech separovaných látek bylo dostatečné a zároveň pH bylo vhodné pro použitou kolonu. Tato predikce byla experimentálně ověřena měřením retencí látek při pH 2,5, 2,3 a 2,0. Vliv pH na chromatografické chování studovaných látek znázorňuje obr. 3. Za daných experimentálních podmínek bylo zvoleno jako optimální pH 2,3, při kterém došlo k oddělení všech složek separované směsi nafthalenu a jeho derivátů (viz obr. 4).

Optimalizace gradientu

Za účelem zkrácení celkové doby separace látek v mobilní fázi 40 % acetonitrilu – 60 % fosfátového pufru o pH 2,3 byl studován vliv gradientu acetonitrilu na separaci. Na základě předběžných experimentů byl stanoven následující optimální gradient: lineární 24-minutový gradient s obsahem acetonitrilu od 40 do 70 % (viz obr. 5). Doba analýzy se zkrátila z původních 40 min na 21 minut.

Závěr

K separaci směsi nafthalenu, 1-aminonafthalenu, 2-aminonafthalenu, 1-hydroxynafthalenu, 2-hydroxynafthalenu, 1-nitrona-

ftalenu a 2-nitronafthalenu byly za použití kombinace predikce chromatografického chování studovaných látek pomocí programu ChromSword[®] s experimentálním ověřením předpověděných dat navrženy následující podmínky: kolona LiChrospher[®] 100 RP-18, 24-minutový lineární gradient mobilní fáze s obsahem 40 až 70 % acetonitrilu; pH vodné složky mobilní fáze 2,3; průtoková rychlost mobilní fáze 0,5 ml.min⁻¹ a detekce při 285 nm.

J. B. děkuje Grantové agentuře České republiky (grant č. 203/98/1187). J. Z. děkuje Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy (výzkumný záměr 113100002).

LITERATURA

1. Moreira J. C., Barek J.: *Quimica Nova* 18, 362 (1995).
2. Barek J., Cvačka J., Moreira J. C., Zima J.: *Chem. Listy* 90, 805 (1996).
3. Barek J., Cvačka J., Mejstřík V., Muck A., Zima J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29, 81 (1999).
4. Anonymous: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, sv. 4. IARC, Lyon 1974.
5. Barek J., Mejstřík V., Švagrová I., Zima J.: *Chem. Listy* 88, 341 (1994).
6. Andreoli R., Manini P., Bergamaschi E., Mutti A., Franchini I., Niessen W. M. A.: *J. Chromatogr. A* 847, 9 (1999).
7. Jäger J.: *J. Chromatogr.* 152, 575 (1978).
8. MacCrehan W. A., May W. E., Yang S. D., Benner B. A.: *Anal. Chem.* 60, 194 (1988).
9. Liu T.-Y., Robbat A., Jr.: *J. Chromatogr.* 539, 1 (1991).
10. Jacob J., Karcher W., Belliaro J. J., Dumler R., Boenke A.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 349, 755 (1991).
11. Galushko S. V.: *Instruction Manual for Program Version 1.0 ChromSword[®]*. Merck, Darmstadt 1996.
12. Quaiserová V.: *Diplomová práce*. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha 2000.

V. Quaiserová, J. Zima, and J. Barek (UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Department of Analytical Chemistry, Charles University, Prague): **HPLC Separation of Genotoxic Derivatives of Naphthalene**

The following optimised conditions for the separation of naphthalene, naphthalen-1-amine, naphthalen-2-amine, 1- and 2-naphthols, and 1- and 2-nitronaphthalenes were found using a combination of the prediction of chromatographic behaviour of the tested substances with ChromSword[®] (Merck) optimisation software and experimental verification: LiChrospher[®] column, 24-min linear gradient, acetonitrile (40–70 %) – phosphate buffer, pH 2.3 (60–30 %), flow rate 0.5 ml.min⁻¹, UV detection at 285 nm.