**VÝVOJ A VALIDACE HPLC METODY PRO STANOVENÍ VYBRANÉHO BARVIVA ZA ÚČELEM EKOTOXIKOLOGICKÉHO TESTOVÁNÍ**

**Štěpánková Anna, Kořínková Jaroslava\*, Nývltová Zora a Volková Jana**

*Ústav environmentálního a chemického inženýrství*

\* *Garant*

**Abstrakt**

Příspěvek se zabývá vývojem a validací metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie za účelem testování barviva Acid Black 26. Metoda slouží jako analytická podpora pro ekotoxikologické testování na sladkovodních řasách druhu *Desmodesmus subspicatus* a dafniích druhu *Daphnia magma*. Ekotoxikologické testy byly prováděny ve zřeďovací vodě pro dafnie a v testovacím médiu pro řasy. Důvodem testování je registrace REACH barviva Acid Black 26, jež je nutná pro nově zaváděnou chemickou látku v Evropské Unii. V práci jsou popsány validační parametry, vlastní vývoj metody, základní principy ekotoxikologických testů na dafniích a na řasách, které se prováděly v souladu s dokumenty OECD. Měření a testování probíhalo ve Výzkumném ústavu organických syntéz v Rybitví.

**Klíčová slova:** HPLC, validace, REACH, ekotoxikologické testy, řasy, dafnie, Acid Black 26

**ÚVOD**

Kyselé barvivo Acid Black 26 (ABl 26) je nově zaváděno na trh. Nová chemická látka, znovu obnovená výroba chemické látky popř. dovoz chemické látky musí v zemích Evropské Unie projít schvalovacím procesem (REACH) u příslušných orgánů. Pro registraci chemické látky, v našem případě barviva ABl 26, je nutné stanovit fyzikálně‑chemické, toxikologické a ekotoxikologické vlastnosti. Provádí se testování a získané výsledky se prezentují příslušným schvalovacím orgánům.

Barvivo ABl 26 se vyznačuje jako mírně kyselé s dobrými stálostmi na světle (na stupnici 1 – 8 má hodnotu 4) a dobrými mokrými stálostmi (stupnice 1 – 5, hodnota 4 – 5). IUPAC název je disodium 5‑({4‑[(4‑anilino‑3-sulfonatophenyl)diazenyl]1-naphthyl}diaze-nyl)-6-hydroxy-2-naphthalenesulfonate. Barvivo Acid Black 26 je černý prášek, o čistotě 95 %, ostatní složky tvoří 5 % (NaCl). 1

Testování vzorků barviva probíhalo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na diodovém detektoru (DAD). Byla využita metoda iontově párové chromatografie, kdy bylo do mobilní fáze přidáno iontově párové činidlo trimethyl(tetradecyl)amonium bromid (TMTAB) 0,05 M. 2.3

V zařízení HPLC byla použita chromatografická kolona LiChroCART® 250 ‑ 4 Lichrospher 100 RP – 18 o sféricitě 5 μm. 4,5

Pro ekotoxikologické testování je nezbytná validace analytické metody. Validace byla provedena na roztocích ABl 26 rozpuštěných v ultračisté vodě (UPW), ve zřeďovací vodě pro dafnie (DWD) a v testovacím médiu pro řasy (TMA). V práci byly testovány tyto validační parametry: přesnost metody, linearita, mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ) a stabilita roztoků.

Ekotoxikologické testy jsou biologické experimenty s účelem ověřit, jestli testované toxické látky jsou pro životní prostředí určitým způsobem závadné na základě biologických reakcí s organismy. Při testech byly organismy vystaveny různým koncentracím nebo dávkám zkoušené látky. 6 Pro test akutní toxicity na dafniích a test inhibice růstu řas byla provedena předběžná zkouška během 72 hodin (pro řasy) a 48 hodin (pro dafnie) a následně byl měřen úplný test inhibice růstu řas.

**EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

Pro testování barviva ABl 26 metodou HPLC byl použit methanol (HPLC VWR Chemicals PRO LABO) jako mobilní fáze (MF). Při měření se využívalo gradientové eluce, kdy docházelo k mísení mobilní fáze A: 60% methanolu s 0,005 M trimethyl(tetradecyl)amonium bromidem (TMTAB Sigma Aldrich, USA) a mobilní fáze B: 95% methanolu s 0,005 M TMTAB.

Testovaná látka Acid Black 26 byla analyzována na kapalinovém chromatografu model Shimadzu LC-2010HT (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a měření probíhalo při vlnové délce 272 nm v UV/VIS oblasti. Před kolonou byla použita předkolona LiChroCART® 4 ‑ 4 Lichrospher 100 RP – 18 o sféricitě 5 μm. Analýza probíhala při teplotě 30 °C, průtok zařízením byl nastaven na 1 ml/min, injektovaný objem vzorku byl 20 μl.

Vzorky pro analýzu byly připravovány o nominálních koncentracích 1 mg/l a 100 mg/l a ředěny daným médiem podle účelu testu (UPW, DWD, TMA). Změřené hodnoty byly vyhodnoceny metodou kalibrační přímky, pro každé médium byla připravena kalibrační řada kalibračních roztoků (CSS). Kalibrační řada se skládala ze čtyř kalibračních bodů o nominální koncentraci (0,5; 50; 120; 200 mg/l).

 Vzorky pro ekotoxikologické testy byly připravovány ekotoxikologickou skupinou VÚOS a to dvěma způsoby. První způsob zahrnoval přípravu tzv. „čerstvého“ roztoku barviva - v médiu (TMA, DWD) bylo rozpuštěno barvivo a podle účelu testu naočkovány řasy, popř. nasazeny dafnie. Druhý způsob přípravu „ustáleného“ roztoku, který byl míchán před samotným testováním 10 dní.

**VÝSLEDKY A DISKUZE**

**Výsledky validace analytické metody**

Získané výsledné hodnoty z validace analytické metody jsou shrnuty v Tabulce 1. Z hodnot získaných měřením byla vypočtena relativní směrodatná odchylka (RSD). Na Obrázku 1 je reprezentativní celý chromatogram vzorku barviva ABl 26 o koncentraci 1 mg/l.

Z výsledků validace vyplynulo, že látka se v jednotlivých médiích nechová standardně. V médiích DWD a TMA metoda neposkytovala správné výsledky (zejména v případě koncentrace 1 mg/l), proto byla metoda dále optimalizována.

*Tabulka 1: Naměřené hodnoty jednotlivých validačních parametrů analytické metody.*

|  |  |
| --- | --- |
| **Validační parametr** | **Získané hodnoty** |
| Opakovatelnost nápichu | * *Ultračistá voda*

RSD = 0,87 % rel. pro 1 mg/lRSD = 0,36 % rel. pro 100 mg/l* *Zřeďovací voda pro dafnie*

RSD = 5,14 % rel. pro 1 mg/lRSD = 4,91 % rel. pro 100 mg/l* *Testovací médium pro řasy*

RSD = 7,88 % rel. pro 1 mg/lRSD = 3,53 % rel. pro 100 mg/l |
| Opakovatelnost metody | * *Ultračistá voda*

RSD = 5,93 % rel. pro 1 mg/lRSD = 3,92 % rel. pro 100 mg/l* *Zřeďovací voda pro dafnie*

RSD = 16,42 % rel. pro 1 mg/lRSD = 8,60 % rel. pro 100 mg/l* *Testovací médium pro řasy*

RSD = 12,26 % rel. pro 1 mg/lRSD = 14,32 % rel. pro 100 mg/l |
| Správnost metody | * *Ultračistá voda*

Ø správnost = 72,56% pro 1 mg/lØ správnost = 104,39% pro 100 mg/l* *Zřeďovací voda pro dafnie*

Ø správnost = 58,35% pro 1 mg/lØ správnost = 114,13% pro 100 mg/l* *Testovací médium pro řasy*

Ø správnost = 129,12% pro 1 mg/lØ správnost = 91,55% pro 100 mg/l |
| Linearita | Analytická metoda je lineární v rozsahu nominálních koncentrací 0,5 – 200 mg/l pro UPW, DWD a TMA. |
| Mez (limit) detekce | UPW: LOD = 0,004 mg/lDWD: LOD = 0,038 mg/lTMA: LOD = 0,037 mg/l |
| Mez (limit) stanovitelnosti | UPW: LOQ = 0,015 mg/lDWD: LOQ = 0,125 mg/lTMA: LOQ = 0,123 mg/l |
| Stabilita (pětidenní) roztoku | Roztoky UPW, DWD, TMA jsou nestabilní. |



***Obrázek 1:*** *Celý chromatografický záznam vzorku barviva Acid Black 26.*

**Optimalizace metody plynoucí z výsledků validace**

Byla ověřena dlouhodobá stabilita roztoků v médiích s každodenním odběrem vzorků. Z té vyplynulo, že je třeba roztoky v médiích míchat a rozpouštět až 10 dní. Média pro testování (TMA, DWD) byla okyselena vzhledem k potřebám organismů na pH = 6, tj. na nejnižší možnou hodnotu, při které ještě mohou probíhat ekotoxikologické testy na řasách a dafniích. Za těchto upravených podmínek, kdy se předpokládá, že je již barvivo v kalibračním roztoku úplně rozpuštěno a včetně toho, že odběr vzorku média pro testování je reprezentativní, pak probíhaly předběžné testy a nakonec i úplné.

**Výsledky ekotoxikologických testů**

*Úplný test inhibice růstu řas*

Úplný test inhibice růstu řas vycházel ze získaných údajů předběžného testu. V předběžném testu byly porovnány oba přístupy k testování: příprava čerstvých roztoků pro řasy a vyhodnocení výsledků na čerstvý CSS; příprava ustáleného roztoku barviva pro řasy a vyhodnocení na ustálený CSS. Na základě výsledků předběžného testu bylo rozhodnuto, že pro úplný test bude roztok pro řasy míchán 10 dní a vyhodnocení bude probíhat na ustálený CSS. Úplný test byl proveden v šesti nasazeních o nominálních koncentracích 9, 13, 20, 30, 45, 67, 100 mg/l a 100 mg/l kontrolní roztok, který neobsahoval řasy. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 2.

*Tabulka 2: Souhrn získaných výsledků z úplného testu inhibice růstu řas.*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nominální koncentrace (mg/l)** | **Získaná koncentrace (mg/l)****0 hodin** | **Získaná koncentrace (mg/l)****24 hodin** | **Získaná koncentrace (mg/l)****48 hodin** | **Získaná koncentrace (mg/l)****72 hodin** |
| 9 | 11,680 | 8,828 | 8,083 | 7,653 |
| 13 | 12,808 | 12,107 | 11,648 | 9,637 |
| 20 | 16,283 | 13,125 | 19,851 | 13,981 |
| 30 | 23,854 | 16,920 | 18,317 | 15,708 |
| 45 | 30,590 | 31,175 | 30,988 | 22,935 |
| 67 | 46,411 | 40,513 | 44,163 | 38,723 |
| 100 | 64,543 | 69,688 | 69,221 | 57,893 |
| 100 bez řas | 57,034 | 59,186 | 61,776 | 54,178 |

Ze získaných výsledků bude vypočtena hodnota EC50 (efektivní koncentrace, která imobilizuje 50 % testovaného organismu) s použitím výpočetního programu Toxicita (VÚV Ostrava, ČR).

*Předběžný test akutní toxicity na dafniích*

Předběžný test sloužil pro předběžné ověření, zdali testovaná látka je či není toxická. Celý test probíhal 48 hodin v roztocích o nominálních koncentracích 1 mg/l a 100 mg/l. Během prvního předběžného testu nedošlo k žádnému úhynu dafnií, proto byl proveden znovu předběžný test, ale byl rozšířen o další roztoky o nominálních koncentracích 5, 10 a 50 mg/l. Výsledky testu jsou shrnuty v Tabulce 3. V průběhu rozšířeného předběžného testu opět nedošlo k úhynu dafnií. Testovaná látka v roztocích ve vybraných nominálních koncentracích 1 – 100 mg/l nebyla pro dafnie toxická.

*Tabulka 3: Souhrn získaných výsledků z rozšířeného předběžného testu akutní toxicity na dafniích.*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nominální koncentrace (mg/l)** | **Doba expozice (hodin)** | **Získaná koncentrace (mg/l)** | **Doba expozice (hodin)** | **Získaná koncentrace (mg/l)** |
| 1 | 0 | 1,183 | 48 | 0,565 |
| 5 | 0 | 4,937 | 48 | 3,911 |
| 10 | 0 | 10,296 | 48 | 8,222 |
| 50 | 0 | 46,740 | 48 | 39,513 |
| 100 | 0 | 82,579 | 48 | 70,996 |

**Závěr**

V experimentální části této práce byla optimalizována metoda kapalinové chromatografie pro testování barviva Acid Black 26 v destilované vodě, ve zřeďovací vodě pro dafnie a v testovacím médiu pro řasy. Metoda byla validována. Výsledky validace v parametrech stabilita roztoku, opakovatelnost metody i správnost nebyly dostačující. Proto se metoda na základě prodloužené stability (10 dní) a výsledků předběžných testů s různým způsobem přípravy kalibračních roztoků ještě dále optimalizovala. Touto metodou pak byly ověřeny koncentrace v rámci úplného testu inhibice řas a byl proveden i rozšířený předběžný test akutní toxicity na dafniích.

Na základě získaných dat lze konstatovat, že barvivo ABl 26 není pro dafnie toxické ve stanovovaném rozsahu nominálních koncentrací 1 ‑ 100 mg/l. Získané výsledky z testu inhibice řas byly poskytnuty ekotoxikologické skupině, která provede výpočet hodnoty EC50.

**Literatura**

1. KRYŠTŮFEK J., WIENER J. *Barvení Textilií I*. 1. Technická univerzita v Liberci: Vysokoškolský podnik Liberec, spol. s.r.o.
2. NOVÁKOVÁ L., DOUŠA M. a kolektiv. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*, Praha: Europrint a.s., 2013.
3. NOVÁKOVÁ L., DOUŠA M. a kolektiv. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*, Praha: Europrint a.s., 2013.
4. http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/LiChroCART-250-4- LiChrospher-100-RP-18-%285-%C2%B5m%29,MDA\_CHEM 150833#anchor\_Description, staženo 11. 4. 2016.
5. Česká chromatografická škola: <http://www.hplc.cz/>, staženo 29. 3. 2016.
6. *OECD* *Series on Testing and Assessment* (Paris), 147.