

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Využití plynové chromatografie v kontrole léčiv III.

Hradec Králové, 2009

Barbora Šínáková

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

V Hradci Králové dne

Barbora Šináková

Poděkování

Tímto děkuji PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. za odborné vedení při vypracování této diplomové práce. Především děkuji za ochotu a čas, který mi věnoval a za cenné připomínky v průběhu vypracování této práce.

OBSAH

1. ÚVOD	5
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1 Chromatografické metody	8
2.1.1 Rozdělení chromatografických metod	8
2.2 Plynová chromatografie	10
2.2.1 Základní pojmy ^{6,7}	10
2.2.2 Hlavní části plynového chromatografu	14
2.2.3 Hodnocení látek pomocí GC	21
2.3 Validace analytických metod	26
2.3.1 Parametry validace	27
2.4 Butan-1,3-diol a jeho vlastnosti	30
2.4.1 Základní charakteristika, použití a rizika pro člověka	30
2.4.2 Stanovení butan-1,3-diolu	32
3. CÍL PRÁCE	33
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
4.1 Použitý materiál	36
4.2 Validace chromatografické metody	37
4.2.1 Příprava a nástřik vzorků	37
4.3 Stanovení obsahu butan-1,3-diolu	39
4.3.1 Chromatografické podmínky analýzy, příprava a nástřik vzorků	39
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	41
5.1 Validace chromatografické metody	42
5.1.1 Selektivita	42
5.1.2 Linearita	43
5.1.3 Správnost	44
5.1.4 Mezilehlá přesnost	45
5.1.5 Robustnost	46
5.2 Vyhodnocení obsahu butan-1,3-diolu	51
6. ZÁVĚR	52
7. ABSTRAKT	54
8. ABSTRACT	56
9. LITERATURA	58

1. ÚVOD

Chromatografie je separační analytická fyzikálně chemická metoda pro separaci a analýzu směsí látek. Jejím základním principem je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. Chromatografické analýzy se zpravidla používají pro složité směsi látek, které mají navzájem dosti podobné chemické a fyzikální vlastnosti a které by se jinými metodami kvalitativně a kvantitativně analyzovaly jen velmi obtížně, pokud by to vůbec bylo možné. Výsledkem kvalitativní analýzy je zjištění, jaké látky jsou ve směsi obsaženy. Kvantitativní analýza ukazuje na množství jednotlivých složek ve směsi.

Plynová chromatografie (GC) má plynnou mobilní fázi, která unáší analyty kolonou, které se zachycují na stacionární fázi. Pro metodu GC je charakteristická především účinná a rychlá separace složitých směsí a práce s malými množstvími vzorků za použití relativně jednoduché aparatury.

Možnost aplikací plynové chromatografie je omezena na látky plynné, látky snadno těkavé a látky těkavé po derivatizaci. Původně byla použita v oboru biochemie pro analýzy mastných kyselin a aminů a při rozličných analýzách plynů. Významné uplatnění nalézá plynová chromatografie v průmyslu organických syntéz. Derivatizace umožňující převést analyty na těkavé produkty umožnila širší aplikace GC v lékařských, biologických a biochemických oborech (analýzy lipidů, steroidů, aminokyselin v tělních tekutinách). Standardně se používá ke sledování kvality ovzduší. Významnou aplikací je určení stopových množství pesticidů v půdě, ve vodách a potravinách.

V této diplomové práci byla validována metoda pro stanovení obsahu butan-1,3-diolu pomocí GC. Butan-1,3-diol se používá v chemickém průmyslu jako rozpouštědlo a nosič aromatických látek, k výrobě umělých hmot a třaskavin. Přidává se do nemrznoucích směsí v chladičích. Dále se používá v kosmetických přípravcích a vyskytuje se v pesticidech. Pro své antimikrobiální účinky je přidáván do čistících prostředků. Prodlužuje účinnost injekčních přípravků a zvyšuje účinnost rozpuštěných účinných látek. Dalším úkolem bylo stanovit obsah butan-1,3-diolu.^{1,2,15}

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chromatografické metody

Chromatografie patří mezi metody separační, které umožňují analýzu směsí. Výsledky analýzy se dají posuzovat z hlediska kvalitativního nebo kvantitativního. Vzhledem k tomu, že většina přírodních látek se vyskytuje ve směsích, jsou tyto metody velmi široce využívány.

Separace je proces, kdy dochází k dělení analyzovaných složek mezi dvěma fázemi – stacionární a mobilní. Při průtoku mobilní fáze plošnou vrstvou nebo kolonou dochází mezi vzorky a stacionární fází k vzájemným interakcím. Na základě různé afinity dělených složek ke stacionární fázi pak dochází k separaci. Látky, které se stacionární fází interagují silněji, zůstávají zadrženy na koloně či v ploše déle, zatímco látky se slabšími interakcemi se eluují rychleji.^{3,4}

2.1.1 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody lze rozdělit dle různých kritérií.

1) podle charakteru mobilní fáze

- **plynová chromatografie** – mobilní fází je plyn, stacionární fáze může být jak kapalina upevněná na vhodném nosiči tak pevná látka
- **kapalinová chromatografie** – mobilní fází je kapalina, stacionární fáze může být jak pevná látka tak kapalina s mobilní fází nemísitelná nebo pouze omezeně mísitelná, upevněná na vhodném nosiči

2) podle uspořádání stacionární fáze

- **kolonová chromatografie**
 - HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
 - GC (plynová chromatografie)
- **plošné techniky**
 - PC (papírová chromatografie)
 - TLC (tenkovrstvá chromatografie)

3) podle podstaty separačního procesu

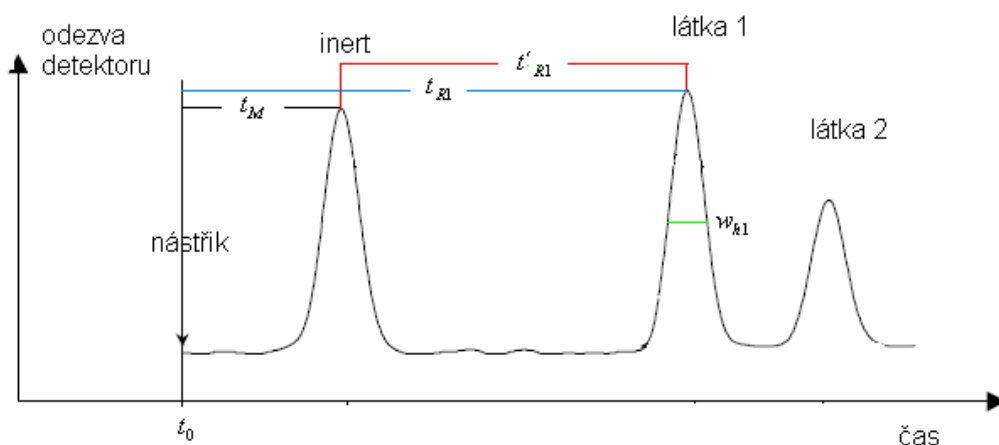
- **adsorpční chromatografie** – podstatou je různá schopnost složek poutat se na povrch stacionární fáze
- **rozdělovací chromatografie** – podstatou je různá rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi
- **iontově výměnná chromatografie** – podstatou separace je různá afinita iontů vzorku k iontovýměnným skupinám iontoměniče jakožto stacionární fáze
- **gelová chromatografie** – analyty se separují na základě velikosti molekul, které nese mobilní fáze a zachycují se v pórech stacionární fáze (gelu). Molekuly větší než póry gelu se eluují z kolony rychleji bez zadržení.
- **afinitní chromatografie** – stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku určité složky, ke kterým má úzkou specifitu = afinitu.^{3,4}

2.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je citlivá analytická metoda s velkou separační účinností. Používá se pro analýzu plynů a látek těkavých, které lze zahřáním převést na páry, aniž by se rozkládaly. Většina léčiv se ale za zvýšené teploty rozkládá a proto se před analýzou musí derivatizovat vhodnými činidly za vzniku těkavých derivátů analytu. Z tohoto hlediska se v analýze léčiv mnohem častěji využívá vysokoúčinné kapalinové chromatografie.⁴

2.2.1 Základní pojmy^{6,7}

Schéma chromatogramu: viz obr. č. 1



Obr. č. 1: Popis chromatogramu

Retenční objem V_R : objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od počátku ke konci separační kolony

Retenční čas t_R : čas, za který se eluuje látka a je detekována

Mrtvý čas t_M (někdy označován t_0): čas od nástřiku po detekci inertu (MF)

Redukovaný retenční čas t'_R : čas detekce 1. látky redukovaný o mrtvý čas

$$t'_R = t_R - t_M$$

Hmotnostní distribuční objem D_m : vyjadřuje kapacitu kolony, míru sorpce analytu na koloně, též se značí jako kapacitní faktor k' nebo retenční faktor k

$$D_m = \frac{c_{SF}}{c_{MF}} \quad \text{nebo} \quad D_m = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

kde

c_{SF} je množství rozpuštěné látky ve stacionární fázi

c_{MF} je množství rozpuštěné látky v mobilní fázi

- obvyklé hodnoty D_m se pohybují mezi 2 až 10
- $D_m < 2$ – látka se málo sorbuje na koloně
- $D_m > 10$ – látka se eluuje příliš pozdě

Zdánlivý počet teoretických pater N : vyjadřuje účinnost kolony, kolona je složena z mnoha úseků, tzv. teoretických pater, kde dochází k zadržování látek a vytváření tzv. elučních zón analytu. Čím déle zůstává analyt na koloně, tím jsou větší eluční zóny analyzované látky. Velikost elučních zón pak odpovídá šířce píků analytu.

- čím více teoretických pater, tím lépe, ale závisí to na délce kolony

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

kde

w_h je šířka píku v jeho polovině

Výškový ekvivalent teoretického patra H : je úměrný šířce eluční zóny analytu

- čím menší výška patra, tím lépe (analogicky k počtu teoretických pater)

$$H = \frac{L}{N}$$

kde

L je délka kolony

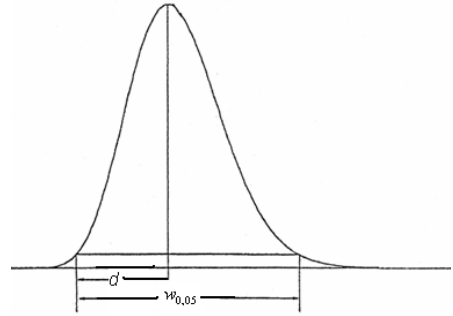
Faktor symetrie píku A_s : vyjadřuje míru symetrie píku podle myšlené svislé osy vedené hrotem píku. Čím je pík symetričtější ($A_s \rightarrow 1$), tím je analýza kvalitnější.

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

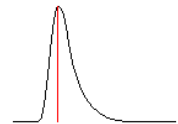
kde

$w_{0,05}$ je šířka píku v jeho 1/20

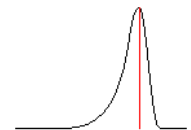
d je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky



- ideální hodnota A_s je 1,0, akceptovatelné jsou hodnoty 0,8 až 1,5
- $A_s > 1,0$ – dochází k chvostování (tailing), stává se často u bazí v HPLC



- $A_s < 1,0$ – objevuje se tzv. fronting, stává se častěji v GC



Selektivita kolony vyjádřená relativní retencí r : ukazuje na relativní separaci dvou složek, též separační faktor α

$$r = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

- čím větší r , tím dále jsou v chromatogramu píky vzdáleny od sebe

Rozlišení R_s : vyjadřuje jak dobře se separují dvě po sobě eluující se složky směsi, kvalitní separace je až na základní linii

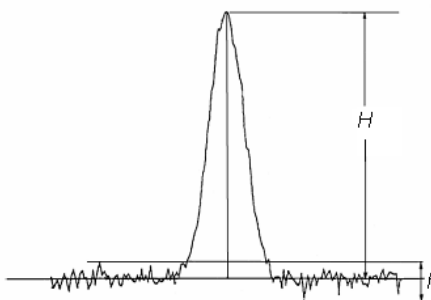
$$R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \text{ nebo}$$

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{r-1}{r} \cdot \frac{D_m}{1+D_m} \equiv \text{účinnost} \cdot \text{selektivita} \cdot \text{kapacita}$$

- teprve když je hodnota $R_s > 1,5$, lze hovořit o separaci na základní linii

Poměr signálu k šumu S/N:

$$S/N = \frac{2H}{h}$$



kde

- H* výška píku odpovídající dané látce na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku měřená od vrcholu píku k základní linii signálu, který se sleduje na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky
- h* rozpětí šumu základní linie na chromatogramu získané při slepé zkoušce a zaznamenávané na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku, pokud možno rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se měl nacházet sledovaný pík

Opakovatelnost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka $RSD_{\%}$:
využívá se ke kvantitativnímu hodnocení

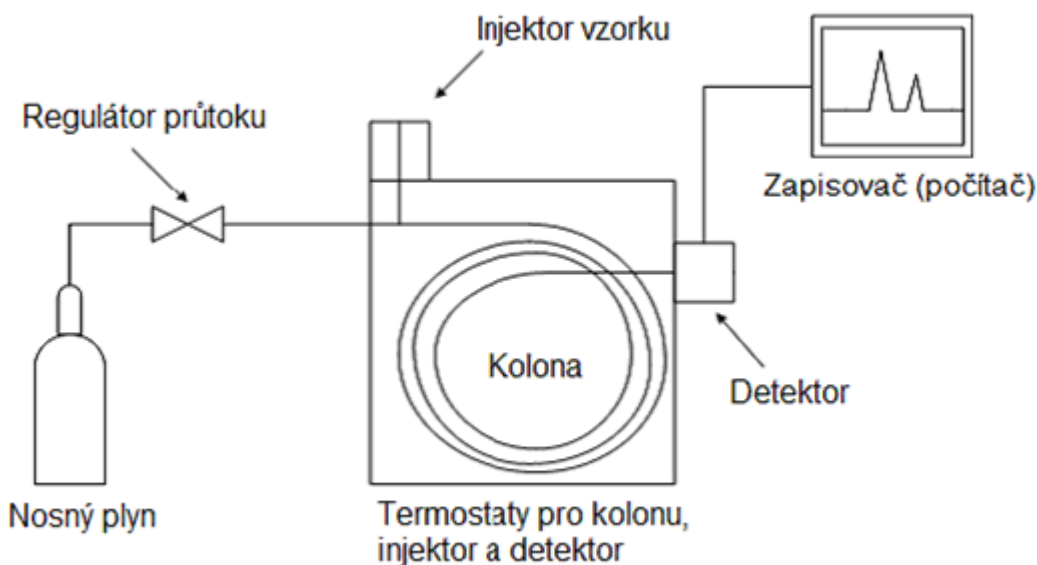
$$RSD_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} \cdot \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

kde

- y_i jsou jednotlivé naměřené hodnoty
- \bar{y} aritmetický průměr naměřených hodnot
- n počet měření

2.2.2 Hlavní části plynového chromatografu

2.2.2.1 Základní schéma plynového chromatografu (obr. č. 2)

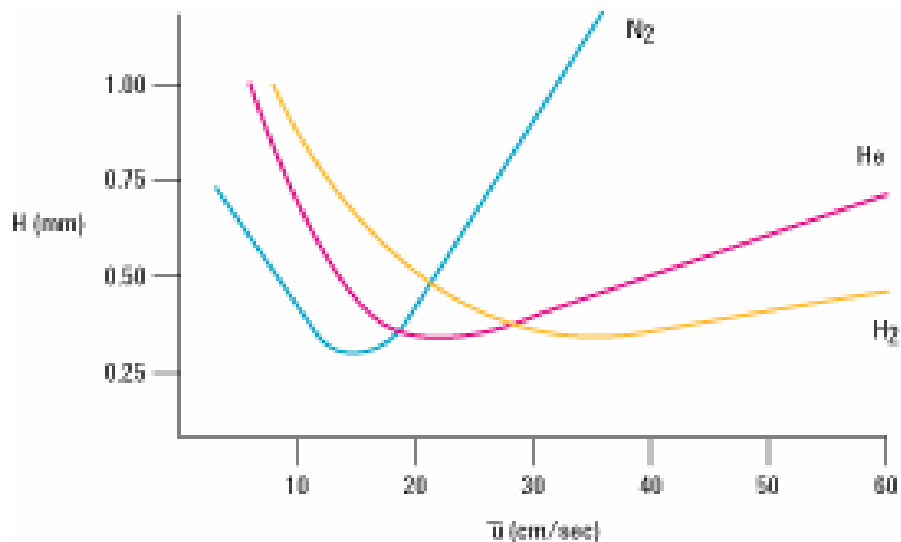


Obr. č. 2: Schéma plynového chromatografu

2.2.2.2. Nosný plyn

V plynové chromatografii je mobilní fáze představována nosným plynem. Jako nosné plyny se nejčastěji používají vodík, dusík, helium popř. argon. Na rozdíl od ostatních separačních metod se nosný plyn neúčastní slabých interakcí s analytem. Při volbě nosného plynu se uvažují následující faktory: viskozita, účinnost, čistota, reaktivita, typ používaného detektoru a cena plynu. Hlavním problémem nosných plynů je přítomnost nečistot interagujících s analytem nebo stacionární fází. Kritickými nečistotami jsou vodní pára a kyslík. Z tohoto důvodu se za zdroj nosného plynu umísťuje čistící zařízení, které zachycuje vlhkost a nečistoty v nosném plynu.

Účinnost kolony se dá kvantifikovat pomocí výškového ekvivalentu teoretického patra. Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na průměrné lineární rychlosti mobilní fáze pro daný typ nosného plynu zobrazují van Deemterovy křivky (obr. č. 3).^{8,9}



Obr. č. 3: Závislost výškového ekvivalentu (H) na průměrné lineární rychlosti (u) u nejpoužívanějších nosných plynů

2.2.2.3 Regulátory tlaku a průtoku

Jedná se o elektronické regulační zařízení, které slouží k ovládání průtoku a tlaku nosného plynu. Regulátor průtoku zaručuje konstantní průtok plynu kolonou a detektorem bez ohledu na typ nosného plynu, teplotu a rozměry kolony. Tlak je potom proměnnou veličinou a nastaví se automaticky podle viskozity plynu, vnitřního průměru kolony a délky kolony tak, aby průtok kolonou byl konstantní.⁹

2.2.2.4 Injektor

Injektor je vstupem analyzované látky do plynového chromatografu. Nástřik látky se nejčastěji provádí pomocí speciální injekční stříkačky přes septum, které odděluje vnitřek injektoru od vnějšího prostoru. Součástí injektoru je skleněná vložka (liner), ve které dochází vysokou teplotou k rychlému odpaření vzorku a ke správnému promíchání par vzorku s nosným plynem. Mezi injektorem a kolonou je zařazen dělič toku (splitter), který umožňuje vést jen část odpařeného vzorku na kolonu (splitovací poměr, split ratio).

Injektor musí splňovat následující požadavky:

- vzorek vstupující na kolonu musí mít co nejmenší objem
- nesmí dojít k rozkladu vzorku v injektoru během odpaření
- nesmí docházet k diskriminaci komponent vzorku
- signál rozpouštědla nesmí ovlivňovat plochu signálů analytů

Splitování

Splitování je technika nástřiku, při které je směs vzorku a nosného plynu v injektoru rozdělena na dvě nestejně části. Menší část vstupuje na kolonu, větší část odchází do odpadu.

Splitovací poměr (split ratio)

Splitovací poměr závisí na relativní velikosti průtoku splitovacím ventilem a kolonou a lze jej vypočítat podle následujícího vztahu:

Splitovací poměr = (průtok splitovacím ventilem+průtok kolonou)/průtok kolonou

Nástřik bez splitu (splitless injection)

Při této technice nástřiku jde celý objem injektoru přímo na kolonu, aniž by se rozděloval. Používá se při stopové analýze nebo pro analýzu směsí látek, které se výrazně liší v bodu varu.⁹

2.2.2.5 Kolona

Kolona je umístěna v peci (oven), která je temperována na určitou teplotu. Teplota je důležitá proměnná v plynové chromatografii. Pokud je teplota kolony během analýzy vzorku konstantní, jedná se o izotermální analýzu. Naproti tomu pro analýzu vzorku vícesložkových směsí látek s rozdílnými body varu je vhodné použít teplotního gradientu. To znamená, že teplota kolony během analýzy se bude měnit podle vytvořeného teplotního programu. Výhodou použití teplotního gradientu je zlepšení tvaru chromatografických píků (zúžení signálů, vyšší citlivost) a výrazné zkrácení doby analýzy.

V plynové chromatografii lze použít dva typy kolon: náplňové kolony a kapilární kolony.

Náplňové kolony

Náplňové kolony jsou trubice naplněné sorbenty nebo nosiči se zakotvenou kapalnou fází. Jsou vyrobeny z oceli, skla apod. Vnitřní průměr kolony je 2 až 4 mm, délka nejvýše 4 m. Mají vyšší kapacitu než kapilární kolony. Příklady náplní adsorbentů pro adsorpční chromatografii jsou silikagel nebo oxid hlinitý. Nosiče kapalné fáze pro rozdělovací chromatografii jsou na bázi oxidu křemičitého. Upravují se tak, aby se při separaci neuplatňovaly jejich

adsorpční schopnosti, protože separace složek mezi nosným plynem a zakotvenou kapalnou fází má probíhat pouze na principu rozdělování.

Moderní účinné náplňové kolony o menším vnitřním průměru jsou mikronáplňové kolony, které obsahují velmi malé částice náplně. Díky tomu se při stejné délce běžné náplňové kolony dosahuje vyšší účinnosti separace.

Kapilární kolony

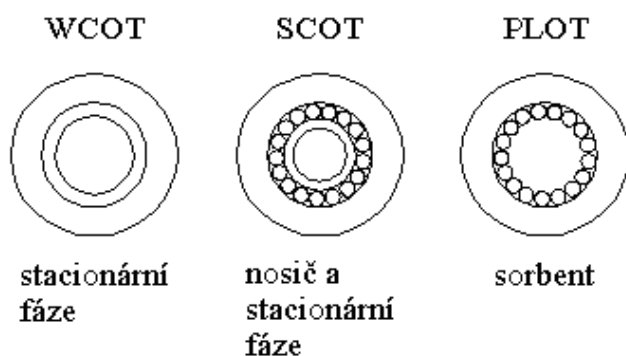
Kapilární kolony se vyrábějí z oceli nebo křemenného skla a kvůli pevnosti jsou potaženy filmem polyimidu. Vnitřní průměr kolony bývá 0,2 až 0,75 mm. Délka se může pohybovat od desítek do stovek metrů, přičemž pro většinu analýz postačuje délka kapiláry 30 m. Stacionární fáze je rozprostřena na vnitřních stěnách kapiláry.

Jsou 3 typy kapilárních kolon viz obr. č. 4:

- WCOT (Wall Coated Open Tubular), kde nosičem stacionární fáze je vnitřní stěna kapiláry.

- SCOT (Support Coated Open Tubular), mají na vnitřní stěně vrstvu nosiče se zakotvenou kapalinou.

- PLOT (Porous Layer Open Tubular), mají na vnitřní stěně tenkou vrstvu pórovitého materiálu, např. oxidu hlinitého, která slouží jako adsorbent.



Obr. č. 4: Průřezy jednotlivých typů kolon

Volba stacionární fáze je obvykle rozhodující pro výběr vhodné kolony pro náš vzorek. Důležitá je polarita separovaných složek.^{3,4,9,10}

Příklady adsorbentů v plynové chromatografii

- **Aktivní uhlí, grafitizované uhlí** – dělení plynů a lehkých uhlovodíků
- **Silikagel** – dělení anorganických plynů a nízkovroucích kapalin
- **Molekulová síta (krystalické hlinitokřemičitany)** – dělení plynů a lehkých uhlovodíků
- **Porézní polymery (vinylbenzenové kopolymery), tzv. Porapaky** – dělení nízkomolekulárních uhlovodíků, anorganických plynů, alkoholů, esterů a ketonů

Příklady kapalných stacionárních fází v plynové chromatografii

- **Carbowaxy (polyethylenglykoly)** – polární stacionární fáze
- **Ucony (polypropylenglykoly)** – polární stacionární fáze
- **Polyestery (např. polyethylenglykoladipáty, –sukcináty)** – polární stacionární fáze
- **Polysiloxany (např. methylpolysiloxan SE-30)** – široké rozmezí polarity, jsou často používané¹⁰

2.2.2.6 Detektor

Detektor je zařízení, které vysílá signály v závislosti na přítomnosti složky v nosném plynu. Přítomnost složky je zjišťována měřením určité vlastnosti plynu přicházejícího z kolony. Tato měřená vlastnost musí mít vztah k druhu a koncentraci složek vzorku (analytická vlastnost).

Detektor musí mít dostatečnou citlivost. Čím vyšší má citlivost, je schopný detekovat tím nižší nejmenší postřehnutelný obsah složky. Teplota detektoru by měla být vyšší než je teplota plynu vycházejících z kolony, aby se zabránilo kondenzaci látek na stěnách detektoru. Detektory jsou univerzální a selektivní.

Tepelně vodivostní detektor (TCD)

Tento typ je oblíbený pro svou univerzálnost. Nosný plyn proudí přes vlákno žhavené konstantním elektrickým proudem a ochlazuje ho na určitou teplotu. Přítomnost složky změní tepelnou vodivost prostředí kolem žhaveného vlákna a tím změní vlákno svou teplotu. Změna teploty vyvolá změnu elektrického odporu vlákna. Obvykle se pracuje se dvěma vlákny. Přes jedno

proudí čistý nosný plyn a přes druhé proudí plyn z kolony. Porovnávají se jejich elektrické odpory.

Pro použití je důležitá volba nosného plynu. Jeho tepelná vodivost se má co nejvíce odlišovat od tepelné vodivosti analyzovaných složek. Proto se dává přednost vodíku a heliu před dusíkem. Nejvíce se používá při analýzách anorganických plynů a nízkomolekulárních organických látek.

Plamenový ionizační detektor (FID)

Tento detektor je nejpoužívanějším detektorem v plynové chromatografii. Sestává z ocelové trysky, do které vstupuje směs nosného plynu, vodíku a doplňkového plynu. Na špičce mikrohořáku dochází v proudu vzduchu ke spálení této směsi na ionty, které se sbírají na polarizovaných elektrodách a generují proud, jenž se zesiluje a předává na zapisovač. FID poskytuje odezvu téměř na všechny organické látky, pro uhlovodíky je odezva úměrná počtu uhlíkových atomů v molekule. Nedetekuje anorganické látky a z organických látek nereaguje na formaldehyd a kyselinu mravenčí.

Plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem (AFID)

Je modifikací FID. Opět dochází k ionizaci v kyslíko-vodíkovém plameni. V tomto případě je však veden přes prsteneček solí alkalických zemin. Ionty alkalického kovu se v plameni dostávají do plynné fáze a dobře reagují s heteroatomy organických látek, zejména s fosforem a dusíkem. Je tedy především selektivní pro tyto typy sloučenin.

Bezplamenový detektor s alkalickým kovem

Zdrojem iontů alkalického kovu je elektricky vyhříváná sůl alkalického kovu. Na jejím povrchu se působením vysoké teploty spaluje vodík. Uvolněná energie ze spalování nestačí na ionizaci uhlovodíků, postačuje však na specifické reakce s fragmenty obsahujícími fosfor a dusík. Velká selektivita a citlivost detektoru na tyto látky umožňuje detekci opiátů či látek používaných k dopingování.

Detektor elektronového záhytu (ECD)

Nosný plyn (dusík) je vlivem β -záření v detektoru ionizován, čímž vzniká konstantní proud pomalých elektronů. Ty zachytávají atomy halogenu (elektronegativní atomy) a tím dochází ke snížení ionizačního proudu. Zdrojem ionizující energie je radioaktivní zářič ^3H nebo ^{63}Ni . Detektor je velmi citlivý na halogeny, nitrosloučeniny, areny a sloučeniny obsahující fosfor, kyslík, síru či olovo. Je tedy velmi vhodný pro stopovou analýzu pesticidů v životním prostředí.

Fotoionizační detektor (PID)

Princip tohoto detektoru je založen na ionizaci organických látek fotonem ultrafialového záření a následné detekci uvolněných elektronů. Vhodnou volbou vlnové délky ultrafialového záření se významně ovlivní selektivita detektoru. Ionizují se organické látky, kyslík, amoniak či sulfan. Je velmi citlivý (až 100 krát více než FID).

Plamenofotometrický detektor (FPD)

Zde dochází k aktivaci organických látek obsahujících fosfor nebo síru v kyslíko-vodíkovém plameni. Aktivované látky emitují záření, které je detekováno.

Hmotnostní spektrometr (MS)

Principem tohoto detektoru je ionizace neutrálního atomu nebo molekuly za vzniku iontů a jejich fragmentů. Ty jsou dále separovány a detekovány na základě poměru m/z , kde m je hmotnost iontu a z je náboj iontu. Spojení GC-MS je nepostradatelné tam, kde provádíme identifikace neznámých složek směsí. Pro každou složku se získá její hmotnostní spektrum a porovnáním jejího spektra s knihovnou spekter v počítači ji lze většinou identifikovat.^{3,4,9}

2.2.3 Hodnocení látek pomocí GC

2.2.3.1 Kvalitativní analýza na základě retenčních dat

Kvalitativní analýzou vzorku rozumíme určení složení vzorku, tj. ze kterých složek se vzorek skládá. Základním parametrem, kterým lze popsat složku v plynové chromatografii je její retenční čas, resp. redukovaný retenční čas. Retenční data analytu odráží specifické interakce analytu se stacionární a mobilní fází. Jelikož tyto veličiny jsou závislé na experimentálních podmínkách (rozměry kolony, průtoková rychlost nosného plynu, teplota kolony, tlakový spád na koloně), nemůžeme srovnávat výsledky získané za různých experimentálních podmínek. Proto retenční data vyjadřujeme pomocí specifických retenčních objemů nebo srovnáním s retenčními časy standardů.

Specifický retenční objem V_s je velmi přesně definovaná veličina nezávislá na experimentálních podmínkách. K jejímu výpočtu však musíme znát mnoho parametrů, které nejsou vždy dostupné. Z tohoto důvodu se v kvalitativní analýze běžně nepoužívá.

Daleko rozšířenějším způsobem je užití retenčních časů R_t . Při této metodě se srovnává retenční čas neznámé látky s retenčním časem standardu. Standard je látka, u které známe strukturu a předpokládáme, že neznámá látka je s ní identická. Neznámá látka i standard však musí být měřeny za stejných chromatografických podmínek. Pokud se relativní časy neznámé látky i standardu shodují a byly měřeny za stejných chromatografických podmínek, pak můžeme prohlásit obě látky za identické.

Další možnou identifikaci můžeme provádět na základě retenčních indexů RI . Zde nepotřebujeme mít známou látku (standard), naopak porovnáváme retenční časy neznámé látky s určitou látkou nebo skupinou látek, které slouží jako referenční látky. V tomto systému identifikace látek se pak retenční čas přepočítává na tzv. Kovatsův retenční index, dle jména svého autora. Neznámá látka se tedy identifikuje na základě srovnání retenčního indexu s retenčními indexy látek známých z literatury. V Kovatsově indexovém systému se retenční data chemických komponent naměřené za daných chromatografických podmínek vztahují na homologickou řadu n-alkanů.

Jednotlivým n-alkanům jsou přiřazeny hodnoty retenčních indexů, které jsou stonásobkem počtu uhlíkových atomů v jejich molekule.

Výpočet retenčního indexu *RI*

$$RI_x = 100 \frac{\log V'_{Rx} - \log V'_{Rn}}{\log V'_{Rn+1} - \log V'_{Rn}} + 100n$$

kde

V'_{Rx} je redukovaný retenční objem vzorku

V'_{Rn} je redukovaný retenční objem nejbližšího nižšího n-alkanu

V'_{Rn+1} je redukovaný retenční objem nejbližšího vyššího n-alkanu

n počet atomů uhlíku v nejbližším nižším n-alkanu.

Místo redukovaných retenčních objemů lze dosadit i redukované retenční časy, čisté retenční objemy, specifické objemy nebo relativní retence. Podmínkou jsou stejné standardy.

Retenční index je charakteristický pro danou látku, ale závisí na stacionární fázi a teplotě. Proto je vhodné uvádět tyto údaje jako horní a dolní index. Platí, že teplotní závislost je větší pro polární komponenty na polárních fázích ve srovnání s méně polárními látkami na nepolárních fázích. V případě nepolárních fází je retenční index na teplotě téměř nezávislý.

Jestliže mají standard a stanovovaná látka rozdílné retenční chování, pak lze jednoznačně tvrdit, že jde o různá chemická individua. Naopak shoda retenčních dat ještě není důkazem identity standardu a sledované látky. Teprve když nastane retenční shoda se standardem dvakrát, tj. na stacionárních fázích různé polarity při různé teplotě, můžeme s vysokou pravděpodobností tvrdit, že jde o totožné látky.

Poslední možností identifikace látek je použití relativních retenčních časů. Při této metodě se retenční čas analytu vztahuje na mrtvý čas t_M nebo na retenční čas určité vhodné látky (standardu), která se přidává do vzorku. Nejjednodušším způsobem vyjádření relativní retence je poměr redukovaných retenčních časů složky a standardu t_R (redukovaných o mrtvý čas t_M). S použitím relativních retenčních časů se pak eliminuje vliv délky kolony, fluktuace průtoku, teploty apod. Největším problémem je najít vhodný standard

takových vlastností, aby tvořil samostatný pík a relativní retence byla nejmýše 4.^{9,11}

2.2.3.2 Kvantitativní analýza

Kvantitativní analýzou rozumíme určení množství nebo koncentrací jednotlivých složek ve vzorku. Veličinou charakterizující množství vzorku prošlého detektorem je plocha či výška chromatografického píku. Za předpokladu lineární odezvy detektoru je plocha či výška píku úměrná množství látky. To umožňuje určovat množství či koncentraci dané látky v neznámém vzorku na základě použití vzorku dané látky o známém množství či koncentraci, tzv. standardu. Kvalita kvantitativní analýzy je především ovlivněna přípravou vzorku, správnou funkcí přístroje a kvalitou zpracování dat, s čímž také souvisí správná volba kalibrační metody.

Kalibrační graf

Jak již bylo řečeno, v oblasti lineární odezvy detektoru je plocha či výška píku úměrná množství látky. To znamená, že se stanoví závislost plochy píku dané látky na známém množství či koncentraci standardu a sestojí se příslušný graf.

Kalibrační přímku lze pak vyjádřit vzorcem:

$$y = a + b \cdot x$$

kde

x je nezávislá proměnná (= koncentrace standardu)

y je závislá proměnná (= odezva, plocha píku)

a je úsek na ose y

b je směrnice přímky

Kvantitativní výpočtové metody

1) metoda vnitřní normalizace

Touto metodou se určuje obsah látek ve směsích, je-li počet komponent relativně nízký a všechny komponenty jsou známy. Běžně se používá při rutinních stanoveních. Množství určité komponenty se vyjadřuje jako relativní frakce z celku. To znamená, že v určité směsi je x % látky A, y % látky B,

z % látky C atd. Výsledky při použití této metody nezávisí na přesnosti objemu při nástřiku vzorku.

2) metoda absolutní kalibrace

Touto metodou se určuje absolutní koncentrace nebo absolutní množství látky na základě kalibrační závislosti. Na rozdíl od předchozí metody je zde kritický objem nástřiku. Správnost této metody tedy závisí na dobré reprodukovatelnosti dávkovaných objemů. Doporučuje se pracovat s autosamplerem.

Neznámé množství vzorku lze vypočítat z rovnice

$$\frac{c_x}{A_x} = \frac{c_s}{A_s}$$

kde

c_x neznámá koncentrace stanovované látky X

c_s vzorek o známé koncentraci látky X

A_x plocha píku stanovované látky X

A_s plocha píku odpovídající látce X ve známém vzorku

3) metoda vnitřního standardu

Při této metodě se ke vzorku přidává určité množství známé látky, tzv. interní standard (IS). Tato látka nesmí být přítomna v původním vzorku, nesmí reagovat s žádnou složkou vzorku, musí být dobře oddělena od všech složek v původním vzorku a musí se eluovat v blízkosti stanovované složky.

Výhodou metody je to, že není třeba znát přesný objem nástřiku vzorku. Navíc, s použitím IS se eliminuje vliv změn pracovních podmínek, protože jak stanovovaná složka tak IS jsou těmito změnami stejně ovlivněny.

Koncentrace složky X ve vzorku lze vypočítat pomocí faktoru citlivosti detektoru f_x (response factor), který je potřeba stanovit kalibrací pro danou komponentu a daný vnitřní standard.

Kalibrační přímka má tvar

$$\frac{A_x}{A_{IS}} = f_x \frac{c_x}{c_{IS}}$$

kde

A_x je plocha signálu analytu X ve standardním roztoku

A_{IS} je plocha signálu vnitřního standardu ve standardním roztoku analytu X

f_x je tzv. response factor detektoru

c_x je koncentrace standardního roztoku analytu X

c_{IS} je koncentrace vnitřního standardu ve standardním roztoku analytu X

4) metoda standardního přídavku

Při použití této metody se ke vzorku přidává známé množství stanovované látky. Z plochy píku látky obsažené ve vzorku a plochy píku po přidání definovaného množství látky ke vzorku lze vypočítat množství látky v původním vzorku. V závislosti na typu komponenty se tento přídavek může provést buď ve formě čisté látky nebo jako roztok dané látky ve vhodném rozpouštědle. Stanovení může být založeno na jednom nebo několika přídavcích známého množství analytu k neznámému vzorku.^{9,11}

2.3 Validace analytických metod

Validace je proces, při kterém se zjišťují důležité charakteristiky metody. Smyslem validace je dokázat, že vypracovaná metoda je pro daný účel vhodná. Cílem validace je určit podmínky, za kterých je daný postup použitelný a spolehlivý při opakovaném měření ve stejné i jiné laboratoři, jedním či více pracovníky.

Validace se provádí vždy při vývoji nové metody, jestliže byla metoda změněna, byly provedeny změny v syntéze dané látky, změnilo se složení finálního produktu, má-li se pracovat v jiné laboratoři, nebo se prokazuje rovnocennost dvou metod. Zjištěné hodnoty validačních parametrů se zpracovávají do validačního protokolu, který musí obsahovat i patřičnou dokumentaci, např. chromatogramy.

Analytické metody musejí splňovat určité požadavky, podle toho ke kterému účelu budou použity (tab. č. 1). Nejběžněji provádíme stanovení:

- identifikace
- obsahu nečistot (kvantita)
- limitního množství nečistot
- obsahu látky ve vzorku

Stanovení Parametry	Identifikace	Testování nečistot		Obsah
		kvantitativní	limitní	
Správnost	-	+	-	+
Přesnost - opakovatelnost	-	+	-	+
Mezilehlá přesnost	-	+ (1)	-	+ (1)
Selektivita	+	+	+	+
Detekční limit	-	-	+	-
Kvantitativní limit	-	+	-	-
Linearita	-	+	-	+
Rozsah	-	+	-	+
Robustnost	-	+	-	+

Tab. č. 1: Přehled testovaných validačních parametrů podle účelu stanovení

(1) neprovádí se, pokud je provedena reprodukovatelnost^{5,12}

2.3.1 Parametry validace

Správnost (accuracy)

Správnost vyjadřuje těsnost souhlasu mezi experimentálně naměřenými hodnotami a správnou (konvenční) hodnotou měřené veličiny.

Správnou hodnotu můžeme zjistit buď jinou nezávislou metodou s ověřenou správností, nebo musíme připravit vzorek ze všech složek přípravku a přesně definovaného standardu. Správnost obvykle zjišťujeme analýzou nejméně šesti vzorků a vyjadřujeme ji jako rozdíl správné a získané hodnoty nebo jako výtěžnost R (recovery) v procentech.

$$R = (\text{zjištěné množství LČ} / \text{přidané množství LČ}) \cdot 100$$

Přesnost (precision)

Přesnost je míra shody výsledků zjištěných při sérii měření stejného homogenního vzorku za stejných podmínek. Přesnost se vyjadřuje jako relativní směrodatná odchylka $RSD\%$. Podle podmínek opakování se rozlišují 3 úrovně přesnosti.

1) Opakovatelnost (repeatability)

Měření se opakuje stejnou metodou, za stejných podmínek, stejným pracovníkem, ve stejné laboratoři, na tomtéž přístroji, se stejnými činidly v krátkém časovém intervalu.

2) Mezilehlá přesnost (intermediate precision)

Metodu provádíme v jedné laboratoři se stejným vzorkem, ale v různých dnech, různými pracovníky, na různých přístrojích s různými činidly.

3) Reprodukovatelnost (reproducibility)

Metodu provádíme za stejných podmínek jako v mezilehlé přesnosti, ale v různých laboratořích.

Selektivita (specificity)

Selektivita je schopnost určit správně a přesně danou látku v přítomnosti dalších složek, jako jsou např. pomocné látky, nečistoty z výroby, rozkladné produkty, zbytková rozpouštědla atd. Výsledkem je porovnání chromatogramů s a bez analyzované látky a samotného standardu.

Detekční limit (limit of detection) LOD

Detekční limit je nejmenší zjistitelné množství látky ve vzorku, které se nestanovuje kvantitativně. Je vyjádřením citlivosti metody. U instrumentálních metod ji určujeme jako nejnižší koncentraci analyzované látky, která je ještě detekovatelná oproti šumu v základní linii s poměrem signálu k šumu s hodnotou 3. U neinstrumentálních metod ji zjišťujeme experimentálně.

Kvantitativní limit (limit of quantitation) LOQ

Kvantitativní limit je nejmenší koncentrace léčiva, kterou ještě můžeme kvantifikovat za daných podmínek s akceptovatelnou přesností a správností. Je též parametrem citlivosti metody. Někdy to může být nejnižší bod kalibrační křivky. Vyjadřuje se jako koncentrace s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10.

Linearita (linearity)

Linearita je schopnost poskytovat výsledky přímo úměrné koncentraci analyzované látky neboli rozmezí koncentrací, kde je lineární vztah koncentrace analytu k odezvě detektoru. Stanovuje se minimálně pět různých koncentrací vzorku od 80% do 120%. Výsledek vyjadřuje korelační koeficient r , který je při lineární odezvě blízký 1.

Rozsah (range)

Rozsah se odvozuje z linearity. Je to koncentrační rozmezí, při kterém může být metoda používána za předpokladu přesnosti, správnosti a linearity.

Robustnost (robustness)

Robustnost vyjadřuje míru kolísání jednotlivých parametrů analýzy na výsledek hodnocení. Zjišťujeme schopnost poskytovat spolehlivé výsledky i při nechtěných změnách analytických podmínek. U plynové chromatografie testujeme například vliv změny teploty kolony, nebo změny rychlosti průtoku mobilní fáze na výsledky hodnocení.

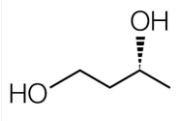
Test způsobilosti (systém suitability test)

Test způsobilosti analytického systému je důležitou součástí validace analytických metod. U instrumentálních metod (především separačních) není prakticky možné definovat všechny podmínky, za kterých použitá metoda bude poskytovat spolehlivé výsledky. Proto při každém novém použití té které metody se neopakuje celá validace, ale jsou definována určitá kritéria, která musí být splněna. Dříve provedená validace však stále platí. To se nazývá test způsobilosti analytického systému.^{5,12}

2.4 Butan-1,3-diol a jeho vlastnosti

2.4.1 Základní charakteristika, použití a rizika pro člověka

Základní charakteristika butan-1,3-diolu je shrnuta v tabulce č. 2.

Vlastnosti	bezbarvá, viskózní, hygroskopická kapalina, bez zápachu
Synonyma názvu	1,3-Butylenglykol, 1,3-Dihydroxybutan, Methyltrimethylenglykol
Sumární vzorec	C ₄ H ₁₀ O ₂
Strukturní vzorec	
Molekulová hmotnost M_r [g/mol]	90,123
Rozpustnost	mísitelný s vodou, acetonem a etherem, rozpustný v netuhnoucích směsích, ethanolu a etheru
Hustota ρ^{20} [g/cm ³]	1,0053
Teplota tuhnutí t_t [°C]	-50
Teplota varu t_v [°C]	207,5
Index lomu n_D^{20}	1,4410

Tab. č. 2: Základní charakteristika butan-1,3-diolu

Používá se jako rozpouštědlo a nosič aromatických látek (např. v tabáku), prostředek k udržování vlhkosti v cigaretách, doutnících a umělých obalových materiálech. Je používán v kosmetických přípravcích, má hydratační účinek v krémech. Dále se používá jako extrakční prostředek pro výrobu extraktů z rostlinných částí, k výrobě umělých hmot a třaskavin, přidává se jako nemrzoucí směs do chladičů. Vyskytuje se v pesticidech. Pro své antimikrobiální účinky je přidáván do čistících prostředků. Prodlužuje účinnost injekčních přípravků a zvyšuje účinnost rozpuštěných účinných látek.

Na rozdíl od ethylenglykolu nepůsobí butan-1,3-diol hepatotoxicky ani nefrotoxicky. Studie s 50% roztokem butan-1,3-diolu ukázala, že ani po delším užívání nepůsobí dráždivě a nevyvolává žádnou kožní reakci. Bylo potvrzeno, že v koncentracích používaných v kosmetických přípravcích je bezpečný. Jako bezpečná hladina butan-1,3-diolu v krvi je uváděna 1500 mg/kg tělesné hmotnosti. Dle mnoha studií na lidech bylo prokázáno, že butan-1,3-diol snižuje hladinu glukózy v krvi. Dále bylo zjištěno, že tělo z něj dokáže využít energii (byl podáván jako substituce škrobu).^{13,14,15,16,17,18,19,20,32}

2.4.2 Stanovení butan-1,3-diolu

Metody stanovení a materiály, ze kterých byl butan-1,3-diol získáván jsou shrnuty v tabulce č. 3.

látka	materiál	metoda	derivatizace	derivatizační činidlo	odkaz*
butan-1,3-diol	roztok acetaldehydu	elektrolytická redukce	N	-	21
alkoholy	vinný a jablečný ocet	GC-MS	A/N	phenyl-acetyl chlorid	22
vonné látky	zrající tvrdý sýr	SPME-GC/MS	N	-	23
dioly	krevní sérum/moč	GC	N	-	24
butan-1,3-diol	plná krev/sérum	GC/HPLC	N	-	25
dioly	roztok diolů	HPLC/MS	A	benzoylchlorid	26
ethylenglykol	hovězí sérum	SPME/HPLC	A	benzoylchlorid	27
ethylenglykol	krevní sérum	GC/MS	A	perfluoroktanoyl chlorid	28
dioly	komplexy s kyselinou boritou	MS	N	-	29
dioly a jejich příslušné hydroxykyseliny	psí plazma	GC/MS	A	TBDMS**	30
butan-1,3-diol	roztok	acido-bazická titrace	N	-	20
organické sloučeniny	rostlinné extrakty	GC/MS	N	-	31

Tab. č. 3: Materiály a metody stanovení butan-1,3-diolu z diolů a jiných organických sloučenin

* odkaz na použitou literaturu

** terc-butyldimethylsilyl ether

3. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo provést validaci metody pro stanovení obsahu butan-1,3-diolu v substanci pomocí plynové chromatografie.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použitý materiál

Chemikálie

- Butan-1,3-diol, Celanese Ltd, Texas, USA, obsah 99,83% (GC)
- Propylenglykol, Kulich, Hradec Králové, Česká Republika
- Methanol, Merck, Darmstadt, Německo

Přístroje

- Analytické váhy, AND, Japonsko
- Plynový chromatograf Shimadzu GC-2010, Japonsko
- Autosampler AOC-5000, Shimadzu, Japonsko
- PC s chromatografickým softwarem GC solution Ver. 2.30.00SU7, Shimadzu, Japonsko

Chromatografický materiál

- Chromatografická kolona Supelcowax TM-10, Fused silica capillary column, 30 m × 0,53 mm × 0,5 μm, Sigma-Aldrich, Česká Republika

Pomůcky

- Laboratorní sklo
- Mikrostříkačky Hamilton, Švýcarsko

4.2 Validace chromatografické metody

4.2.1 Příprava a nástřik vzorků

Nejprve byl připraven zásobní roztok vnitřního standardu. Do odměrné baňky o objemu 250 ml bylo naváženo přibližně 4,5 g propylenglykolu a zbytek objemu doplněn methanolem. Do 100 ml odměrných baněk bylo naváženo přibližně 150 mg butan-1,3-diolu. Pak bylo do každé baňky přidáno 10 ml připraveného vnitřního standardu, doplněno methanolem po rysku a promíseno. Takto připravený vzorek byl analyzován.

Selektivita

Selektivita byla zjišťována u všech tří složek vzorku, methanolu, vnitřního standardu a butan-1,3-diolu. Vzorek samotného butan-1,3-diolu byl připraven stejným způsobem bez přidání vnitřního standardu (viz 4.2.1). Pro získání vzorku vnitřního standardu bylo do odměrné baňky o objemu 100 ml napipetováno 10 ml předem připraveného vnitřního standardu (viz 4.2.1), doplněno po rysku methanolem a promícháno.

Linearita

K měření linearity byly připraveny vzorky o koncentracích 80 až 120 % odstupňované po deseti procentech. Od každé koncentrace byly vytvořeny dva vzorky. Množství butan-1,3-diolu bylo naváženo dle tabulky (tab. č. 4). Přesné navážky jsou uvedeny v tab. č. 5.

Koncentrace [%]	80	90	100	110	120
Navážka butan-1,3-diolu \pm 10 % [mg]	120	135	150	165	180

Tab. č. 4: Množství butan-1,3-diolu odpovídající daným koncentracím

Koncentrace [%]	80	90	100	110	120
Navážka č. 1 [g]	0,1249	0,1356	0,1492	0,1636	0,1821
Navážka č. 2 [g]	0,1214	0,1400	0,1488	0,1647	0,1819

Tab. č. 5: Navážky butan-1,3-diolu k hodnocení linearity

Přesnost a správnost

Byly připraveny vzorky o třech různých koncentracích 80 %, 100 % a 120 %, od každé koncentrace šest vzorků. Navážky butan-1,3-diolu odpovídající jednotlivým koncentracím jsou shodné s tabulkou č. 4. Přesné navážky jsou uvedeny v tab. č. 6.

Koncentrace [%]	80	100	120
Navážka č. 1 [g]	0,1180	0,1507	0,1782
Navážka č. 2 [g]	0,1208	0,1521	0,1829
Navážka č. 3 [g]	0,1206	0,1497	0,1837
Navážka č. 4 [g]	0,1196	0,1506	0,1824
Navážka č. 5 [g]	0,1184	0,1533	0,1833
Navážka č. 6 [g]	0,1193	0,1513	0,1801

Tab. č. 6: Navážky butan-1,3-diolu k hodnocení přesnosti a správnosti

Mezilehlá přesnost

Oběma pracovníky bylo připraveno šest vzorků, které byly třikrát nastříknuty na kolonu. Výsledky analýzy byly zpracovány t-testem. Do t-testu byly dosazeny hodnoty z následujícího výpočtu. Ze třech nástřiků vzorku byla vypočtena průměrná hodnota poměrů ploch butan-1,3-diolu a vnitřního standardu a vydělena příslušnou navážkou.

Robustnost

Vzorky byly připraveny opět stejným způsobem. Měnily se pouze podmínky měření, průtok nosného plynu, počáteční teplota, konečná teplota a průběh gradientu.

4.3 Stanovení obsahu butan-1,3-diolu

Pro stanovení obsahu butan-1,3-diolu byla zvolena metoda vnitřního standardu. Byly proměřeny čtyři vzorky, od každého dvě navážky. Každý vzorek byl na kolonu nastříknut třikrát. Z vyhodnocených ploch píků vnitřního standardu a butan-1,3-diolu byly vypočteny poměry ploch těchto látek. Průměrné hodnoty poměrů ploch ze třech nástřiků pak byly použity ve vzorci pro výpočet koncentrace složky (v našem případě butan-1,3-diolu) ve vzorku (viz 2.2.3.2).

$$\% = \frac{A_{vz}}{A_{IS} \cdot n_{vz}} \cdot \frac{A_{vz} \cdot n_{IS}}{A_{IS}} \cdot k$$

kde

- A_{vz} plocha píku butan-1,3-diolu
- A_{IS} plocha píku propylenglykolu (IS)
- n_{vz} navážka butan-1,3-diolu v gramech
- n_{IS} navážka propylenglykolu (IS)
- k obsah butan-1,3-diolu ve standardu (99,83%)

4.3.1 Chromatografické podmínky analýzy, příprava a nástřik vzorků

Chromatografické podmínky analýzy

Pro stanovení obsahu butan-1,3-diolu byly stanoveny tyto chromatografické podmínky:

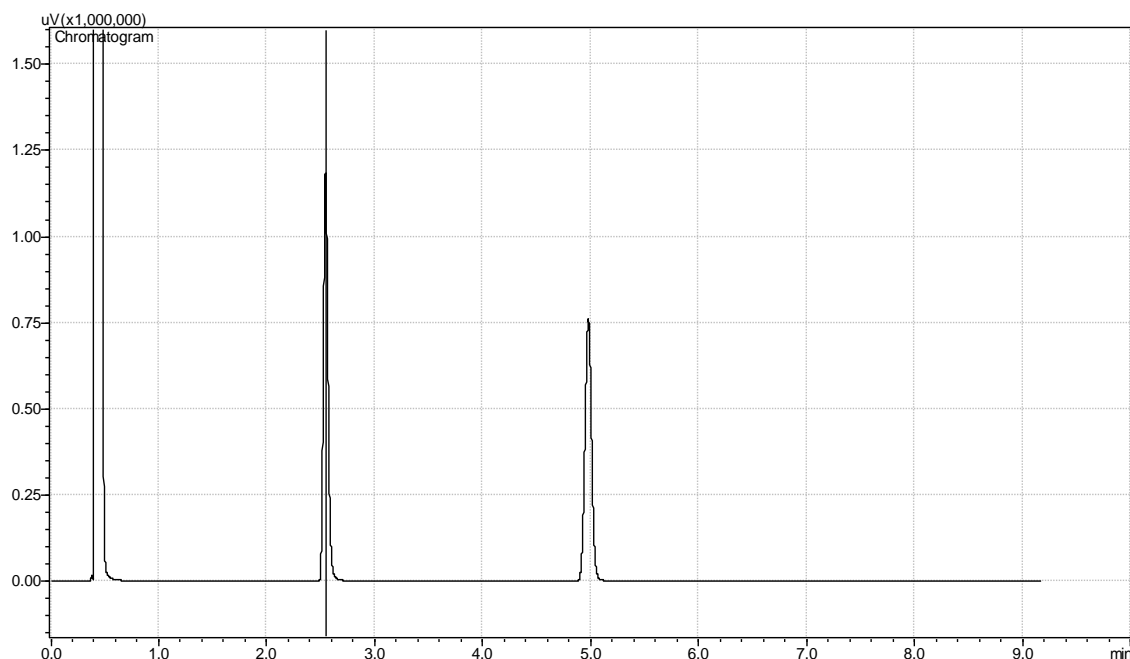
- Teplotní program: viz tab. č. 7

	0	1
Rychlost stoupaní teploty [°C/min]	–	15
Teplota [°C]	110	150
Čas [min]	4,50	2,00
Celkový čas analýzy [min]	9:17	

Tab. č. 7: Nastavení teplotního programu analýzy

- Velikost nástřiku: 1 μ l
- Celkový průtok kolonou: 19,40 ml/min.

- Lineární rychlost: 150,2 cm/s
- Split: 3,0
- Nosný plyn: H₂
- Detektor: FID
- Teplota detektoru: 300 °C



Obr. č. 5: Chromatogram za standardních podmínek

Příprava a nástřik vzorků

Vzorky byly připravovány stejným postupem jako při validaci chromatografické metody (viz 4.2.1).

Nejdříve byla kolona promyta methanolem. Dále byly nástřikovány série vzorků vždy po třech nástřících. Mezi každou sérií se systém promyl methanolem. Vzorky byly celkem čtyři. Pro každý vzorek byly připraveny dvě navážky (tab. č. 8).

	St 1	St 2	Vz 1	Vz 2	Vz 3	Vz 4
Navážka č. 1 [g]	0,1499	0,1520	0,1548	0,1553	0,1531	0,1494
Navážka č. 2 [g]	–	–	0,1497	0,1493	0,1486	0,1536

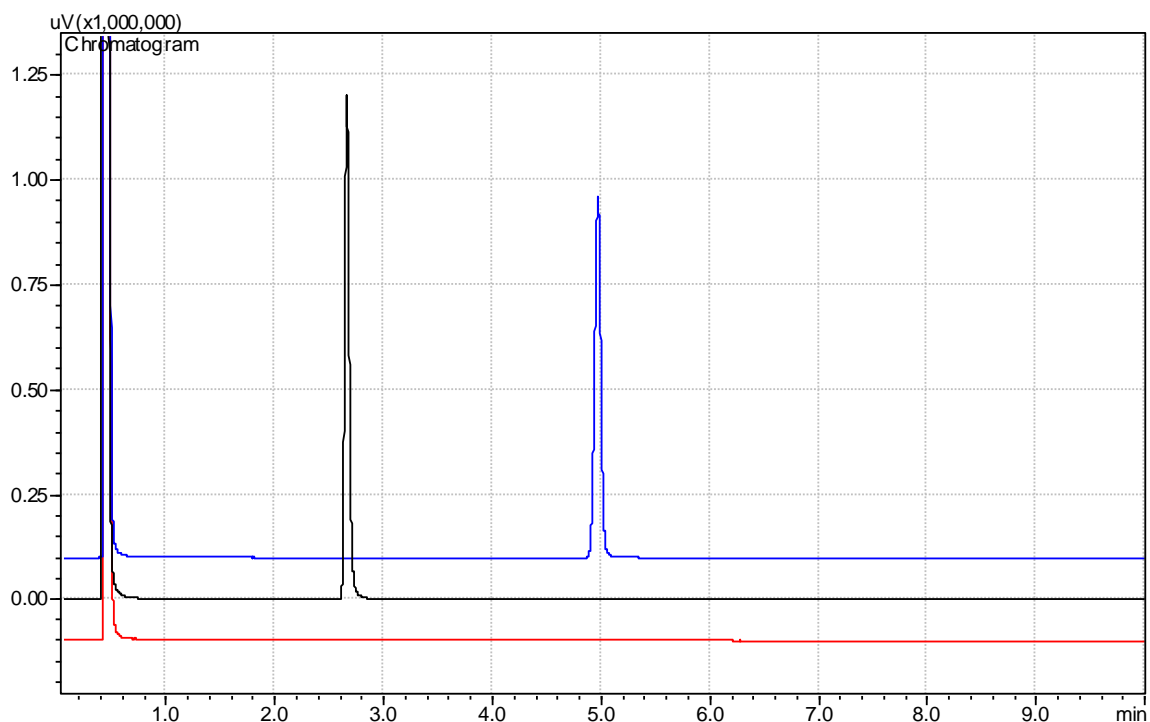
Tab. č. 8: Navážky butan-1,3-diolu ke stanovení obsahu

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Validace chromatografické metody

5.1.1 Selektivita

Byla provedena analýza všech tří složek vzorku samostatně (methanolu, propylenglykolu a butan-1,3-diolu), (obr. č. 6).



Obr. č. 6: Chromatogram jednotlivých složek vzorku

Červený chromatogram *Methanol*

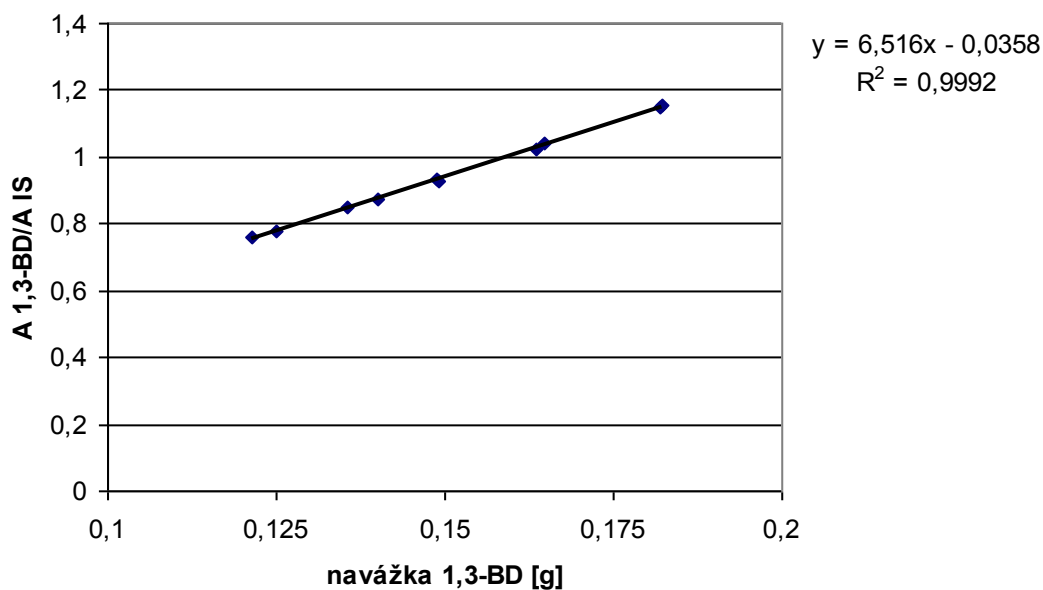
Černý chromatogram *Propylenglykol (IS)*

Modrý chromatogram *Butan-1,3-diol*

Z obrázku je patrné, že každá z analyzovaných složek se eluuje v jiném čase. Vzájemně se neovlivňují a každá látka může být přesně a správně identifikována.

5.1.2 Linearita

Bylo měřeno pět různých koncentrací vzorků v rozmezí 80 až 120 %, od každé dva vzorky. Závislost průměrné hodnoty poměru ploch butan-1,3-diolu a vnitřního standardu ze třech nástřiků na navážce butan-1,3-diolu ukazuje obr. č. 7.

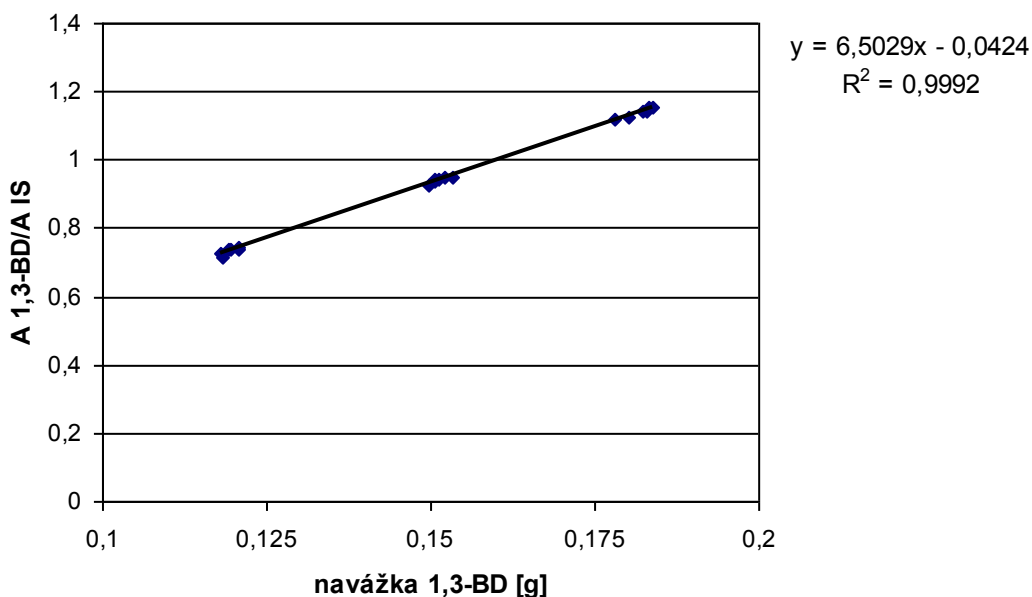


Obr. č. 7: Závislost plochy piků na koncentraci butan-1,3-diolu při měření linearitě

Z grafu i z matematického vyjádření křivky vyplývá, že vztah mezi koncentrací analytu a odezvou detektoru je lineární.

5.1.3 Správnost

Byly proměřeny tři různé koncentrace vzorků, 80 %, 100 % a 120 %. Analýzou prošlo šest vzorků od každé koncentrace. Závislost průměrné hodnoty poměru ploch butan-1,3-diolu a vnitřního standardu ze třech nástřiků na navážce butan-1,3-diolu ukazuje obr. č. 8.



Obr. č. 8: Závislost plochy píků na koncentraci butan-1,3-diolu při měření přesnosti a správnosti

koncentrace	správnost	SD	RSD
80 %	98,97	0,0016	0,2146
100 %	99,16	0,0014	0,1528
120 %	99,25	0,0035	0,3116

Tab. č. 9: Výsledky správnosti pro každou koncentraci (vztaženo na průměr hodnot ze šesti vzorků)

Po dosažení poměru ploch 1,3-BD/IS do rovnice lineární regrese (viz kapitola 5.1.2) byl vypočten obsah 1,3-BD ve vzorku. Pro hodnocení správnosti byly vypočtené hodnoty poděleny příslušnými navážkami butan-1,3-diolu a vynásobeny 100 % (viz tab. č. 9). Průměrná hodnota všech měření byla 99,13 %.

5.1.4 Mezilehlá přesnost

Výsledky stanovení obou pracovníků (průměrné hodnoty poměrů ploch butan-1,3-diolu a vnitřního standardu z každého měření vydělené každou jednotlivou navážkou) byly dosazeny do t-testu a vyhodnoceny. Byla zjištěna shoda výsledků měření mezi oběma pracovníky se spolehlivostí 0,95 a tím prokázána mezilehlá přesnost validace (tab. č. 10).

zvolená spolehlivost:	0,95
-----------------------	-------------

	Soubor α	Soubor β
číslo souboru	2	1
název souboru		
rozsah	6	5
průměr	6,223	6,200
směr.odch.	0,030	0,052
s.o.průměru	0,012	0,023
a	6,192	6,135
b	6,255	6,264
c	6,199	6,150
d	6,248	6,249

rozdíl průměrů		0,023
$A < \Delta\mu < B$	A	-0,033
	B	0,080
$C < \Delta\mu$	C	-0,022
$\Delta\mu < D$	D	0,069

Hypotéza "střední hodnota $\mu (\alpha)$ se nerovná střední hodnotě $\mu (\beta)$ "	prokázána	nebyla.
Hypotéza "střední hodnota $\mu (\alpha)$ je větší než střední hodnota $\mu (\beta)$ "	prokázána	nebyla.

F-test: neshoda rozptylů se spolehlivostí 0,95	prokázána	nebyla.
--	-----------	---------

Tab. č. 10 : Výsledky T-testu

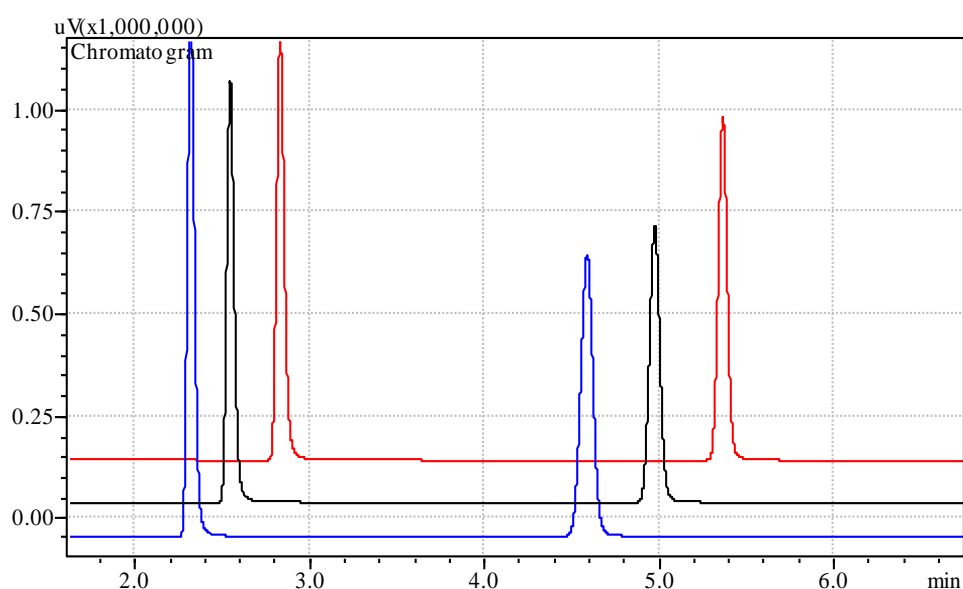
*Průměrná hodnota souboru μ musí splňovat tyto podmínky: $a < \mu > b$, $\mu > c$, $\mu < d$
Hodnota rozdílu průměrů $\Delta\mu$ musí procházet přes hodnotu 0*

5.1.5 Robustnost

Byl testován vliv malých změn chromatografických podmínek na retenční chování butan-1,3-diolu a vnitřního standardu – propylenglykolu. Byly měněny tyto chromatografické podmínky: průtok, počáteční teplota, konečná teplota a strmost gradientu.

Změna průtoku

Bylo provedeno měření se třemi různými nastaveními průtoku nosného plynu. Výsledky ukazuje obr. č. 9.



Obr. č. 9: Změna průtoku nosného plynu

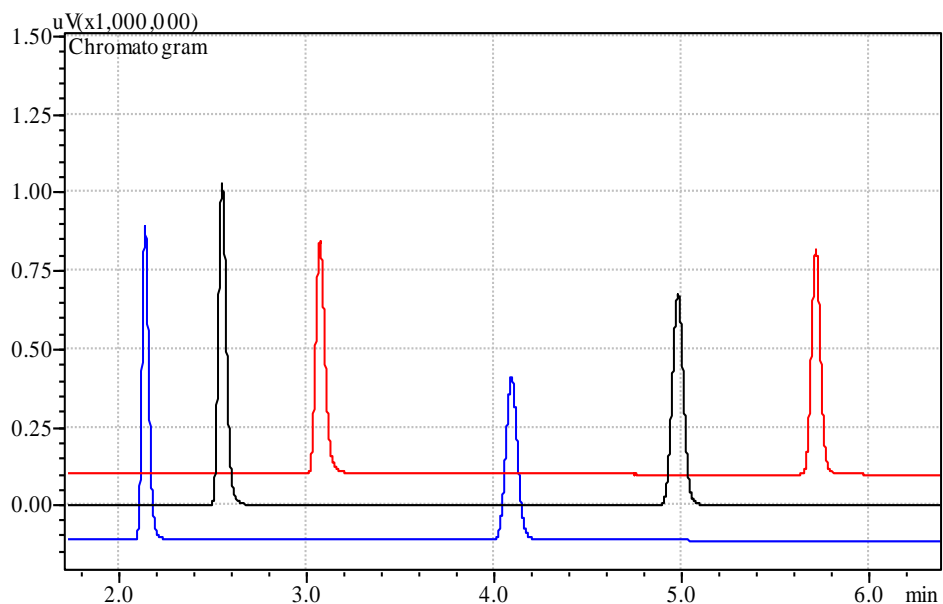
Modrý chromatogram nastavena hodnota průtoku 135 ml/min

Černý chromatogram nastavena hodnota průtoku 150 ml/min

Červený chromatogram nastavena hodnota průtoku 165 ml/min

Změna počáteční teploty gradientového programu

Počáteční teplota byla měněna o 5 °C. Nejprve byly měřeny vzorky s počáteční teplotou 105 °C, poté se 110 °C a nakonec se 115 °C. Výsledky jsou znázorněny v obr. č. 10.



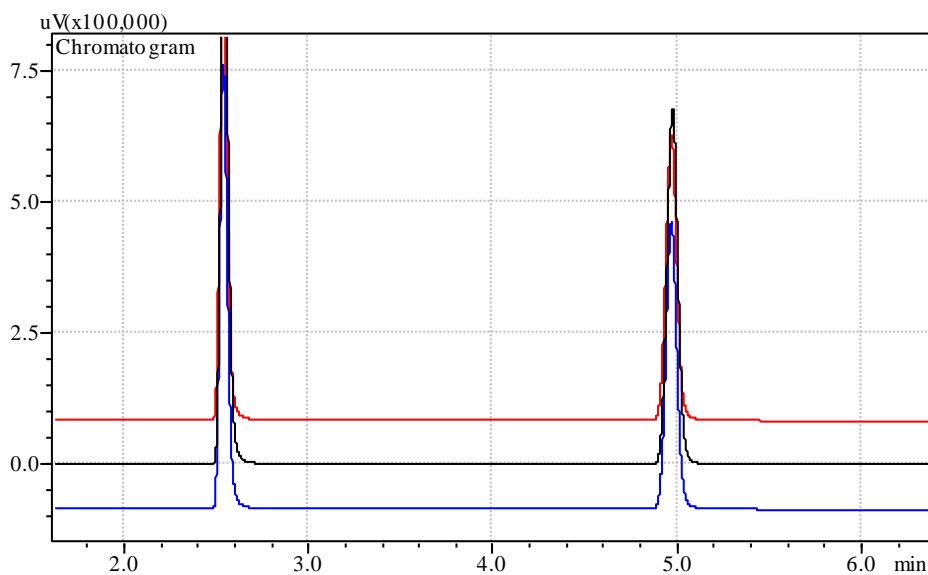
Obr. č. 10: Změna nastavení počáteční teploty

Modrý chromatogram nastavena počáteční teplota na 105 °C

Černý chromatogram nastavena počáteční teplota na 110 °C

Červený chromatogram nastavena počáteční teplota na 115 °C

Změna konečné teploty gradientového programu



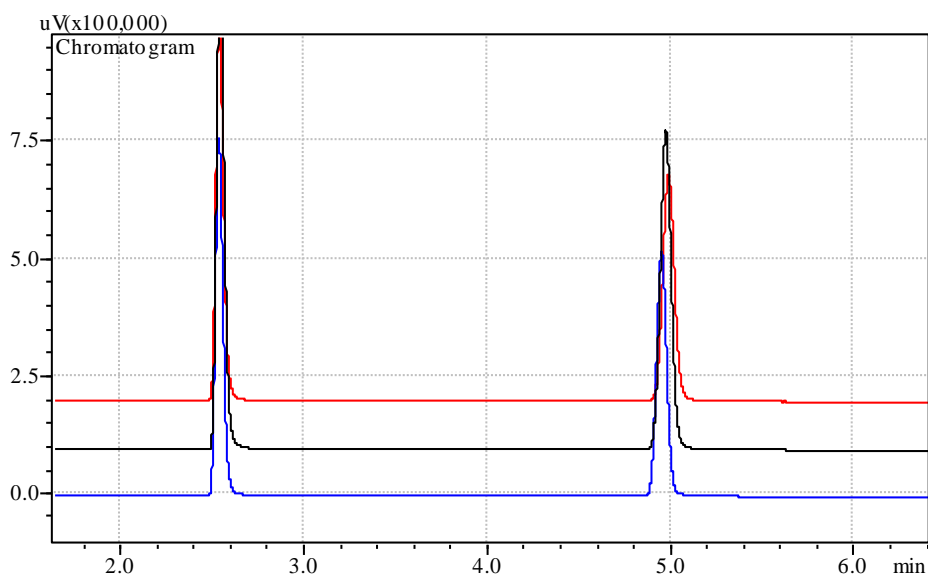
Obr. č. 11: Změna nastavení konečné teploty

Modrý chromatogram nastavena konečná teplota na 145 °C

Černý chromatogram nastavena konečná teplota na 150 °C

Červený chromatogram nastavena konečná teplota na 155 °C

Změna strmosti gradientu



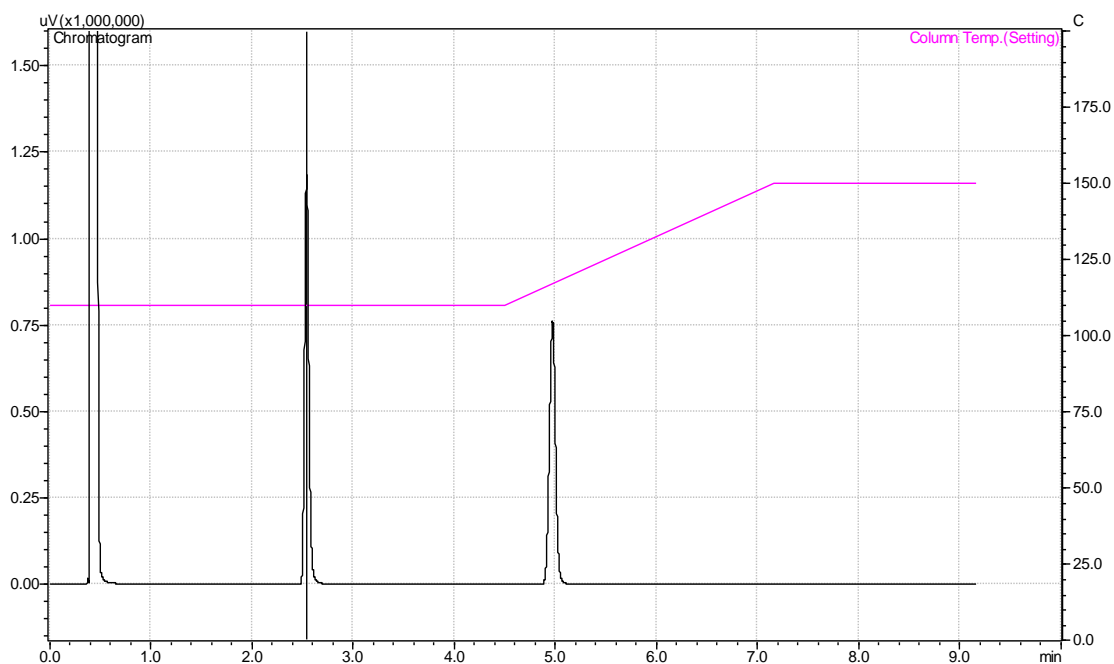
Obr. č. 12: Změna nastavení gradientu

Modrý chromatogram nastaven gradient 10 °C/min

Černý chromatogram nastaven gradient 15 °C/min

Červený chromatogram nastaven gradient 20 °C/min

Z chromatogramů je patrné, že retenční chování ovlivnily nejvíce změny počáteční teploty a průtoku. Naopak změna konečné teploty a strmosti gradientu retenční chování téměř neovlivnila. Na chromatogramu za standardních podmínek je vidět, že změny chromatografických podmínek se projeví až přibližně v polovině analýzy, kdežto látky se eluují již na začátku analýzy (obr. č. 13). Proto retenční chování látek ovlivní pouze ty změny, které se projeví již na počátku analýzy (počáteční teplota a průtok). V celkovém pohledu na analýzu byly však i tyto změny zanedbatelné.



Obr. č. 13: Chromatogram analýzy za standardních podmínek

Růžová křivka označuje, v jaké fázi analýzy se projeví změny chromatografických podmínek.

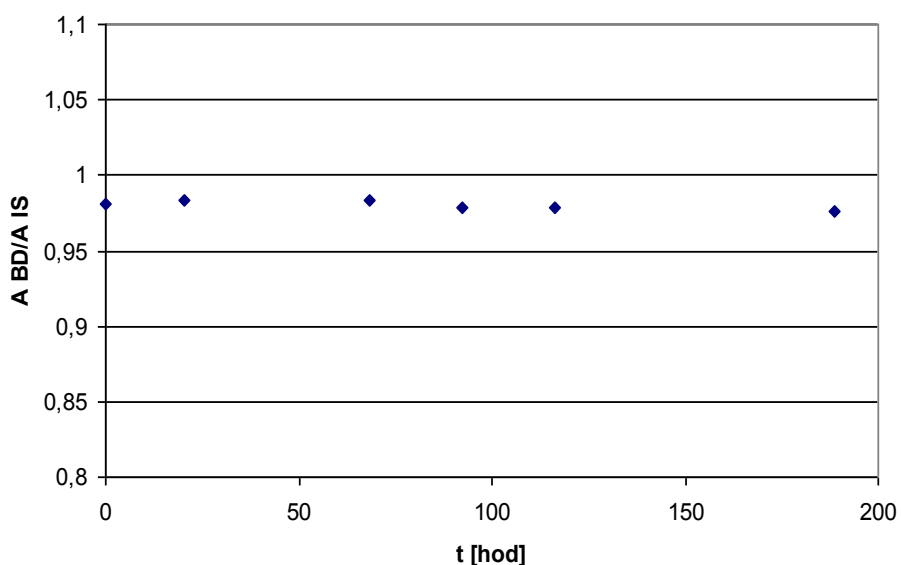
Ověřování stability vzorku

V rámci robustnosti bylo provedeno ověřování stability vzorku. Znamená to, že vzorek je po danou dobu stabilní, zachovává si své vlastnosti a může být tedy v analýze používán po delší dobu bez ztráty validity výsledků.

Vzorek byl proměřen šestkrát v určitých časových odstupech (tab. č. 11, obr. č. 14).

t [hod]	0	20,5	68,5	92,5	116,5	188,5
A BD/A IS	0,981267	0,983744	0,983744	0,977942	0,978856	0,976096

Tab. č. 11: Výsledky stability v určitých časech



Obr. č. 14: Stabilita vzorku

Z obrázku je patrné, že vzorek byl stabilní ještě za 188,5 hodiny po přípravě. Mohl být tedy využíván k analýze i celý týden, aniž by byla ohrožena správnost výsledků.

5.2 Vyhodnocení obsahu butan-1,3-diolu

K vyhodnocení obsahu butan-1,3-diolu byla použita metoda vnitřního standardu. Pomocí GC byly zjištěny plochy píků butan-1,3-diolu a vnitřního standardu a vypočteny poměry těchto ploch. Průměrné hodnoty poměrů ploch ze tří nástřiků byly použity na výpočet koncentrace butan-1,3-diolu ve vzorku.

	SD	RSD	obsah St	
St 1	0,0037	0,3882	6,3641	
St 2	0,0031	0,3188	Obsah 1,3 BD	obsah 1,3 BD
Vz1_1	0,0018	0,1822	99,35	99,40
Vz1_2	0,0034	0,3592	99,45	
Vz2_1	0,0010	0,1038	99,76	99,77
Vz2_2	0,0011	0,1129	99,79	
Vz3_1	0,0013	0,1356	99,87	99,78
Vz3_2	0,0012	0,1433	99,70	
Vz4_1	0,0002	0,0229	99,54	100,03
Vz4_2	0,0024	0,2454	100,52	

Tab. č. 12: Výsledky stanovení obsahu butan-1,3-diolu (vztaženo na průměr hodnot ze tří nástřiků)

Výsledky obsahu butan-1,3-diolu ze čtyř vzorků se pohybují mezi hodnotami 99,40 až 100,03 % (tab. č. 12). Podle Food chemical codex je požadavek na obsah butan-1,3-diolu minimálně 99,0 %, tzn. že námi zjištěný obsah odpovídá požadavkům.

6. ZÁVĚR

V této diplomové práci byla validována metoda pro stanovení obsahu butan-1,3-diolu pomocí plynové chromatografie. Práce byla provedena na plynovém chromatografu Shimadzu GC-2010. Jako nosný plyn byl použit vodík. Stacionární fázi tvořila chromatografická kolona Supelcowax TM-10, Fused silica capillary column, 30 m × 0,53 mm × 0,5 μm. Průtoková rychlost nosného plynu byla 19,40 ml/min. Velikost nástřiku byla 1 μl. Split 1:3. K detekci stanovovaných látek byl použit plamenoionizační detektor. Teplota detektoru byla 300 °C, palivem byl vodík + syntetický vzduch a jako make-up dusík. Doba trvání GC analýzy byla 9 minut a 17 vteřin.

Pro stanovení obsahu butan-1,3-diolu ve vzorku byla použita metoda vnitřního standardu. Vnitřním standardem byl propylenglykol. Jako rozpouštědlo sloužil methanol. Výsledky stanovení obsahu ze čtyř různých vzorků se pohybují mezi 99,40 až 100,03 %, což odpovídá požadavkům dle Food Chemical Codex, který stanovuje minimální obsah butan-1,3-diolu 99,0 %.

Zvolená chromatografická metoda byla validována ověřením selektivity, správnosti, linearity, mezilehlé přesnosti a robustnosti. V rámci robustnosti byly měněny chromatografické podmínky a to počáteční a konečná teplota, rychlost průtoku a strmost gradientu a byla ověřena stabilita vzorku.

7. ABSTRAKT

ABSTRAKT

Diplomová práce

Využití plynové chromatografie v kontrole léčiv III.

Barbora Šináklová

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Plynová chromatografie je citlivá analytická metoda. Pro metodu GC je charakteristická především účinná a rychlá separace složitých směsí a práce s malými množstvími vzorku za použití relativně jednoduché aparatury.

Butan-1,3-diol je látka, která se používá v chemickém průmyslu jako rozpouštědlo a nosič aromatických látek, k výrobě umělých hmot a třaskavin. Přidává se do nemrznoucích směsí v chladičích. Dále se používá v kosmetických přípravcích a vyskytuje se v pesticidech. Pro své antimikrobiální účinky je přidáván do čistících prostředků. Prodlužuje účinnost injekčních přípravků a zvyšuje účinnost rozpuštěných účinných látek. V diplomové práci byla tato metoda využita ke stanovení obsahu butan-1,3-diolu a metoda byla validována.

Práce byla provedena na plynovém chromatografu Shimadzu GC-2010 s plamenoionizačním detektorem. Jako nosný plyn byl zvolen vodík. Byla použita chromatografická kolona Supelcowax TM-10, Fused silica capillary column, 30 m × 0,53 mm × 0,5 μm. Pro stanovení obsahu byla využita metoda vnitřního standardu. Byl zvolen propylenglykol pro své podobné retenční vlastnosti a charakteristiku látky jakou má butan-1,3-diol. Validace proběhla ověřením selektivity, správnosti, linearity, mezilehlé přesnosti a robustnosti. V rámci robustnosti byly měněny chromatografické podmínky (počáteční a konečná teplota, rychlost průtoku a strmost gradientu) a byla ověřena stabilita vzorku.

8. ABSTRACT

ABSTRACT

Diploma thesis

Employment of gas chromatography in the field of drug analysis III.

Barbora Šináklová

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,
Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

The gas chromatography represents a sensitive analytic method. Effective and fast separation of complicated compounds and manipulation with small amounts of samples using a relatively simple equipment characterise the GC method in particular.

Butan-1,3-diol is a substance used in chemical industry as a solvent and a carrier of aromatic substances, or for plastics and explosives production. It is added to antifreeze mixtures in radiators. Another usage possibility constitute cosmetic products, the substance also occurs in pesticides. Because of its antimicrobial effects, butan-1,3-diol is added to cleansing articles. It extends the effect of certain syringe articles and increases the effect of dissolved effective substances. This method was used in this diploma thesis to determine the volume of butan-1,3-diol and the method was validated.

The work was realized with gas chromatograph Shimadzu GC-2010 with flame-ionization detector. Hydrogen was chosen as the carrier gas. Supelcowax TM-10, Fused silica capillary column, 30 m × 0,53 mm × 0,5 μm was used. The inner standard method was used for volume determination of butan-1,3-diol. Propylenglycol was chosen as an inner standard for its similar retentive properties and substance characteristics as butan-1,3-diol. Validation was accomplished by checking specificity, accuracy, linearity, intermediate precision and robustness. In terms of robustness, chromatographic conditions were changed (e.g. the initial and final temperatures, the rate of flow and the rate of gradient rise) and the sample stability was verified.

9. LITERATURA

Seznam použité literatury:

- 1) Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta [online] [cit. 2009-3-30]
Dostupné z:
<http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc>
- 2) Biologická fakulta Jihočeské Univerzity [online] [cit. 2009-3-30] Dostupné z:
<http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separb.htm>
- 3) KLOUDA, P., Moderní analytické metody, Ostrava : Pavel Klouda, 1996
- 4) Klimeš, J a kol.:Kontrola léčiv I, Praha, Karolinum 2002
- 5) Klimeš, J a kol.:Kontrola léčiv II, Praha, Karolinum 2004
- 6) Český lékopis 2005, Grada Publishing, Praha 2005
- 7) Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav konzervace potravin a technologie masa [online] [cit.2009-1-13] Dostupné z:
<http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/navody/oborI/GC.pdf>
- 8) Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta [online] [cit. 2009-1-13]
Dostupné z: <http://www.natur.cuni.cz/~sevcik/plyn_chrom.pdf >
- 9) Masarykova univerzita Brno, Přírodovědecká fakulta [online] [cit. 2009-1-13]
Dostupné z: <<http://www.chemi.muni.cz/~literak/uvod.pdf> >
- 10) Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta [online] [cit. 2009-1-13]
Dostupné z: <<http://natur.cuni.cz/~pcoufal/gc.html>>
- 11) Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta [online] [cit. 2009-1-13]
Dostupné z: <<http://www.natur.cuni.cz/~analchem/pprakt/gc.pdf>>
- 12) The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [online] [cit. 2009-2-16]
Dostupné z: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>
- 13) Jiří Vohlídal, Alois Julák, Karel Štulík, Chemické a analytické tabulky, Grada Publishing, spol. s. r. o., Praha 1999
- 14) Wacker, Creating tomorrow's solutions [online] [cit. 2009-3-21] Dostupné z:
<<http://www.wacker.com/cms/en/products-markets/products/product.jsp?product=9428>>
- 15) Herbert P. Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete 4, 1996, Editio Cantor Verlag Aulendorf
- 16) Scorecard, The pollution information site [online] [cit. 2009-3-21] Dostupné z: <http://www.scorecard.org/chemical-profiles/summary.tcl?edf_substance_id=107-88-0#use_profile>

- 17) FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations [online] [cit. 2009-3-21] Dostupné z: <<http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-066.pdf>>
- 18) Vyhláška Ministerstva zemědělství 325/1997 [online] [cit. 2009-3-21] Dostupné z: <http://www.guard7.cz/LEGISLATIVA/325_97.htm>
- 19) RNDr. František Kratochvíl, Im-Bio-Pharm Consult [online] [cit. 2009-3-21] Dostupné z: <<http://www.epitesty.cz/default.asp?inc=inci&filtr=B>>
- 20) Institute Of Medicine of the National Academies, Food chemical codex 5, 2004, The national academies press, 500 Fifth Street, N. W., Washington, DC 20001
- 21) Kyriakides L. P., Some Organic Preparations, J. Am. Chem. Soc. 36 (1914) 530-537
- 22) Giumanini A. G., Verando G., Martina D. D., Toniutti N., Improved Method for the Analysis of Organic Acids and New Derivatization of Alcohols in Complex Natural Aqueous Matrixes: Application to Wine and Apple Vinegar, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 2875-2882.
- 23) Katechaki E., Panas P., Rapti K., Kandilogiannakis L., Koutinas A. A., Production of Hard-Type Cheese Using Free or Immobilized Freeze-Dried Kefir Cells as a Starter Culture, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 5316-5323
- 24) Houzé P., Chaussard J., Harry P., Pays M., Simultaneous determination of ethylene glycol, propylene glycol, 1,3-butylene glycol and 2,3-butylene glycol in human serum and urine by wide-bore column gas chromatography, J. Chromatogr. 619 (1993) 251-257
- 25) Moffatt E. J., Hagardorn A. N., Ferslew K. E., A gas-liquid chromatographic method for quantitation of 1,3-butylene glycol in whole blood or plasma and the separation of the short chain glycols, J. Anal. Toxicol. 10 (1986) 35-37
- 26) Holčápek M., Virelizier H., Chamot-Rooke J., Jandera P., Moulin C., Trace Determination of Glycols by HPLC with UV and Electrospray Ionization Mass Spectrometric Detections, Anal. Chem. 71 (1999) 2288-2293
- 27) Vollmer P. A., Harty D. C., Erickson N. B., Balhon A. C., Dean R. A., Serum ethylene glycol by high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. B 685 (1996) 370-374

- 28) Amitava D., Blackwell W., Griego J., Sohail M., Gas chromatographic-mass spectrometric identification and quantitation of ethylene glycol in serum after derivatization with perfluorooctanoyl chloride: a novel derivative, *J. Chromatogr. B* 666 (1995) 63-70
- 29) Ackloo S. Z., Burgers P. C., McCarry B. E., Terlouw J. K., Structural Analysis of Diols by Electrospray Mass Spectrometry on Boric Acid Complexes, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 2406-2415
- 30) Powers L., Ciruolo S. T., Agarwal K. C., Kumar A., Bomont C., Soloviev M. V., David F., Desrochers S., Brunengraber H., Assay of the Enantiomers of 1,2-Propanediol, 1,3-Butanediol, 1,3-Pentanediol, and the Corresponding Hydroxyacids by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Analytical Biochemistry* 221 (1994) 323-328
- 31) Iordache A., Culea M., Gherman C., Cozar O., Characterization of some plant extracts by GC-MS, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B. Beam Interact. Mater. Atoms.* 267 (2009) 338-342
- 32) IPCS, International Programme on Chemical Safety, Inchem [online] [cit. 2009-4-4] Dostupné z:
<<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v14je03.htm>>