

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY

GC analýza léčiv s využitím iontové kapaliny jako stacionární fáze I

Diplomová práce

Karolína Bářová

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 14.5.2018

Podpis: _____

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D., a doc. PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D., za jejich odbornou pomoc a vedení, cenné připomínky, trpělivost, čas a podporu při zpracovávání mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala všem, kdo se mi snažili pomoci s řešením problémů, které se vyskytly v průběhu této práce.

Tato diplomová práce vznikala v letech 2017 a 2018 za podpory grantu SVV 260 401.

OBSAH

1	ÚVOD	- 11 -
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	- 13 -
2.1	Chromatografie a princip chromatografického dělení.....	- 14 -
2.2	Plynová chromatografie.....	- 14 -
2.2.1	Plynový chromatograf.....	- 15 -
2.2.2	Nosný plyn	- 15 -
2.2.3	Regulátory tlaku a průtoku	- 16 -
2.2.4	Injektor	- 16 -
2.2.5	Kolony.....	- 16 -
2.2.6	Stacionární fáze	- 17 -
2.2.7	Teplotní program.....	- 17 -
2.2.8	Detektor.....	- 18 -
2.2.9	Řídící jednotka	- 18 -
2.3	Hmotnostní spektrometrie	- 19 -
2.3.1	Hmotnostní spektrometr	- 19 -
2.3.2	Citlivost vs. skenovací rozsah	- 24 -
2.4	Iontové kapaliny	- 25 -
2.4.1	Vlastnosti iontových kapalin a jejich využití v plynové chromatografii-	26
	-	
2.5	Iontové kapaliny jako stacionární fáze v plynové chromatografii	- 28 -
2.5.1	Srovnání polysiloxanových a polyethylenglykolových kolon a kolon s iontovou kapalinou	- 28 -
2.5.2	Vliv nečistot v iontových kapalinách jako stacionárních fázích	- 30 -
2.5.3	Dvojitý podstata separačního mechanismu	- 30 -
2.5.4	Fenomén teplotního efektu.....	- 30 -
2.5.5	Příklady typů iontových kapalin užívaných jako stacionární fáze.....	- 31 -

2.5.6	Kolony, které byly použity v praktické části této diplomové práce	- 32 -
2.6	Derivatizace.....	- 34 -
2.6.1	Acylace	- 35 -
2.7	Ibuprofen a jeho nečistoty	- 37 -
2.7.1	Ibuprofen.....	- 37 -
2.7.2	nečistota B.....	- 38 -
2.7.3	nečistota E.....	- 38 -
2.7.4	nečistota F	- 39 -
2.7.5	nečistota J.....	- 39 -
3	CÍL PRÁCE	- 41 -
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 43 -
4.1	Chemikálie, přístroje a příslušenství	- 44 -
4.2	Příprava roztoků	- 46 -
4.3	Příprava vzorků	- 47 -
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	- 51 -
5.1	Vytřepávání analytů do nepolární fáze	- 52 -
5.2	Stabilita vzorků	- 56 -
5.3	Linearita	- 58 -
5.4	Obecný popis retenčních mechanismů, které hrají roli při separaci pomocí plynové chromatografie	- 60 -
5.4.1	Tabulka ibuprofenu a jeho čtyř lékopisných nečistot a jejich derivátů -	62 -
5.5	Porovnání kolon pomocí modelového vzorku isobutylchloroformiátových derivátů ibuprofenu a jeho čtyř lékopisných nečistot	- 64 -
5.5.1	Popis retenčních mechanismů.....	- 67 -
5.6	Porovnání kolon pomocí modelového vzorku derivátů 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutylchloroformiátu.....	- 70 -
5.6.1	Popis retenčních mechanismů.....	- 73 -
5.7	Optimalizace metody	- 75 -

6	ZÁVĚR.....	- 81 -
7	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	- 85 -

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

Student: Karolína Bářová

Název diplomové práce:

GC analýza léčiv s využitím iontové kapaliny jako stacionární fáze I

V této práci jsme testovali tři komerčně vyráběné kolony se stacionární fází tvořenou iontovými kapalinami na modelovém vzorku ibuprofenu a jeho čtyř lékopisných nečistot po derivatizaci alkylchloroformiáty a získané výsledky jsme porovnali s výsledky na koloně s konvenční nepolární stacionární fází.

Dále jsme se pokusili popsat a vysvětlit retenční mechanismy, které hrály roli při těchto separacích, optimalizovat metodu pro použití na jednotlivých kolonách a extrahovat deriváty do nepolární fáze s vidinou menší škodlivosti takto upraveného vzorku na kolonu.

Výsledky získané na stacionárních fázích s iontovou kapalinou a na nepolární stacionární fází hodnotíme jako celkem srovnatelné. Všechny námi testované kolony s iontovou kapalinou jako stacionární fází jsou na analýzu našich vzorků použitelné a na všech těchto kolonách se dá metoda optimalizovat. Kromě změny v selektivitě na nejpoleárnější koloně jsme však nezjistili, že by hlediska separace našich analytů přinášely iontové kapaliny jako stacionární fáze velké benefity.

Převedení derivátů ze vzorku do nepolární fáze se nám podařilo jen částečně, nejlepších výsledků jsme dosahovali při přidání 100 μ l vody do polární fáze vytřepávaného vzorku.

Hlavní přínos této práce tedy vidíme prozkoumání chování konkrétních látek na stacionárních fázích tvořených iontovou kapalinou.

Klíčová slova: ibuprofen, nečistoty ibuprofenu, alkylchloroformiáty, iontové kapaliny, plynová chromatografie

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Supervisor: PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

Student: Karolína Bářová

Title of Thesis:

GC analysis of drugs with utilization of ionic liquid as a stationary phase I

In this thesis, we focused on testing of three commercially obtainable columns with ionic liquids as stationary phases, which we tested on a model sample of ibuprofen and its four pharmacopoeial impurities after derivatization by alkylchloroformates. The results obtained on these columns were compared to results obtained on column with conventional nonpolar stationary phase.

Furthermore, we tried to describe and explain retention mechanisms, which were important in these separations, we also tried to optimize methods for our individual columns and extract our derivatives into a nonpolar phase, with the view to diminishing the harmful effect of samples on columns.

We appraise the results obtained on ionic liquid stationary phases and on a nonpolar stationary phase as quite comparable. The analysis of our derived samples can be performed on all tested ionic liquid columns and the analysis can be optimized for all of them. Apart from the change in selectivity on the most polar stationary phase, we did not notice any great benefits of using ionic liquid stationary phases in our separations.

The extraction of derivatives from the sample into a nonpolar phase was only partially successful, the best results were reached when 100 µl of water was added into the polar phase of extracted sample.

Thus, the main contribution of this work is in exploration of behaviour of concrete substances on ionic liquid stationary phases.

Keywords: ibuprofen, ibuprofen impurities, alkylchloroformates, ionic liquids, gas chromatography

Seznam použitých zkratk

ACN	acetonitril
CAS	Chemical Abstract Service
EI	elektronová ionizace
GC	plynová chromatografie
GLC	plynová rozdělovací chromatografie
GSC	plynová adsorpční chromatografie
HEX	n-hexan
HFBCF	2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutylchloroformiát
HFBOH	2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutan-1-ol
iBCF	isobutylchloroformiát
iBOH	isobutanol
ISOO	isooktan
IBU	ibuprofen
IBU-h	2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutylchloroformiátový derivát IBU
IBU-i	isobutylchloroformiátový derivát IBU
IL	iontová kapalina (ionic liquid)
log P	logaritmus rozdělovacího koeficientu P
MS	hmotnostní spektrometrie
m/z	poměr hmotnosti a náboje
nečistota B	(2 <i>RS</i>)-2-(4-butylfenyl)propanová kyselina
nečistota B-h	2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutylchloroformiátový derivát nečistoty B
nečistota B-i	isobutylchloroformiátový derivát nečistoty B
nečistota E	1-[4-(2-methylpropyl)fenyl]ethanon

nečistota F	3-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propanová kyselina
nečistota F-h	2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutylchloroformiátový derivát nečistoty F
nečistota F-i	isobutylchloroformiátový derivát nečistoty F
nečistota J	(2 <i>RS</i>)-2-[4-(2-methylpropanoyl)fenyl]propanová kyselina
nečistota J-h	2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutylchloroformiátový derivát nečistoty J
nečistota J-i	isobutylchloroformiátový derivát nečistoty J
PEG	polyethylenglykol
SIM	monitorování vybraného iontu (single-ion monitoring)
SLB-IL	kolony s iontovou kapalinou jako stacionární fází (název konkrétní řady kolon od výrobce)
USP	lékopis Spojených států amerických (United States Pharmacopeia)

1 ÚVOD

Tato práce je zaměřena na plynovou chromatografii s využitím iontových kapalin jako stacionárních fází.

Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií je v současné době běžná analytická metoda, která umožňuje velmi účinnou separaci látek v plynném stavu a jejich vysoce specifickou detekci. Hmotnostní spektrometrie umožňuje získání informací o struktuře analyzovaných látek v podobě hmotnostních spekter.

Iontové kapaliny jsou kapalné soli, které jsou tvořeny organickým kationtem a organickým nebo anorganickým aniontem. Díky svým speciálním vlastnostem vycházejícím ze struktury nacházejí uplatnění v mnoha oblastech lidské činnosti.

V této práci jsme testovali jednu kolonu s konvenční nepolární polysiloxanovou stacionární fází a tři kolony s polárními stacionárními fázemi tvořenými iontovou kapalinou. K testování těchto kolon jsme použili modelový vzorek ibuprofenu a jeho čtyř lékopisných nečistot derivatizovaných isobutylchloroformiátem nebo 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutylchloroformiátem. Naším cílem bylo porovnat získané výsledky.

Dále jsme se pokusili popsat a vysvětlit retenční mechanismy, které hrály roli při těchto separacích. Zkusili jsme také optimalizovat podmínky separací na jednotlivých kolonách a v průběhu práce jsme zkoušeli různé možnosti extrakce derivátu ibuprofenu do nepolární fáze tvořené isooktanem nebo hexanem, protože takto upravený vzorek by měl být šetrnější vůči stacionárním fázím použitých kolon.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chromatografie a princip chromatografického dělení

Chromatografie je skupina vysoce účinných separačních metod, hojně používaná v mnoha odvětvích lidské činnosti. Při všech chromatografických metodách dochází v průběhu separačního procesu k mnohonásobnému ustavování dynamické rovnováhy zadržováním složek analytu různými interakcemi na stacionární fázi a jejich následným vymytím mobilní fází, která je odnáší dál ve směru svého toku. Složka, která je více zadržována stacionární fází se opoždí vzhledem ke složce, která je zadržována méně. Jednotlivé složky analyzované směsi tak vycházejí na výstupu z kolony oddělené a může dojít k jejich detekci. [1, 2]

V současnosti se používá mnoho typů chromatografických metod, které se liší svou povahou například:

- podle mobilní fáze: plynová, kapalinová chromatografie
- podle způsobu vyvíjení: eluční, vytěšňovací, frontální chromatografie
- podle principu dělení: adsorpční, rozdělovací, ionexová, gelová permeační chromatografie
- podle účelu: analytická, preparativní chromatografie
- podle použité techniky: sloupcová, papírová chromatografie, chromatografie na tenké vrstvě [1, 2]

2.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je separační metoda založená na rozdílu v distribuci látek mezi dvěma nemísitelnými fázemi. Mobilní fází je nosný plyn, který se pohybuje skrz nebo podél stacionární fáze, která je umístěna v koloně. [3]

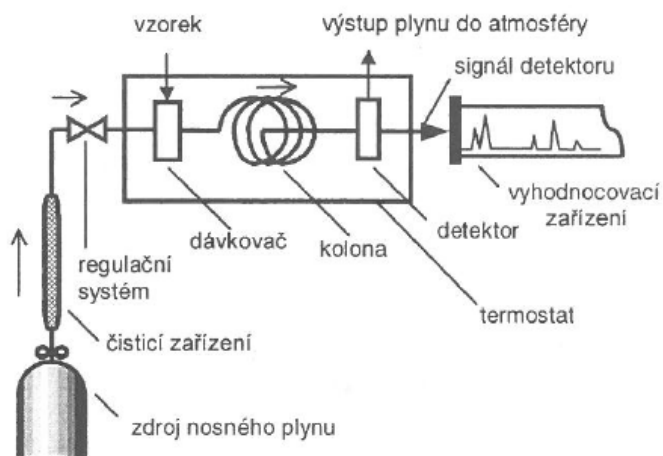
Od jiných druhů chromatografie se GC liší pouze tím, že mobilní fází je plyn a látky se dělí v plynném stavu. GC je použitelná pro plynné, kapalné i pevné látky, které lze při teplotě do 400 °C převést bez rozkladu do plynného stavu. Především se využívá pro analýzu těkavých látek a plynů. Netěkavé látky lze před analýzou podrobit derivatizaci za vzniku těkavých derivátů. [1, 4]

K hlavním výhodám této metody patří jednoduchost, vysoká citlivost a velká separační účinnost. Využití nachází v kvalitativním i kvantitativním hodnocení separovaných složek směsi. [1, 4]

GC je založena na mechanismu adsorpce, rozdělování nebo vylučování. [3]

2.2.1 Plynový chromatograf

Plynový chromatograf (obrázek 1) je přístroj sloužící k provedení analýzy. Skládá se ze zdroje nosného plynu (tlakové lahve), ze zařízení pro regulaci průtoku a měření tlaku nosného plynu, nástřikové hlavy, kde se aplikuje vzorek do kolony, kolony, termostatu, detektoru a počítače. [4]



Obrázek 1 – Schéma plynového chromatografu

2.2.2 Nosný plyn

Nosný plyn v CG představuje mobilní fázi a zajišťuje transport složek vzorku kolonou, ačkoli se neúčastní přímo separačního procesu. Jeho zdrojem je tlaková láhev. Jako nosný plyn se nejčastěji používá helium, dusík, vodík nebo argon. Nosný plyn by měl být inertní, vysoce čistý a bez vlhkosti. Proto se před vstupem na kolonu čistí a suší, a navíc se reguluje jeho průtok a tlak. Průtok plynu kolonou musí být optimalizován tak, aby se dosáhlo co nejlepšího rozdělení látek, a tedy co nejmenšího rozšíření (rozmytí) jejich zón. Při volbě nosného plynu se uvažují faktory jako: reaktivita, viskozita, účinnost, čistota, typ používaného detektoru a cena plynu. [1, 2, 6]

Dusík jako nosný plyn vykazuje nejlepší účinnost při nízkých průtokových rychlostech, z čehož vyplývají vysoké retenční časy analytů. Výhodou dusíku jako nosného plynu je jeho nízká cena. [7]

Účinnost helia jako nosného plynu je mírně nižší než u dusíku. Naopak optimální rychlost je vyšší, takže se dosáhne podobného rozlišení za kratší dobu. K nevýhodám helia patří jeho vysoká cena. [7, 8]

Účinnost vodíku jako nosného plynu je mírně nižší než u dusíku, ale podobná jako u helia. Cenově je vodík levnější než helium, ale dražší než dusík. Je nejlepší možností pro kapilární kolony, ale je explozivní. [7, 8]

2.2.3 Regulátory tlaku a průtoku

Regulátory tlaku a průtoku jsou elektronická regulační zařízení, která slouží k ovládání průtoku a tlaku nosného plynu. Konstantní průtok plynu kolonou a detektorem je zajištěn regulátorem průtoku, bez ohledu na typ nosného plynu, teplotu a rozměry kolony. Tlak je proměnnou veličinou a nastavuje se automaticky podle viskozity plynu, vnitřního průměru kolony a délky kolony tak, aby byl průtok kolonou konstantní. [6]

2.2.4 Injektor

Vstupem analyzované látky do plynového chromatografu je injektor. Nástřík analyzovaného vzorku 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 vlivem vysoké teploty k rychlému odpaření vzorku a ke správnému promíchání par vzorku s nosným plynem. Teplota dávkovacího zařízení by měla být o 50 °C vyšší, než je teplota varu nejvýše vroucí složky obsažené ve vzorku. Zplyněný vzorek je následně unášen nosným plynem do kolony. Mezi injektor a kolonu je zařazen dělič toku (splitter), který umožňuje vést na kolonu jen část odpařeného vzorku (split ratio, splitovací poměr). Technika nástřiku bez splitu (splitless injection) se používá při stopové analýze nebo při analýze směsí látek, které se výrazně liší teplotou varu [1, 6]

2.2.5 Kolony

V GC jsou používány kolony kapilární nebo dnes již jen výjimečně náplňové.

Náplňové kolony jsou trubice s průměrem 2 až 5 mm, které obsahují adsorbent pro plynovou adsorpční chromatografii (GSC) nebo nosič se zakotvenou kapalnou stacionární fází pro plynovou rozdělovací chromatografii (GLC). Délka analytických náplňových kolon se pohybuje v rozmezí od 0,5 do 5 m. Kolony jsou nejčastěji vyráběny ze skla nebo nerezové oceli. [4, 6]

Kapilární kolony jsou tenké kapiláry, které se vyrábějí nejčastěji z křemenného skla a jsou potaženy filmem polyimidu kvůli pevnosti. Vnitřní průměr nebývá větší než 0,5 mm a jejich délka se pohybuje od 10 do 100 m. Stacionární fáze je nanášena na vnitřní stěně kapiláry. Kapalná stacionární fáze tvoří na vnitřním povrchu kolony film silný 0,1 μm až 5,0 μm . [3, 4, 6]

2.2.6 Stacionární fáze

GC lze obvykle rozdělit na chromatografii v systému plyn – pevná látka (GSC) a na chromatografii v systému plyn – kapalina (GLC). V případě GSC je distribuce analytu založena na adsorpci a stacionární fáze může být tvořena sorbentem jako je například silikagel nebo aktivní uhlí. Příkladem rozdělovací chromatografie je GLC a jako kapalné stacionární fáze se používají například polyethylenglykoly. [1]

Volba vhodné stacionární fáze závisí především na charakteru dělených složek ve vzorku. Vysoce polární zakotvenou fází je například polyethylenglykol, středně polární dinonylfthalát a nepolární například methylsilikonový olej. [1]

Poškození stacionární fáze

Chemické poškození stacionární fáze může vzniknout působením kyslíku, silných anorganických kyselin, bází či organických kyselin. Stacionární fáze může podlehnout také tepelnému poškození. Poškozená stacionární fáze, například polysiloxanová, může depolymerizovat. [8]

2.2.7 Teplotní program

Pro kolonu, která je umístěna v peci temperované na určitou teplotu, je udržování vhodné pracovní teploty pomocí termostatu zásadní. Při izotermické GC je na koloně po celou dobu udržována konstantní teplota, která se volí v souladu s teplotami varu složek vzorku. Pro analýzu směsi látek s rozdílnými teplotami varu, které se výrazně liší těkavostí nebo silou specifických interakcí se stacionární fází je vhodné použít teplotní gradient, kdy se teplota kolony během analýzy mění (stoupá) podle vytvořeného teplotního programu. Výhodou použití teplotního gradientu je výrazné zkrácení doby analýzy a zlepšení tvaru chromatografických píků (zúžení signálů, vyšší citlivost). [1, 6, 8]

2.2.8 Detektor

Detektor umožňuje převést výsledky dělení v chromatografické koloně na registrovatelnou formu. Obecným požadavkem je vysoká citlivost a univerzálnost detekce pro všechny látky. [1]

V GC se využívá několik různých typů detektorů, mezi nejznámější se řadí například teplotně vodivostní detektor (TCD, katarometr), plamenově ionizační detektor (FID), detektor elektronového záchytu (ECD), hmotnostně spektrometrický detektor (MS), termoionizační detektor (TID) nebo fotoionizační detektor (PID). [9]

2.2.9 Řídící jednotka

Z detektoru je signál přenesen do počítače, který ho zpracuje, zakreslí chromatografickou křivku a provede její vyhodnocení. Počítač mimo to také řídí chod celého chromatografu a umožňuje výstup na tiskárnu. [4, 5]

2.3 Hmotnostní spektrometrie

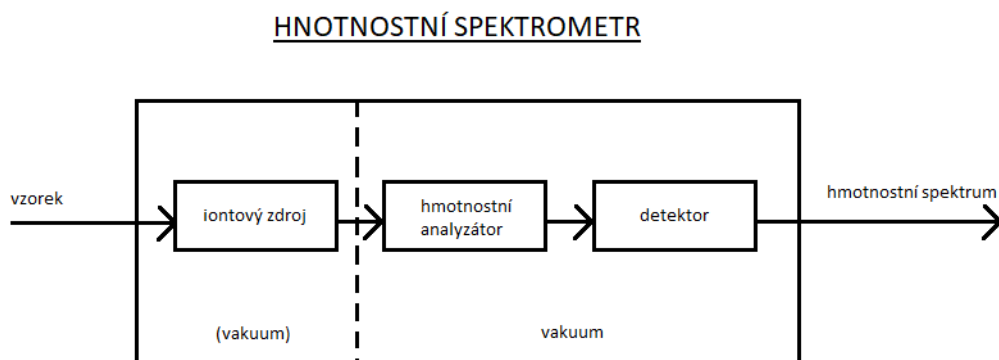
Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda, která slouží k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) a k záznamu relativních intenzit těchto jednotlivých iontů. Jedná se o velmi citlivou metodu, umožňující identifikaci látky ve vzorku i v množství kolem 10^{-9} g a detekci při 10^{-15} g. [10, 11]

Spojení GC a MS (GC/MS) kombinuje výhody obou technik a umožňuje v jedné analýze zároveň separovat a identifikovat složitou směs látek. V současnosti je GC/MS již zcela rutinní metoda, téměř výhradně se používá ve spojení s kapilárními kolonami a umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu vzorků. [11, 12]

2.3.1 Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr je iontově-optické zařízení, které umožňuje rozlišení iontů podle poměru jejich m/z . K výhodám MS patří vysoká citlivost a minimální spotřeba vzorku. Nevýhodou jsou vysoké pořizovací a provozní náklady hmotnostního spektrometru a fakt, že MS je destruktivní metoda. [10]

Tři základní části hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor (obrázek 2). K nim patří další důležité součásti přístroje jako vakuový systém, sonda pro zavádění vzorků, iontová optika umožňující urychlení a fokusaci iontů, počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr, ukládání a zpracování dat. [13]



Obrázek 2 – Schéma hmotnostního spektrometru

Tři základní části hmotnostního spektrometru

1. Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních částic na částice nabitě (tzv. ionizace). Konstrukce iontových zdrojů se liší v závislosti na ionizační technice.
2. Hmotnostní analyzátor umožňuje rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle m/z .
3. Detektor slouží k detekci iontů po jejich separaci podle m/z a ke stanovení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů.

[14]

Ionizační techniky a iontové zdroje

Druh iontového zdroje, resp. ionizační techniky se volí podle typu analyzované sloučeniny a požadavku na analýzu (souvisí s těkavostí, molekulovou hmotností, tepelnou stabilitou látky, polaritou, rozpustností apod.). [11, 13]

Ionizační techniky můžeme rozdělit dle energie ionizace na měkké a tvrdé.

Měkké ionizační techniky

Měkké ionizační techniky se vyznačují nízkou ionizační energií. Dochází při nich k tvorbě molekulárních iontů nebo iontů molekulárních aduktů (protonované, deprotonované molekuly $[M+H]^+$, $[M-H]^-$). Výtěžnost ionizace a tvorba aduktů závisí na zvolených podmínkách, jako je složení mobilní fáze, matrice nebo pH. Kvantifikace látek ve vzorku je ve spojení se separačními technikami problematická a je nutné použít vnitřní standard. [11]

K měkkým ionizačním technikám se řadí ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), ionizace laserem za účasti matrice (MALDI), chemická ionizace (CI)... [11]

Tvrdé ionizační techniky

Při použití tvrdých ionizačních technik získává ionizovaná molekula velký přebytek energie a dochází u ní k hluboké fragmentaci, a tedy vzniku fragmentových iontů. Při zvolené ionizační energii (70 eV) vznikají reprodukovatelná spektra, která umožňují tvorbu knihoven spekter a následnou identifikaci látek pomocí porovnávání spekter. Propracované fragmentační mechanismy umožňují i určení struktur neznámých látek. K tvrdým ionizačním technikám se řadí elektronová ionizace (EI). [11]

Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátor je umístěn mezi iontovým zdrojem a detektorem a umožňuje dělení iontů v plynné fázi podle jejich m/z . K dělení iontů v analyzátoru je zapotřebí vysoké vakuum (přibližně 10^{-3} až 10^{-11} Pa, dle typu analyzátoru). [10]

Dělení iontů podle m/z se dá dosáhnout na základě různých fyzikálních principů:

1. Magnetický nebo elektrostatický analyzátor je založen na zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli.
2. Kvadrupól nebo iontová past jsou založeny na různé stabilitě oscilací iontů ve dvojrozměrné nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí.
3. Analyzátor doby letu (TOF) funguje na podkladě různé doby rychlosti letu iontů.
4. Orbitrap je založen na různé frekvenci harmonických oscilací.
5. Iontová cyklotronová rezonance (ICR) využívá různé absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli.

[10]

Detektory

Detektory iontů jsou používány spolu se všemi analyzátory kromě iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) a Orbitrapu, kde je v analyzátoru prováděna zároveň detekce. Po rozdělení v hmotnostním analyzátoru dopadají ionty na detektor, který z nich generuje signál. Signál je generován buď tvorbou sekundárních elektronů, které se následně zesilují nebo indukcí proudu po dopadu iontů na detektor. [10]

1. Elektronový násobič je nejběžnějším detektorem. Ionty dopadají na povrch dynody, ze které vyráží elektrony, ty jsou dále zesíleny systémem dynod anebo opakovanými kolizemi na průběžně zakřivené dynodě. Zesílení signálu je možné až 10^8 krát.
2. Fotonásobič je detektor s delší životností. Ionty dopadají na konverzní dynodu, z ní se uvolňují elektrony, jejichž dopadem na fosforovou destičku se uvolní fotony, které se následně zesílí ve fotonásobiči. Zesílení signálu je možné 10^5 – 10^7 krát.

3. Faradayova klec je detektorem málo citlivým, ale zato robustním a velmi přesným na izotopická měření. Dopadající ionty narážejí na povrch dynody, která emituje elektrony a indukuje se proud, jenž je následně zesílen a zaznamenán.

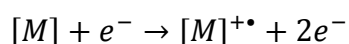
[10]

Výstupem celého měření je většinou hmotnostní spektrum, což je graf závislosti intenzity iontů na jejich m/z . Hmotnostní spektra jsou obvykle uváděna v normalizovaném stavu, což znamená, že nejintenzivnější pík má relativní intenzitu 100 % a intenzity ostatních píků se dopočítávají. [10, 13]

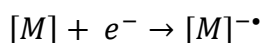
V experimentální části této práce byl použit hmotnostní spektrometr s tvrdou ionizační technikou (EI) a kvadrupólem.

Elektronová ionizace (EI)

Neutrální molekuly $[M]$, které jsou eluovány z kolony plynového chromatografu musí získat v iontovém zdroji pozitivní nebo negativní náboj, aby s nimi šlo manipulovat v hmotnostním analyzátoru. Proud elektronů je emitován wolframovou nebo rheniovou katodou. Neutrální molekuly vycházející z kolony jsou náhodně rozptýlené přes iontový zdroj a jsou vystavené proudu elektronů s kinetickou energií (obvykle 70 eV), která je vyšší než ionizační energie vzorku. Z neutrální molekuly $[M]$ vzniká radikálový kationt $[M]^{+\bullet}$ odtržením elektronu tehdy, když se emitovaný elektron s dostatečnou energií srazí nebo přeletí v dostatečné blízkosti valenčních elektronů neutrální molekuly $[M]$. Vzniklý radikálový kationt se také označuje jako molekulární iont.

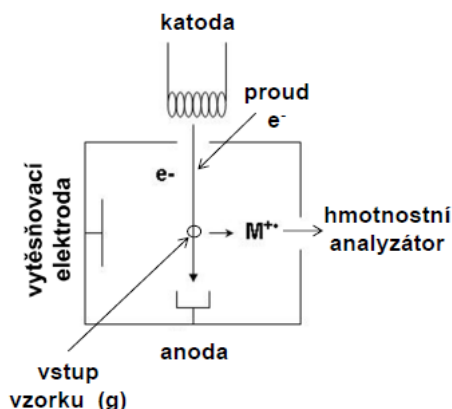


Pokud molekula přijme elektron, vzniká radikálový aniont $[M]^{-\bullet}$.



[13, 15]

Zjednodušené schéma EI je uvedeno na obrázku 3.



Obrázek 3 – Schéma elektronové ionizace

Ionizace je závislá jak na energii elektronu, tak na energii molekuly. Energie elektronů je určována jejich urychlovacím potenciálem a energie molekuly závisí na její teplotě, a tedy na teplotě iontového zdroje. [13]

Ve spektru jsou kromě molekulárních iontů také fragmentové ionty, které jsou pro strukturu pozorovaných molekul charakteristické. Tyto fragmentové ionty vznikají z molekulárních iontů, pokud molekula získá při ionizaci velký přebytek vnitřní energie. Přibližně v 10 % případů dochází k fragmentaci v takovém rozsahu, že molekulární iont ve spektru zcela chybí. [13, 15]

Metoda elektronové ionizace není vhodná pro polární látky, látky tepelně nestálé a látky vysokomolekulární. [16]

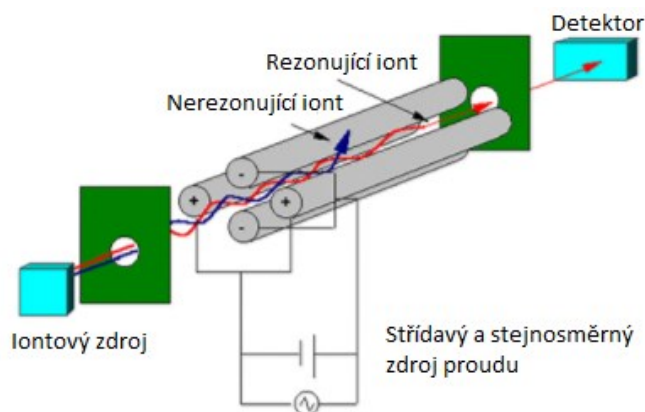
Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor (obrázek 4) je tvořen čtyřmi stejnými kovovými tyčemi kruhového průřezu o délce 20–30 cm. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí a na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí. Na všechny tyče je navíc superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. [10]

Princip dělení iontů

Iont se přivede do středu osy kvadrupólu a začne oscilovat. V daný časový okamžik jsou pro určitý poměr stejnosměrného napětí a amplitudy (U/V) oscilace stabilní pouze pro iont s určitou hodnotou m/z , který projde kvadrupólem a dostane se až na detektor. Všechny ostatní ionty s jinými m/z jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Plynulou změnou (skenováním) hodnot stejnosměrného napětí U a amplitudy V (jejichž poměr

zůstává konstantní) jsou na detektor postupně propouštěny všechny ionty (vlastně se jedná o hmotnostní filtr). [10]



Obrázek 4 – Schéma kvadrupólového analyzátoru

2.3.2 Citlivost vs. skenovací rozsah

Při skenování vzorku např. v rozsahu 1000 m/z, je na detekci jedné hodnoty m/z pouze 1/1000 z celkového času. Ve zbývajícím čase jsou ionty s touto hodnotou m/z zachyceny na tyčích kvadrupólu. Když snížíme hmotnostní rozsah, zvýší se tím zároveň citlivost detekce. [18]

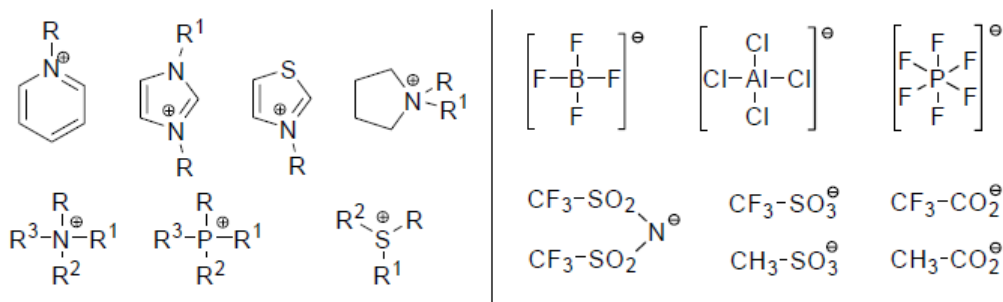
Pokud použijeme tzv. selektivní záznam iontu (single-ion monitoring – SIM), zvýší se výrazně citlivost analýzy. V tomto případě už ale neměříme hmotnostní spektrum, ale pouze záznam intenzity iontu v čase (případně více iontů). To je vhodné pro kvantitativní a stopovou analýzu, když známe strukturu analytu. [18]

2.4 Iontové kapaliny

Iontové kapaliny (IL) jsou kapalné soli, které jsou tvořeny organickým kationtem a organickým nebo anorganickým aniontem. [19]

Fakt, že jsou tyto soli kapalné, je způsoben tím, že jsou oba přítomné ionty (nebo alespoň kationt) objemné, jejich náboj je delokalizován a nedochází mezi nimi ke koordinaci. [19]

Mezi kationty splňující uvedené podmínky se řadí zejména sloučeniny obsahující kvarterní atom dusíku (pyridiniové, imidazoliové, amoniové, thiazoliové a pyrrolidinové soli) nebo atom fosforu (fosfoniové soli), či atom síry (sulfoniové soli). Nekoordinující anionty jsou nejčastěji tetrachloroaluminát, tetrafluoroborát, hexafluorofosfát, ale také acetát, nitrát, trifluoracetát, trifluormethansulfonát, tosylát a další (obrázek 5). [19]



Obrázek 5 – Příklady kationtů a aniontů tvořících iontové kapaliny

Pro stabilitu IL je důležité, aby byl atom nesoucí náboj plně substituován. Mezi substituenty R až R³ se tedy nesmí nacházet vodík, protože by mohlo dojít k jeho snadnému odštěpení a následnému rozkladu soli. [19]

Obecně je teplota tání IL nižší než 100 °C. IL, které jsou kapalné již při laboratorní teplotě (25 °C) se nazývají RTILs (room temperature ionic liquids). [19]

K hlavním výhodám IL patří například vysoká termostabilita, prakticky nulová tenze par, nízká toxicita, nehořlavost, unikátní solvatační vlastnosti a široké teplotní rozmezí, ve kterém se nachází v kapalném stavu. [19]

2.4.1 Vlastnosti iontových kapalin a jejich využití v plynové chromatografii

Vlastnosti jako povrchové napětí, hustota, viskozita, teplota tání, tepelná stabilita, rozpustnost a mísitelnost s rozpouštědly striktně souvisí se strukturou kationtu i aniontu a současně se zvolenou kombinací obou iontů. Změnou kationtu nebo spíše aniontu lze zcela změnit fyzikálně-chemické vlastnosti sloučeniny. Aby mohly být IL používány jako stacionární fáze v GC, musí svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi splňovat řadu požadavků. [20]

Teploata tání

Nízkou teplotu tání vykazují soli s objemnými ionty, delokalizovaným nábojem a nízkým stupněm symetrie kationtu. S rostoucí délkou alkylového řetězce obvykle klesá teplota tání IL, dokud nedosáhne minima. Některé IL se chovají jako podchlazené kapaliny (zůstávají kapalné i za nižší teploty, než je jejich teplota tání). [21, 22]

Tepelná stabilita

IL s málo nukleofilními nebo koordinujícími anionty (NTf_2^- , TfO^-) mají několikanásobně vyšší stabilitu než IL s halogenidy. Důvodem nižší tepelné stability halogenidů jsou jejich silné nukleofilní vlastnosti a větší náchylnost k rozkladu substitučními nukleofilními reakcemi. Obecně tepelná stabilita klesá přibližně v tomto pořadí: $\text{N}(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2^- \rightarrow \text{PF}_6^- \sim \text{BF}_4^- \rightarrow \text{Cl}^-$, a dá se tedy říci, že termostabilita IL roste s rostoucí velikostí aniontu. Tepelná stabilita IL obvykle roste s rostoucí délkou alkylového substituentu na kationtu IL. Lepší tepelnou stabilitu vykazují například dikationické IL nebo polymerizované IL. Tepelná stabilita použitých IL je důležitý prvek určující životnost kolony a celkové separační chování. [19, 22]

Viskozita

Viskozita IL jakožto stacionárních fází v GC ovlivňuje efektivitu separace a životnost kolony. Ideálně by IL používané jako stacionární fáze měly mít vysokou viskozitu, která by se významně neměnila se změnou teplot. Viskozita je udávána především vodíkovými vazbami a van der Waalsovými interakcemi mezi kationty a anionty IL. IL se silně koordinujícími anionty (halogenidy) obvykle vykazují velmi vysoké hodnoty viskozity. Naopak IL obsahující objemný organický aniont (NTf_2^- , TfO^-) mají nízkou viskozitu. [22]

Hustota

Hustota iontových kapalin se pohybuje v intervalu 1,12–2,4 g/cm³ a s teplotou ani množstvím nečistot se příliš nemění. [19]

Povrchové napětí

Povrchové napětí se pohybuje v rozmezí 30–50 mN/m a je závislé na struktuře kationtů a aniontů tvořících IL. IL se silně koordinujícími anionty (halogenidy) vykazují vysoké povrchové napětí. Povrchové napětí má tendenci klesat s rostoucí velikostí aniontu ($\text{BF}_4^- > \text{PF}_6^- > \text{TfO}^- > \text{NTf}_2^-$). U monokationických imidazoliových IL se povrchové napětí snižuje s rostoucí délkou alkylového řetězce. Podobně je tomu u IL na bázi kvarterních amoniových solí a u fosfoniových IL. U dikationických imidazoliových IL tato tendence není tak zřejmá. Vhodné povrchové napětí IL je důležité pro vytvoření homogenní tloušťky filmu stacionární fáze na koloně. Příliš vysoké povrchové napětí by mohlo způsobit problémy při potahování kolony filmem IL. [22]

Tenze par

Tenze par IL je v celém použitelném teplotním rozsahu zanedbatelná, což je výhodné pro použití IL jako stacionární fáze v plynové chromatografii. Nízká tenze par je dána dlouhým dosahem coulombických sil v IL, které brání úniku iontů do plynné fáze. [23]

Rozpustnost

Rozpustnost IL závisí mimo jiné na délce alkylového řetězce a na dalších substituentech na skeletu IL a na povaze doprovodného aniontu. Např. imidazolium hexafluorofosfáty jsou s vodou nemísitelné, ale halogenidy, nitráty, acetáty a trifluoracetáty jsou mísitelné úplně. Přejít tvoří tetrafluoroboráty a trifluormethansulfonáty, jejichž rozpustnost je dána délkou alkylových řetězců kationtu. IL jsou také účinnými rozpouštědly širokého spektra organických, anorganických a organokovových sloučenin. [19, 24]

Toxicita

IL byly původně považovány za netoxické a ekologicky výhodné sloučeniny, jelikož jsou velmi málo těkavé a předpokládalo se, že nahradí obvyklá těkavá organická rozpouštědla. Později se zjistilo, že mnoho IL je toxických a ačkoli jejich používání může snížit riziko znečištění ovzduší, tak zde stále zůstává značné riziko kontaminace vody. V neprospěch IL byla také jejich velmi nízká biologická rozložitelnost. Následovaly snahy o vytvoření

IL, které by byly netoxické a biologicky odbouratelné. Tyto nové ekologicky šetrné IL obsahují například α -aminokyseliny, dusičnany nebo sacharidové anionty. [25]

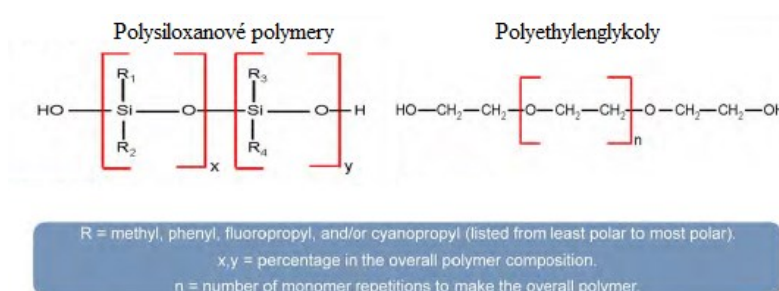
2.5 Iontové kapaliny jako stacionární fáze v plynové chromatografii

V GC se používají až na pár výjimek pouze tři typy stacionárních fází:

První byly roku 1952 uvedeny do praxe substituované polysiloxanové polymery. V roce 1956 přibýly polyethylenglykoly (PEG). IL byly představeny společností Supelco jako stacionární fáze v roce 2008. [26]

2.5.1 Srovnání polysiloxanových a polyethylenglykolových kolon a kolon s iontovou kapalinou

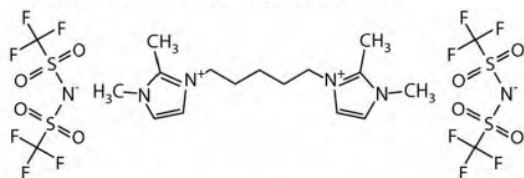
Nejpoužívanější stacionární fáze v GC jsou tvořeny polysiloxanovými polymery a PEG (obrázek 6). K jejich nevýhodám patří přítomnost aktivních hydroxylových skupin na koncích polymerů, které jsou náchylné k back-biting reakci, pokud jsou vystaveny vlhkosti a přítomnosti kyslíku. Výsledkem je degradace stacionární fáze a „krvácení“ kolony. Možnost modifikovat tyto stacionární fáze za účelem pozměnění selektivity je omezená. Největším omezením kolon s PEG stacionárními fázemi je jejich teplotní limit do 280 °C. [26]



Obrázek 6 – Polysiloxanové polymery a polyethylenglykoly

Stacionární fáze tvořené IL (obrázek 7) se fyzikálně i chemicky liší od ostatních stacionárních fází používaných v GC. IL jsou zde tvořeny anionty, které mohou být organické či anorganické a dvěma nebo více organickými kationty, které jsou spojeny spojovacím řetězcem. Z toho vyplývá možnost velkého množství různých modifikací IL a jimi tvořených stacionárních fází. Výhodou těchto stacionárních fází je nepřítomnost

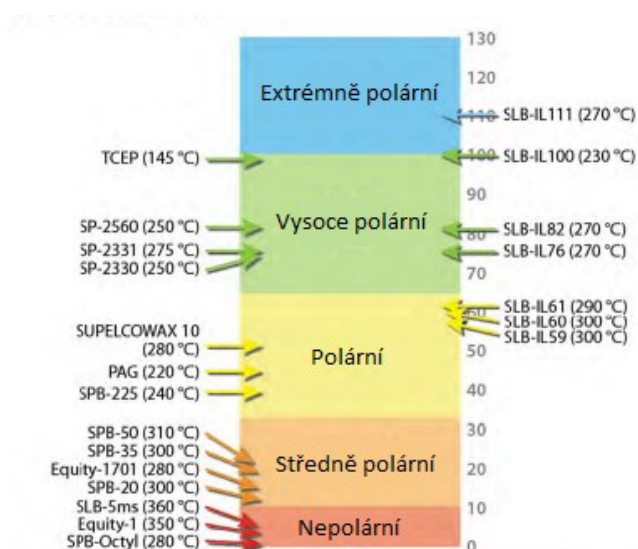
aktivních hydroxylových skupin a malá velikost molekul IL oproti velkým polysiloxanovým polymerům a PEG. To vše vede k lepší stabilitě kolon s IL jako stacionární fází, dokonce i v přítomnosti vlhkosti a kyslíku. [26]



Obrázek 7 – Příklad iontové kapaliny používané jako stacionární fáze v plynové chromatografii

Porovnání polarit kolon

Pro společnost Sigma-Aldrich byla na univerzitě v Messině (Itálie, Prof. L. Mondello) vytvořena škála polarit stacionárních fází používaných v GC (obrázek 8), pomocí které se dají jednotlivé stacionární fáze s IL snadno porovnávat mezi sebou a mezi stacionárními fázemi s PEG a polysiloxany. Každá stacionární fáze je charakterizovaná určitou hodnotou polarit a číslem polarit (určeno experimenty a výpočtem), které je poměrné ke skvalenové stacionární fázi (nejvíc nepolární stacionární fáze v GC, a tudíž na škále hodnota 0) a ke koloně s iontovou kapalinou jako stacionární fází označené SLB-IL100 (na škále hodnota 100). Z obrázku 8 tedy vidíme, že stacionární fáze s IL patří k těm polárnějším. [26]



Obrázek 8 – Škála polarit stacionárních fází v plynové chromatografii. Vpravo kolony s iontovou kapalinou, vlevo polysiloxanové a polyethylenglykolové kolony

2.5.2 Vliv nečistot v iontových kapalinách jako stacionárních fázích

Nečistoty v IL mají velký vliv na jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a na retenci a efektivnost separace organických analytů. Nejčastějšími nečistotami IL jsou organická rozpouštědla, halogenidy a voda. [22]

Voda snižuje viskozitu a povrchové napětí IL, což ztěžuje potahování kolony filmem IL. Halogenidové nečistoty mají vliv na separační selektivitu a tepelnou stabilitu, zvyšují viskozitu a snižují hustotu IL. Jejich přítomnost může být příčinou chvostujících píků. [22]

2.5.3 Dvojitá podstata separačního mechanismu

Často se uvádí, že IL disponují dvojitým separačním mechanismem. Důvodem je vysoká afinita silně polárních IL k dipolárním sloučeninám i k látkám s kyselým vodíkem. Stacionární fáze s IL se podobají polárním stacionárním fázím, jako jsou PEG nebo kyanopropylsiloxany. Současně však disponují i centry disperzních interakcí, tak jako polydimethylsiloxanové a methylfenylsiloxanové stacionární fáze. Na stacionárních fázích s IL byla tudíž prokázána vysoká zadrž polárních i nepolárních analytů zároveň. Tato unikátní vlastnost je v mnoha publikacích popisována jako dvojitá podstata (dual-nature) separačního mechanismu. [20]

2.5.4 Fenomén teplotního efektu

Vyšší teplota na koloně vede ke snížené retenci všech analytů. Důvodem je zeslabení všech interakcí mezi stacionární fází a analytem, právě v důsledku zvýšené teploty.

Vyšší teplota má ale za následek také změny v selektivitě, jelikož vede k zeslabení všech interakcí mezi stacionární fází a analytem, avšak všechny interakce se nezeslabují stejně rychle. Například alkany jsou na koloně primárně zadržovány disperzními interakcemi, naproti tomu aromatické sloučeniny jsou na koloně zadržovány disperzními interakcemi, a navíc ještě interakcemi dipól-indukovaný dipól. S rostoucí teplotou slábnou rychleji disperzní interakce než interakce dipól-indukovaný dipól. To má za následek změny v retenčních časech analytů a případně i změnu pořadí ve kterém jsou analyty eluovány z kolony. Čím je kolona polárnější, tím více se na ní tento jev projevuje a nemusí se jednat pouze o kolony s IL jako stacionární fází. [26]

2.5.5 Příklady typů iontových kapalin užívaných jako stacionární fáze

- *Imidazoliové* – nižší teploty tání oproti pyridiniovým a pyrolidiniovým IL
- *Fosfoniové* – vykazují zřetelné dual-nature vlastnosti, jsou méně polární ale tepelně i chemicky stabilnější než imidazoliové IL
- *Dikationické IL* – vyšší teplotní stabilita oproti monokationickým IL, zvýšení teplotního rozsahu použitelnosti pro GC
- *Polymerní IL* – částečně nebo zcela polymerované IL, polymerizace zabraňuje porušení rozdělovacího mechanismu (slití IL na koloně při vysokých teplotách do „kaluží“)
- *TSILs* – „task specific ionic liquids“ neboli IL se specifickým využitím, mají speciální vlastnosti, vznikly modifikací IL určitými skupinami (např. benzylové či fenylvé zbytky) pro získání specifických interakcí s analyty
- *Chirální* – IL jako chirální stacionární fáze mohou být připraveny buď rozpuštěním chirálního selektoru v IL a následným potažením kapilární stěny, nebo užitím chirální IL přímo jako chirálního selektoru

[22]

anionty:

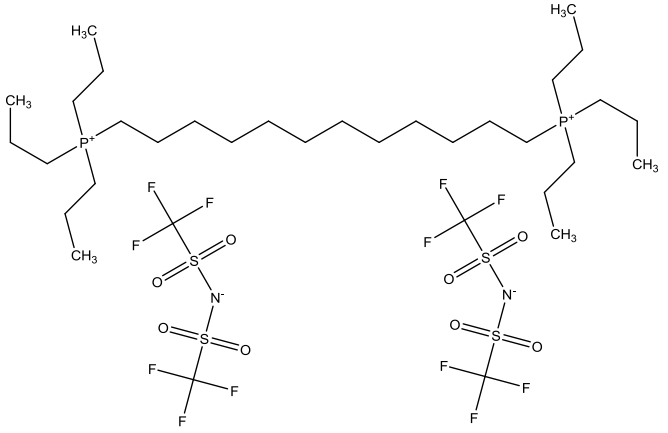
- *IL s chloridovým aniontem* – silné interakce s proton-donorovými i proton-akceptorovými skupinami analytů (alkoholy, dioly, fenoly, karboxylové kyseliny)
- *IL s hexafluorofosfátovým aniontem* – silnější interakce s nepolárními centry analytů (estery, aldehydy, ketony, aromáty)

[27]

2.5.6 Kolony, které byly použity v praktické části této diplomové práce

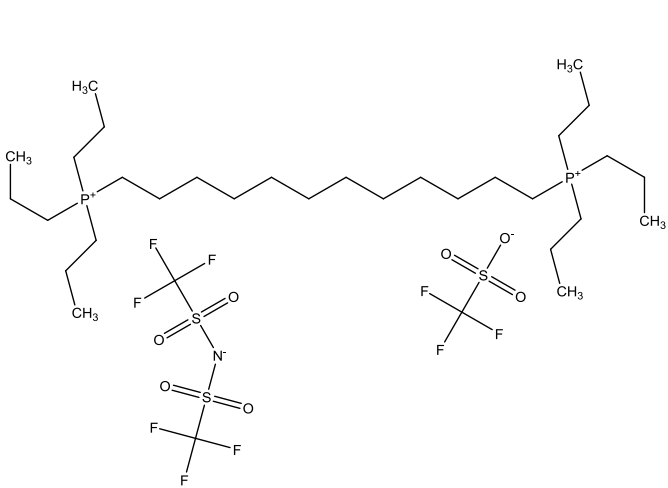
Tabulky 1–3 jsou přehledem IL kolon od společnosti Supelco (SLB-IL), které byly použity v praktické části této diplomové práce.

Tabulka 1 – Informace o koloně SLB-IL59

<p>SLB-IL59 30 m × 0,25 mm × 0,2 μm</p>	<p>1,12-di(tripropylfosfonium)dodekan bis(trifluormethylsulfonyl)imid</p>
	<p>selektivnější pro polárnější látky než PEG fáze, teplotní limit do: 300 °C, vhodné pro analýzu neutrálních a slabě bazických látek, stacionární fáze nevázaná chemicky</p>

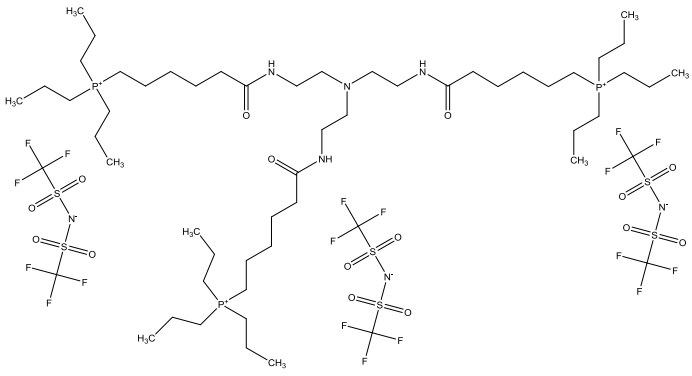
[26]

Tabulka 2 – Informace o koloně SLB-IL61

<p>SLB-IL61 30 m × 0,25 mm × 0,2 μm</p>	<p>1,12-di(tripropylfosfonium)dodekan bis(trifluormethylsulfonyl)imid trifluormethylsulfonát</p>
	<p>modifikovaná verze kolony SLB-IL59, vyšší inertnost kolony, selektivnější pro polárnější látky než PEG fáze, teplotní limit: 40–290 °C, vhodné pro analýzu neutrálních a slabě bazických látek, stacionární fáze nevázaná chemicky</p>

[26]

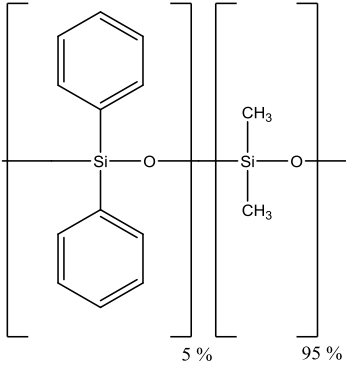
Tabulka 3 – Informace o koloně SLB-IL76

<p>SLB-IL 76 30 m × 0,25 mm × 0,2 μm</p>	<p>tri(tripropylfosfoniumhexanamido)triethylamin bis(trifluormethylsulfonyl)imid</p>
	<p>stacionární fáze disponuje mnoha interakčními mechanismy s analytem, rozdílná selektivita i oproti kolonám s podobnými hodnotami na škále polarita stacionárních fází v GC, teplotní limit: do 270 °C, stacionární fáze nevázaná chemicky</p>

[26]

V praktické části této diplomové práce byla použita také kolona HP-5ms Ultra Inert (tabulka 4).

Tabulka 4 – Informace o koloně HP-5ms Ultra Inert

<p>HP-5ms Ultra Inert 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm</p>	<p>(5%-fenyl)-methylpolysiloxan</p>
	<p>nepolární stacionární fáze, velmi malá „krvácivost“ kolony, vhodné pro GC/MS, teplotní limit: -60–325/350 °C, vhodné pro analýzu kyselin i zásad, stacionární fáze chemicky vázaná</p>

[28]

2.6 Derivatizace

GC se používá v analýze těkavých organických sloučenin. Sloučeniny, které se rozkládají zahřátím nebo jsou netěkavé, mohou být analyzovány pomocí GC až po derivatizaci, tedy převedení na stabilní a těkavé deriváty. Derivatizace také snižuje adsorpci analytu v GC systému a zlepšuje odezvu detektoru, separaci a symetrii píku. [29, 30]

Mezi obvyklé důvody pro přípravu derivátů patří:

- umožnění analýzy relativně netěkavých sloučenin, nebo naopak sloučenin těkavých příliš
- zlepšení stability analyzovaných sloučenin
- zlepšení analytické účinnosti a detekce
- zlepšení rozlišení a redukce chvostování píků polárních sloučenin

[29]

Výběr derivatizačního činidla závisí na funkční skupině, která má být derivatizována, na chemické struktuře a vlastnostech analytu, přítomnosti jiných funkčních skupin v molekule analytu a důvodu provádění derivatizace. [29]

Dobré derivatizační činidlo by mělo splňovat tato kritéria:

- derivatizační reakce má mít výtěžnost 95–100%
- během derivatizace nedochází ke strukturním změnám sloučeniny
- nezpůsobuje úbytek vzorku
- vzniklé deriváty neinteragují s analytickými kolonami
- vzniklé deriváty jsou stabilní v čase

[29]

Ideální derivatizace by měla splňovat podmínky:

- jednoduchá příprava vzorku
- reakce probíhá i ve vodném médiu
- okamžitý nebo alespoň velmi rychlý průběh reakce při laboratorní teplotě
- derivatizace je nedílnou součástí přípravy vzorku
- reakční činidla by měla být levná

[31]

Základní typy derivatizačních reakcí jsou acylace, alkylace a silylace. [29]

2.6.1 Acylace

Při acylaci dochází reakcí s karboxylovou kyselinou nebo jejími deriváty ke konverzi sloučenin obsahujících aktivní vodík, jako například -OH, -SH a -NH na estery, thioestery a amidy. [29]

Acylace má mnoho výhod, například zvyšuje stabilitu analytu ochranou jeho nestabilních skupin. Může dodat těkavost sloučeninám, jako jsou uhlovodíky nebo aminokyseliny, které jsou normálně netěkavé a zahříváním se rozkládají. Také umožňuje provádět GC u sloučenin, u kterých by to bez derivatizace nebylo možné a umožňuje detekci sloučenin i ve velmi nízkých koncentracích s použitím detektoru elektronového záchytu. Acylace snižuje polaritu analytu a zlepšuje vlastnosti píku díky snížené povrchové adsorpci. [29, 32]

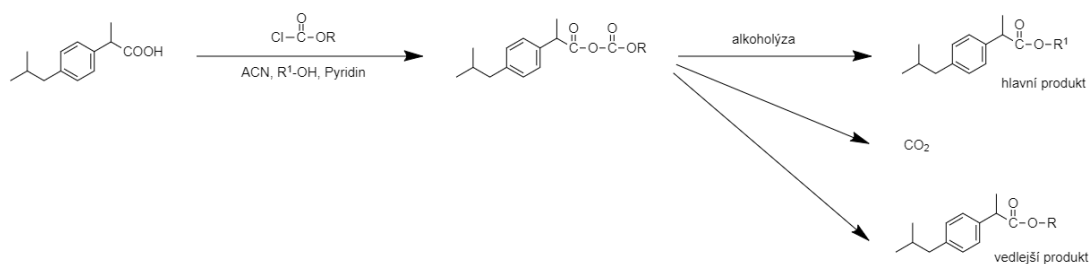
Acylace se také s výhodou využívá pro tvorbu derivátů, které se po průchodu kolonou detekují pomocí hmotnostní spektrometrie. [29]

Příkladem acylace může být alkylchloroformylace, která se velmi blíží výše popsané ideální derivatizaci.

Činidla pro ni jsou relativně levná, chemická reakce probíhá okamžitě a je robustní. Výtěžnost reakce by měla být vysoká, nevadí přítomnost vody, reakci není potřeba zahřívát a uvádí se, že vzniklé deriváty lze snadno vytřepat do nepolárního rozpouštědla. [31]

V současnosti jsou pro různé analyty známy různě upravené varianty alkylchloroformylace.

V této práci byla prováděna derivatizace ibuprofenu (IBU) acylací jeho karboxylové skupiny. Jako reakční prostředí se použil acetonitril, jako katalyzátor vystupoval pyridin a v reakční směsi byl i alkohol (isobutanol (iBOH) nebo 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutan-1-ol (HFBOH)) odpovídající použitému derivatizačnímu činidlu – alkylchloroformiátu (isobutylchloroformiátu (iBCF) nebo 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutylchloroformiátu (HFBCF)). Derivatizace IBU probíhala podle následujícího schématu (obrázek 9): [31]



Obrázek 9 – Reakční schéma alkylchloroformylace ibuprofenu

Během reakce došlo ke vzniku anhydridu a následně k dekarboxylaci a alkoholýze. Hlavním produktem reakce byl ester, který podlehl alkoholýze a jeho alkylová skupina tak pocházela z alkoholu. Vedlejším produktem byl ester, jehož alkyl pocházel z alkylchloroformiátu. Jelikož použité derivatizační činidlo a alkohol měly vždy shodné alkyly, hlavní a vedlejší produkt reakce byl stejný. [31]

V našem případě byl produktem reakce isobutylchloroformiátový derivát IBU (IBU-i) při použití iBCF nebo 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutylchloroformiátový derivát IBU (IBU-h) při použití HFBCF.

V tabulce 5 jsou uvedeny vzorce konkrétních alkylchloroformiátů, alkoholů a produktů reakcí, které byly použity v experimentální části této diplomové práce.

Tabulka 5 – Reakční činidla, alkoholy a produkty alkylchloroformylace

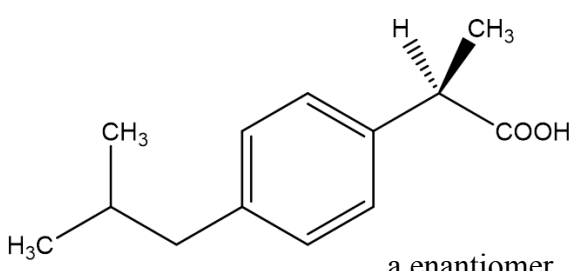
alkylchloroformiát	alkohol	produkt (derivatizovaný IBU)
<p>iBCF</p>	<p>iBOH</p>	<p>IBU-i</p>
<p>HFBCF</p>	<p>HFBOH</p>	<p>IBU-h</p>

Případná derivatizace nečistot IBU probíhala obdobně.

2.7 Ibuprofen a jeho nečistoty

V praktické části této práce jsme používali jako analyty IBU a jeho čtyři lékopisné nečistoty, které jsme před analýzou derivatizovali. Stručné informace o IBU a jeho čtyřech lékopisných nečistotách uvádíme v tabulkách 6–10.

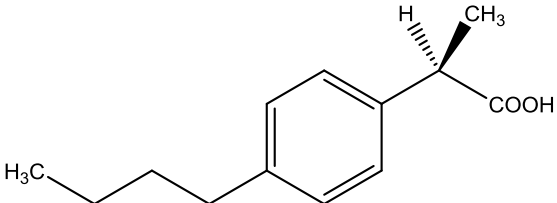
Tabulka 6 – Informace o ibuprofenu

2.7.1 Ibuprofen		
název: (2 <i>RS</i>)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propanová kyselina [33]		
 <p>a enantiomer</p>	Registrační číslo CAS	15687-27-1
	Molekulová hmotnost	206,3
	m/z sledované v MS	161
		262
		117
	119	
	388	
lékopisný název	ibuprofenum [33]	
sumární vzorec	C ₁₃ H ₁₈ O ₂ [33]	
teplota tání	75–77 °C [34], 75–78 °C [33]	
teplota varu	141–142 °C při tlaku 100 Torr [34]; 212–251 °C [34]	
pKa	4,41±0,10 při 25 °C [34]	
log P	3,502±0,227 při 25 °C [34]	
IBU je v lékopise popsán jako bílý nebo skoro bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v methanolu a v dichlormethanu. Je rozpustný ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a uhličitánů. [33]		

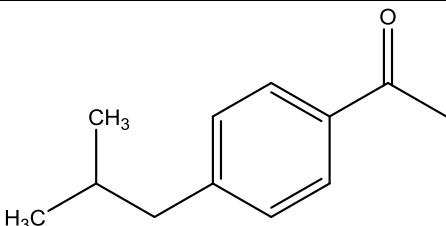
Jelikož molekula IBU obsahuje jedno chirální centrum, vyskytuje se IBU ve formě dvou enantiomerů. Pro účely této diplomové práce nebylo rozlišování jednotlivých enantiomerů IBU podstatné. IBU byl používán jako racemát.

V této práci byly použity čtyři lékopisné nečistoty IBU, a sice nečistota B, E, F a J. Ačkoli se v literatuře běžně vyskytují různé zkratky názvů těchto nečistot IBU (BOPA, fenon, Ibpap), dali jsme v této práci přednost lékopisnému pojmenování nečistot.

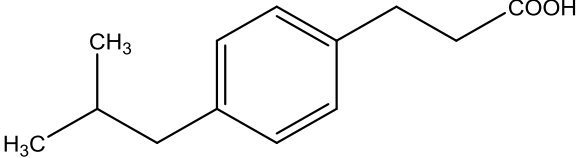
Tabulka 7 – Informace o nečistotě B

2.7.2 nečistota B		
název: (2 <i>RS</i>)-2-(4-butylfenyl)propanová kyselina [33]		
 <p>a enantiomer</p>	Registrační číslo CAS	3585-49-7
	Molekulová hmotnost	206,29
	m/z sledované v MS	161
		262
		117
		119
	388	
<p>(2<i>RS</i>)-2-(4-butylfenyl)propanová kyselina je hořlavá a toxická nečistota IBU. Jedná se o bezbarvou olejovitou kapalinu. [35, 36]</p>		

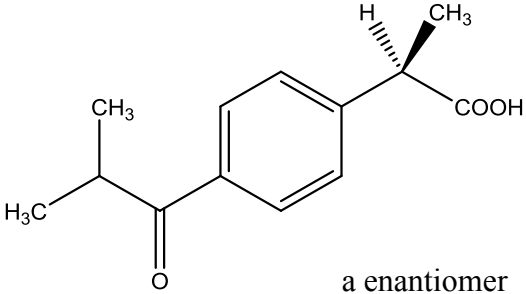
Tabulka 8 – Informace o nečistotě E

2.7.3 nečistota E		
název: 1-[4-(2-methylpropyl)fenyl]ethanon [33]		
	Registrační číslo CAS	38861-78-8
	Molekulová hmotnost	176,26
	m/z sledované v MS	161
		119
<p>4-isobutylacetofenon vzniká radikálově indukovanou dekarboxylací a následnou oxidací IBU. Byly prokázány toxické účinky na centrální nervovou soustavu a vysoká schopnost dermální absorpce. V literatuře se označuje také jako Ibap nebo fenon. Je popisován jako čirá bezbarvá až světle žlutá olejovitá látka. [37, 38]</p>		

Tabulka 9 – Informace i nečistotě F

2.7.4 nečistota F		
název: 3-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propanová kyselina [33]		
	Registrační číslo CAS	65322-85-2
	Molekulová hmotnost	206,29
	m/z sledované v MS	163
		262
		117
		119
Vzhledově se jedná o špinavě bílý až světle béžový prášek, jehož teplota tání je 64–66 °C. [39]		

Tabulka 10 – Informace o nečistotě J

2.7.5 nečistota J		
název: (2 <i>RS</i>)-2-[4-(2-methylpropanoyl)fenyl]propanová kyselina [33]		
 <p>a enantiomer</p>	Registrační číslo CAS	65813-55-0
	Molekulová hmotnost	220,27
	m/z sledované v MS	233
		119
		359
	Nečistota J je produktem oxidačního procesu probíhajícího na základní struktuře IBU. Jedná se o bílou pevnou látku ve formě prachu, jejíž teplota tání je 85–87 °C. Používaným názvem je také 1-oxo ibuprofen. V literatuře se pro ni běžně používá zkratka BOPA. [38, 40]	

3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

- otestovat vybrané kolony s IL jako stacionární fází na modelovém vzorku IBU a jeho čtyř lékopisných nečistot a porovnat získané výsledky s výsledky na koloně s konvenční stacionární fází (deriváty iBCF i HFBCF)
- pokusit se popsat a vysvětlit mechanismy, které hrají roli při separaci těchto analytů na použitých kolonách (deriváty iBCF i HFBCF)
- pokusit se optimalizovat podmínky metody na jednotlivých kolonách (pouze deriváty iBCF)
- vyzkoušet možnosti extrakce derivátu IBU do nepolární fáze (pouze deriváty iBCF)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie, přístroje a příslušenství

Chemikálie

Ibuprofen – p.a., Sigma, USA

Acetonitril – 99,9 %, Sigma-Aldrich, USA

Pyridin – p.a., Penta, ČR

Isobutanol – pfa (99,5%), Reachim, Rus. fed.

Isobutylchloroformiát – 98 %, Aldrich, St. Louis, Maďarsko

2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutan-1-ol – 98 %, Aldrich Chemistry, Rus. fed.

2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutylchloroformiát – 99 %, Aneclab s.r.o., ČR

Isooktan – pro UV spektroskopii, Lachema n.p., ČR

N-hexan – p.a., Balex, ČR

Voda upravená reverzní osmózou – MilliQ RG, Millipore, USA

Chlorid sodný – č., Penta, ČR

Síran sodný – č., Penta, ČR

Síran hořečnatý – p.a., Penta, ČR

(2*RS*)-2-(4-butylfenyl)propanová kyselina (nečistota B)– Ph.Eur. referenční standard, EDQM, Francie

4-isobutylacetofenon (nečistota E) – 98 %, Lancaster, UK

3-(4-(2-methylpropyl)fenyl)propanová kyselina (nečistota F) – lékopisná nečistota F IBU, sekundární farmaceutický standard, certifikovaný referenční materiál, Sigma-Aldrich

(2*RS*)-2-(4-(2-methylpropanoyl)fenyl)propanová kyselina (nečistota J) – lékopisná nečistota J IBU, referenční standard dle lékopisu Spojených států amerických (USP), Sigma-Aldrich

Isopropanol – 99,9 %, Lichrosolv, Německo

Přístroje

analytické váhy – Sartorius, Sartorius AG, Německo

ultrazvuková lázeň – K 10, Kraittek, Slovensko

třepačka – P-LAB, WX Vortex, Velp scientifica, Itálie

plynový chromatograf – GC-2010 Shimadzu, Shimadzu Corporation, Japonsko

hmotnostní spektrometr – GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu Corporation, Japonsko

Počítačové programy

GCMSsolution Version 2.70, Shimadzu Corporation

ChemDraw Professional 17.1, PerkinElmer

Chromatografické kolony

HP-5ms Ultra Inert, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , Agilent JaW GC Columns, USA

SLB-IL59 Capillary GC Column, 30 m x 0,25 mm x 0,2 μm , Supelco, USA

SLB-IL61 Capillary GC Column, 30 m x 0,25 mm x 0,2 μm , Supelco, USA

SLB-IL76 Capillary GC Column, 30 m x 0,25 mm x 0,2 μm , Supelco, USA

Další pomůcky

kádinky, pipety, pipetíky, automatické pipety a špičky, zkumavky, vialky s víčky a septy, eppendorfky, odměrné baňky, zátky, laboratorní lžičky, injekční stříkačka s jehlou, pomůcky k výměně kolon, nitrilové ochranné rukavice, digestoř

4.2 Příprava roztoků

Reakční směs pro iBCF se připravila v odměrné baňce o objemu 25 ml, smísením 1 ml iBOH a 2 ml pyridinu a doplněním ACN po rysku.

Reakční směs pro HFBCF se připravila v odměrné baňce o objemu 25 ml, smísením 1 ml HFBOH a 2 ml pyridinu a doplněním ACN po rysku.

Roztok IBU (1 mg/ml) byl připraven navážením 5,16 mg IBU do zkumavky a přidáním 5,16 ml ACN.

Roztok nečistoty E byl připraven v 10ml odměrné baňce smísením 10 μ l nečistoty E a doplněním po značku ACN.

Z **nečistoty B, F a BOPA** byly připraveny jednotlivé ACN roztoky o koncentraci 1 mg/ml.

Vodné roztoky solí použité k pokusům s vysolováním:

- *NaCl nasycený roztok (asi 26,5%)*
Ve zkumavce bylo v 5 ml vody rozpuštěno 1,80 g NaCl.
- *NaCl nenasycený roztok (asi 21,3%)*
Ve zkumavce bylo v 5 ml vody rozpuštěno 1,35 g NaCl.
- *Na₂SO₄ nasycený roztok (asi 16,1%)*
Ve zkumavce bylo v 5 ml vody rozpuštěno 0,96 g Na₂SO₄.
- *Na₂SO₄ nenasycený roztok (asi 12,6%)*
Ve zkumavce bylo v 5 ml vody rozpuštěno 0,72 g Na₂SO₄.
- *MgSO₄ nasycený roztok (asi 27,2%)*
Ve zkumavce bylo v 5 ml vody rozpuštěno 1,87 g MgSO₄.
- *MgSO₄ nenasycený roztok (asi 21,9%)*
Ve zkumavce bylo v 5 ml vody rozpuštěno 1,40 g MgSO₄.

4.3 Příprava vzorků

Příprava vzorků se prováděla mikropipetami, s iBCF, HFBCF, reakční směsí a nečistotou E bylo nutné pracovat v digestoři a používat gumové ochranné rukavice.

Vzorek základní

Do vialky se vpravilo 10 μl roztoku IBU, poté se přidalo 500 μl reakční směsi pro iBCF a nakonec 5 μl iBCF. Vialka se uzavřela víčkem se septem. Následovala 1 minuta v ultrazvukové lázni.

Vzorek pro vytřepávání

Do eppendorfky se vpravilo 10 μl roztoku IBU, poté se přidalo 500 μl reakční směsi pro iBCF a nakonec 5 μl iBCF. Eppendorfka se uzavřela a následovala 1 minuta v ultrazvukové lázni. Poté se eppendorfka osušila, opatrně otevřela a mikropipetou se přidalo 600 μl isooktanu (ISOO) (nebo 600 μl hexanu (HEX) – dle toho který vzorek se připravoval). Po uzavření víčkem se provedlo třepání na třepačce 1 minutu při 8 rpm \times 100. Následovalo otevření eppendorfky a odpipetování horní fáze (ISOO nebo HEX) a dolní fáze (reakční směs) zvlášť do vialek.

Vzorek pro vytřepávání s vodou

Do eppendorfky se vpravilo 10 μl roztoku IBU, poté se přidalo 500 μl reakční směsi pro iBCF a nakonec 5 μl iBCF. Eppendorfka se uzavřela a následovala 1 minuta v ultrazvukové lázni. Poté se eppendorfka osušila, opatrně otevřela a mikropipetou se přidalo 600 μl ISOO (nebo 600 μl HEX – záleží který vzorek se připravoval) a voda (v pokusech se používalo různé množství: 100 μl , 200 μl , 300 μl , 600 μl , 3000 μl). Po uzavření víčkem se provedlo třepání na třepačce 1 minutu při 8 rpm \times 100. Následovalo otevření eppendorfky a odpipetování horní fáze (ISOO nebo HEX) a dolní fáze (reakční směs s vodou) zvlášť do vialek.

Vzorek pro vytřepávání s přídatkem vodného roztoku soli

Do eppendorfky se vpravilo 10 μl roztoku IBU, poté se přidalo 500 μl reakční směsi pro iBCF a nakonec 5 μl iBCF. Eppendorfka se uzavřela a následovala 1 minuta v ultrazvukové lázni. Poté se eppendorfka osušila, opatrně otevřela a mikropipetou se přidalo 600 μl ISOO a 300 μl roztoku soli (NaCl nebo Na₂SO₄ nebo MgSO₄; nasyceného či nenasyceného – dle pokusu). Po uzavření víčkem se provedlo třepání na třepačce

1 minutu při 8 rpm×100. Následovalo otevření eppendorfky a odpipetování horní fáze (ISOO nebo HEX) zvlášť do vialky.

Vzorky pro testování stability

Do vialky se vpravilo 7, 10 nebo 20 µl roztoku IBU, poté se přidalo 500 µl reakční směsi pro iBCF a nakonec 5 µl iBCF. Vialka se uzavřela víčkem se septem. Následovala 1 minuta v ultrazvukové lázni. Poté se do vialky přidalo 200 µl roztoku nečistoty E.

Vzorky pro sestrojení kalibrační křivky

Vzorky pro kalibrační křivku se připravovaly v podstatě stejně jako je výše popsáný Vzorek základní. Měnily se pouze objemy použitého roztoku IBU, ACN a případně i objemy použité reakční směsi (tabulka 11).

Tabulka 11 – Příprava vzorků – kalibrační křivka

číslo vzorku	roztok IBU	ACN	reakční směs	iBCF	ultrazvuková lázeň
vz. 1	2 µl	8 µl	500 µl	5 µl	1 min
vz. 2	3 µl	7 µl	500 µl	5 µl	1 min
vz. 3	4 µl	6 µl	500 µl	5 µl	1 min
vz. 4	5 µl	5 µl	500 µl	5 µl	1 min
vz. 5	6 µl	4 µl	500 µl	5 µl	1 min
vz. 6	7 µl	3 µl	500 µl	5 µl	1 min
vz. 7	8,5 µl	1,5 µl	500 µl	5 µl	1 min
vz. 8	10 µl	0 µl	500 µl	5 µl	1 min
vz. 9	15 µl	0 µl	495 µl	5 µl	1 min
vz. 10	20 µl	0 µl	490 µl	5 µl	1 min

Vzorek derivátů iBCF – IBU s nečistotami B, E, F, J

Do vialky se vpravily 4 µl roztoku IBU, 4 µl nečistoty B, 4 µl nečistoty E, 4 µl nečistoty F, 4 µl nečistoty J. Poté se přidalo 490 µl reakční směsi pro iBCF a nakonec 5 µl iBCF. Vialka se uzavřela víčkem se septem. Následovala 1 minuta v ultrazvukové lázni.

Vzorek derivátů HFBCF – IBU s nečistotami B, E, F, J

Do vialky se vpravily 4 μl roztoku IBU, 4 μl nečistoty B, 4 μl nečistoty E, 4 μl nečistoty F, 4 μl nečistoty J. Poté se přidalo 490 μl reakční směsi pro HFBCF a nakonec 5 μl HFBCF. Vialka se uzavřela víčkem se septem. Následovala 1 minuta v ultrazvukové lázni.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Vytřepávání analytů do nepolární fáze

V této práci jsme se nejprve pokusili o převedení derivátů do nepolární fáze. Důvodem byla snaha o odstranění pyridinu a zbytků alkylchloroformiátů ze vzorku, jelikož mohou působit zhoubně na kolonu i stříkačku, a do nepolární fáze by, na rozdíl od derivátů, neměly přecházet. [41]

Pro tyto pokusy jsme používali modelové vzorky obsahující jako analyt pouze IBU-i, výše popsané jako Vzorek pro vytřepávání, Vzorek pro vytřepávání s vodou a Vzorek pro vytřepávání s přidavkem vodného roztoku soli.

Přestože se v literatuře uvádí, že vytřepávání derivátů do nepolární fáze by mělo být snadné [31], naše pokusy s vytřepáváním do samotného ISOO neměly dobrou výtěžnost – v průměru do 65 %. Rozhodli jsme se proto pokusy upravit a ve snaze vytrapat deriváty do nepolární fáze jsme nakonec vyzkoušeli několik různých variant:

- vytřepávání do ISOO
- vytřepávání do HEX
- vytřepávání do ISOO s přidavkem vodného roztoku soli (vysolování)
- vytřepávání do ISOO s přidavkem vody
- vytřepávání do HEX s přidavkem vody
- vytřepávání do ISOO při změně postupu přípravy vzorku
- vytřepání a odpaření nepolární fáze pod proudem dusíku a doplnění ACN

Odpaření ISOO nebo HEX fáze pod proudem dusíku a následné doplnění vialky ACN po značku nepřineslo žádné výhody, naopak výtěžek IBU-i byl velmi malý – do 14 %, při změně postupu přípravy vzorku, kdy se iBCF do vzorku přidal už smíšený s ISOO jsme v chromatogramu nenalezli pík analytu. Při pokusu, kdy se ISOO přidal ke vzorku ještě před aplikací ultrazvuku jsme dosáhli převedení 60,1 % derivátu do ISOO fáze.

Výsledky dalších pokusů jsou uvedeny v následujících tabulkách:

Tabulka 12 – Vytřepávání s různým množstvím přidané vody

typ vzorku	množství přidané vody [μl]	procenta derivátu ve vrstvě [%]
nevytřepávaný vzorek bez vody		100
vytřepávání do 600 μl HEX	0	57,3
	100	72,6
	200	72,1
vytřepávání do 600 μl ISOO	0	52,1
	100	64,6
	200	64,6
	300	48,7
	600	38,3
	3000	28,7

Z výsledků v tabulce 12 jsme usoudili, že přidavek určitého množství vody zvyšuje výtěžnost vytřepávání. Důvodem je, že IBU-i by měl být ve vodě nerozpustný a měl by tedy přecházet z polární (vodné) fáze do fáze nepolární (ISOO nebo HEX). Je ale nutné počítat s tím, že pyridin a ACN, které jsou v reakční směsi vzorku, jsou s vodou mísitelné. Pravděpodobně se nám nepodařilo IBU-i extrahovat do nepolární fáze kvantitativně proto, že vodná fáze nebyla tvořena pouze vodou (ve které je IBU nerozpustný), ale také ACN (ve kterém je IBU rozpustný) a pyridinem.

Nejlepší výtěžnost vytřepávání zde byla u pokusů s přídatkem 100 μl vody.

Dále jsme se pokusili zvýšit výtěžnost extrakce přidáním roztoku soli (vysolování) (tabulka 13), což by mělo vést ke snížení rozpustnosti IBU-i v polární fázi a k jeho snadnějšímu převedení do fáze nepolární.

Tabulka 13 – Vytřepávání s přidavkem vodného roztoku soli

typ vzorku	roztok použitý k vysolování (koncentrace)	procenta derivátu ve vrstvě [%]
nevytřepávaný a nevysolovaný vzorek		100
vytřepávání do 600 µl ISOO	NaCl nasycený roztok (asi 26,5%)	42,2
	NaCl nenasycený roztok (asi 21,3%)	38,6
	Na ₂ SO ₄ nasycený roztok (asi 16,1%)	40,8
	Na ₂ SO ₄ nenasycený roztok (asi 12,6%)	34,4
	MgSO ₄ nasycený roztok (asi 27,2%)	39,7
	MgSO ₄ nenasycený roztok (asi 21,9%)	44,9

Bohužel vytřepávání s přidavkem vodného roztoku soli neposkytovalo lepší výsledky než vzorek nevytřepávaný a rozdíl mezi jednotlivými solemi a jejich nasycenými a nenasycenými roztoky nebyl významný.

Dále jsme se rozhodli pokračovat s pokusy s vytřepáváním do ISOO a HEX bez vody, které byly popisovány v literatuře [42] a s pokusy s vytřepáváním do ISOO a HEX s přidavkem 100 µl vody, které se nám jevily jako nejlepší. Tyto pokusy jsme opakovali v rámci testování různých kolon, i když nepředpokládáme, že by změna kolony měla vliv na výtěžnost vytřepávání (tabulka 14).

Tabulka 14 – Vytřepávání do isooktanu a hexanu s nebo bez přídavku 100 µl vody

kolony		SLB-IL			průměr [%]	HP-5ms UI *
		59	61	76		
typ vzorku	typ fáze	procenta derivátu ve vrstvě			průměr [%]	procenta derivátu ve vrstvě
nevytřepávaný vzorek		100	100	100		100
vytřepávání do 600 µl ISOO	nepolární fáze	79,4	63,2	52,1	64,9	40,8
	polární fáze	61,9	50,4	51,6	54,6	36,2
vytřepávání do 600 µl HEX	nepolární fáze	54,5	51,3	57,3	54,4	42,9
	polární fáze	43,2	48,3	41,1	44,2	43,6
vytřepávání do 600 µl ISOO + 100 µl vody	nepolární fáze	114,2	81,2	64,6	86,7	48,7
	polární fáze	27,5	18,1	20,7	22,1	4,0
vytřepávání do 600 µl HEX + 100 µl vody	nepolární fáze	78,9	98,0	82,5	86,4	nehodnoceno**
	polární fáze	14,6	17,0	14,5	15,4	nehodnoceno**

* Pokusy s vytřepáváním byly provedeny na koloně HP-5ms Ultra Inert ještě před tím, než přístroj prošel servisním úkonem. Je tedy možné že tím byly výsledky ovlivněny, a z tohoto důvodu nebyly zahrnuty do průměru.

** nebyl nalezen pik analytu

V těchto pokusech jsme stanovovali i množství zbylého IBU-i v polární fázi. Součet výtěžků z polární a nepolární fáze pocházející z jednoho vzorku většinou nedával dohromady přesně 100 % a ve většině případů zůstávalo nezanedbatelné množství IBU-i v polární vrstvě. Mimo to pokusy nebyly příliš opakovatelné. Vzorky jsme se snažili analyzovat co nejdříve po přípravě, protože jsme zjistili, že se HEX a částečně i ISOO fáze rychle odpařují.

Z hodnot v tabulce 14 je patrné, že se podařilo posunout výtěžnost k nepolární fázi, přičemž lépe vycházely pokusy s přídavkem vody. Nejlepší výsledky z vytřepávaných pokusů poskytoval vzorek s vytřepáváním do HEX s přídavkem 100 µl vody a vzorek s vytřepáváním do ISOO s přídavkem 100 µl vody (u něj jsme ovšem pozorovali horší opakovatelnost a součet výtěžků z polární a nepolární fáze se pohyboval ve větším rozmezí od 100 %).

Obecně lze říci, že by bylo vhodné deriváty vytřepat do nepolární fáze, ale je potřeba zvážit ztráty, špatnou výtěžnost a opakovatelnost, což by se však mohlo zlepšit s použitím vnitřního standardu.

Ačkoli se tedy v literatuře uvádí, že by deriváty měly do nepolárního rozpouštědla přecházet snadno, nepodařilo se nám vytřepávání optimalizovat natolik, abychom byli s výsledkem spokojeni.

Proto jsme v dalších pokusech používali vzorky bez vytřepávání, které mimo analytů obsahovaly také reakční směs s pyridinem a zbytky alkylchloroformiátů. U IL kolon jsme nepozorovali ovlivnění výsledků, pouze u kolony HP-5ms Ultra Inert jsme pozorovali „krvácení“ kolony, ale nejsme si jisti, zda to bylo způsobeno použitím vzorků s obsahem pyridinu a zbytků alkylchloroformiátů nebo vlivem něčeho jiného.

5.2 Stabilita vzorků

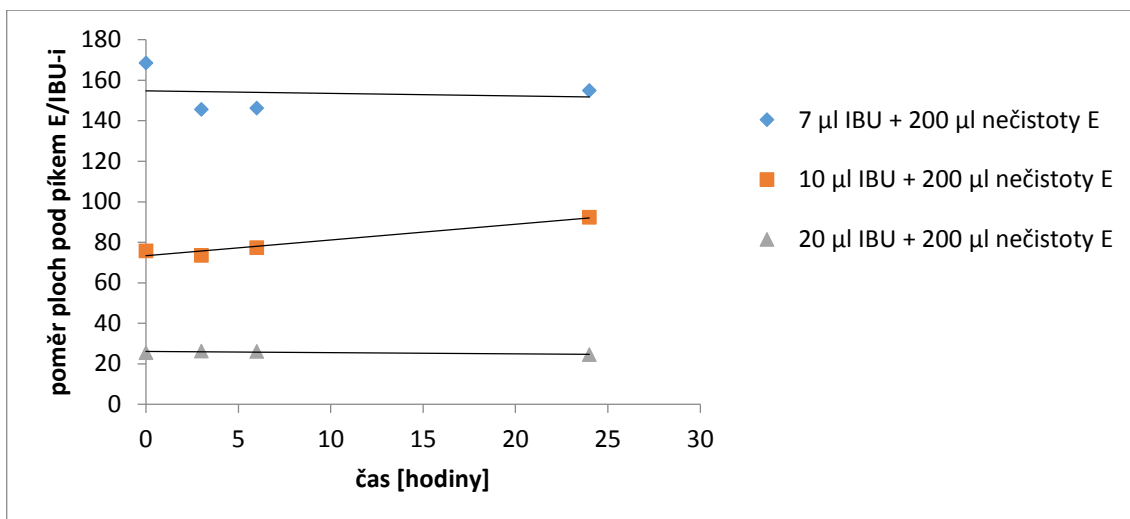
Protože měření ze začátku vycházely nelineárně (před servisním úkonem), rozhodli jsme se otestovat stabilitu vzorků.

Stabilita vzorků byla testována na modelových vzorcích IBU-i s nečistotou E, výše popsaných jako Vzorky pro testování stability.

Byly připraveny tři různé vzorky obsahující IBU-i (ze 7 μ l, 10 μ l a 20 μ l roztoku IBU) a nečistotu E (vždy 200 μ l), která sloužila podobně jako vnitřní standard.

Jeden tento vzorek jsme změřili v průběhu jedné hodiny třikrát za sebou, následně jsme stejným způsobem změřili i druhý a třetí vzorek. Tento postup jsme ještě třikrát zopakovali (tzn. vzorky byly měřeny v čase 0, 3, 6 a 24 hodin).

Ze získaných dat jsme vypočítali průměr poměrů ploch pod píkem nečistoty E ku IBU-i pro jednotlivé trojice měření – zvlášť pro každý vzorek a zvlášť pro každý čas, čímž jsme dostali dvanáct hodnot, které jsme vynesli do grafu (obrázek 10).



Obrázek 10 – Stabilita vzorků v čase

Z výsledků pokusu jsme sledovali spíše nahodilé kolísání hodnot způsobené asi přesností metody a nepozorovali jsme konkrétní zřetelné tendence v rámci jednoho dne.

Z výsledků vyplývá že derivát iBCF (IBU-i) je poměrně stálý, a že poměr ploch pod píkem nečistoty E ku IBU-i je v rozmezí 24 hodin relativně stálý, podle očekávání nejlépe vycházel vzorek obsahující 20 µl IBU-i a 200 µl nečistoty E.

Z konkrétních ploch pod píkem je vidět, že se vzorky postupně odpařovaly a tím se zvyšovala jejich koncentrace. V tabulce 15 je znázorněno, jak průměrně vycházely plochy pod píkem u vzorku obsahujícího 7 µl IBU-i a 200 µl nečistoty E, ostatní vzorky vycházely v principu obdobně.

Tabulka 15 – Plochy pod píkem při testování stability vzorku

	plocha pod píkem (vzorek 7 µl IBU-i a 200 µl nečistoty E)	
	IBU-i	nečistota E
čas 0 hodin	32066	5389542
čas 3 hodin	39356	5722980
čas 6 hodin	38369	5650526
čas 24 hodin	44588	6888824

Spočítali jsme také relativní směrodatné odchylky u měření jednotlivých vzorků v daných časových intervalech (tabulka 16).

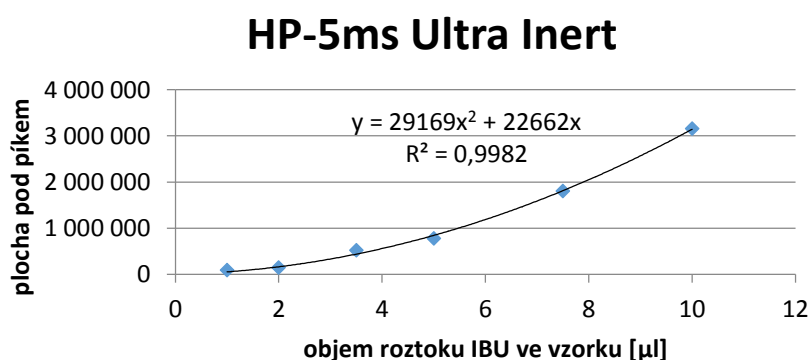
Tabulka 16 – Relativní směrodatné odchylky měření jednotlivých vzorků

vzorek	Relativní směrodatná odchylka [%]			
	čas 0 hodin	čas 3 hodiny	čas 6 hodin	čas 24 hodin
7 µl IBU	5,4	4,6	5,3	8,9
10 µl IBU	4,9	6,9	3,7	9,2
20 µl IBU	2,9	2,2	3,4	1,5

5.3 Linearita

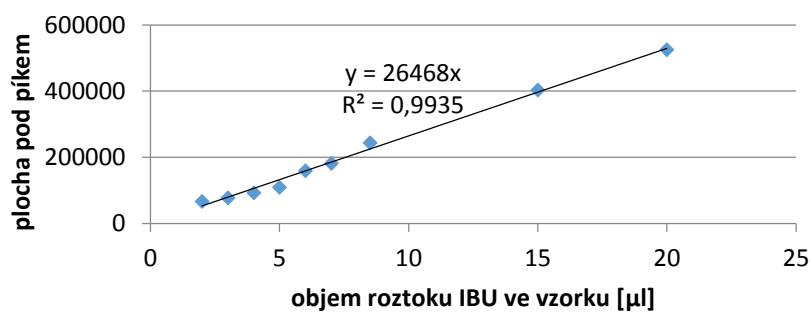
Od začátku práce jsme předpokládali, že je námi používaná metoda lineární, ale po zjištění, že součty výtřepků z polární a nepolární fáze vzorku dávaly dohromady hodnoty velmi vzdálené od 100 % jsme usoudili, že linearita možná nebude ideální. Následně jsme ji otestovali a zjistili jsme, že závislost byla spíše exponenciální (obrázek 11). Při pokusu o ověření limitu kvantifikace (LOQ) jsme přístroj kontaminovali natolik, že přestal fungovat. Po servisním úkonu (vyčištění ionizační komory) začaly vycházet výsledky mnohem lépe a metody již byly lineární. Pro jistotu jsme pak linearitu na všech kolonách vždy ověřovali. Ačkoli kalibrační křivky nevycházejí úplně přesně (důvodem je opakované používání kalibračních vzorků skladovaných za chladu), linearita je z nich zcela patrná (obrázky 12–15).

Pro ověření linearity jsme používali výše popsané Vzorky pro sestavení kalibrační křivky.



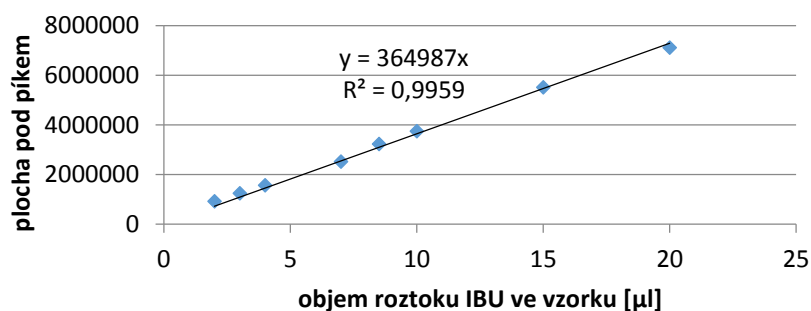
Obrázek 11 – Kalibrační křivka kolony HP-5ms Ultra Inert před servisním úkonem

HP-5ms Ultra Inert



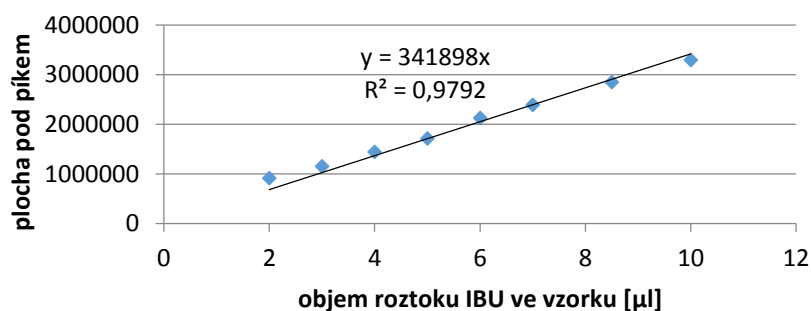
Obrázek 12 – Kalibrační křivka kolony HP-5ms Ultra Inert po servisním úkonu

SLB-IL59

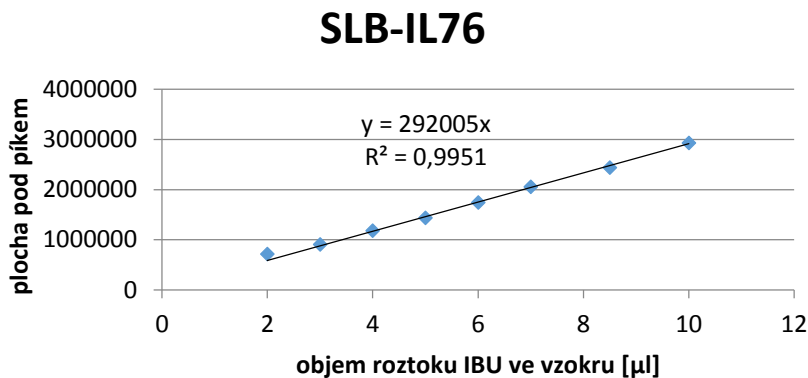


Obrázek 13 – Kalibrační křivka kolony SLB-IL59

SLB-IL61



Obrázek 14 – Kalibrační křivka kolony SLB-IL61



Obrázek 15 – Kalibrační křivka kolony SLB-IL76

5.4 Obecný popis retenčních mechanismů, které hrají roli při separaci pomocí plynové chromatografie

Na základě prostudovaných materiálů [26, 27, 43] jsme se pokusili vysvětlit mechanismy, které hrály roli při separaci našich modelových derivatizovaných vzorků IBU a jeho nečistot na čtyřech kolonách s různě polárními stacionárními fázemi. Na tomto místě uvádíme stručný obecný popis retenčních mechanismů a vlastností analytů, které hrají roli při separaci v GC.

Pořadí eluce látek v GC je z velké míry závislé na jejich těkavosti (tenzi par), která úzce souvisí s teplotou varu. Obecně se dá říct, že čím je sloučenina těkavější, tím nižší má teplotu varu a tím je kratší její retenční čas. Naopak, čím je sloučenina méně těkavá, tím má vyšší teplotu varu a její retenční čas je delší. [8, 43] Tato obecná skutečnost platí hlavně u nepolárních stacionárních fází, u polárních stacionárních fází ovlivňují retenční čas i další specifické interakce. [44]

Dalším jevem, který zasahuje do pořadí eluce látek je jejich lipofilita, kterou vyjadřuje logaritmus rozdělovacího koeficientu P ($\log P$). Čím má molekula vyšší hodnotu $\log P$, tím větší je její zadrž na nepolární koloně a její retenční čas je delší. U polárních kolon můžeme zkusit uvažovat o opačném jevu, tedy s rostoucí polaritou kolony mají menší zadrž analyty s větší hodnotou $\log P$ a jejich retenční čas se tedy zkracuje. [43]

Základní druhy interakcí analytů se stacionární fází jsou tři a jejich podíl na zadrži analytu se mění v závislosti na polaritě použité stacionární fáze [8, 43]:

- **disperzní interakce** – univerzální, primární retenční mechanismus, nepolární interakce, sloučeniny s nízkou tenzí par jsou zadržovány silněji [44]
- **interakce dipólů molekul** – jejich význam roste s rostoucí polaritou stacionární fáze, probíhají mezi stacionární fází a analyty s dipólovým momentem, molekula většinou obsahuje heteroatom, halogen, -OH skupinu, násobnou vazbu, ... [8, 44]
- **vodíkové vazby** – jejich podíl na zadrži analytu roste s rostoucí polaritou stacionární fáze, například silných vodíkových vazeb se stacionární fází jsou schopny -OH a -NH skupina; mírné vodíkové vazby jsou schopné estery, ethery a ketony; vodíkové vazby tvoří uhlovodíky a halogeny. [8, 44]

Další možné interakce mezi analytem a polární stacionární fází jsou například: π - π interakce nebo acidobazické interakce. [45]

Fenomén teplotního efektu

Při snaze vysvětlit retenční mechanismy jsme narazili na skutečnost, že čím větší byla polarita kolony, tím menší byl rozdíl v retenčním čase nečistoty E vůči retenčním časům derivátů. Důvod se nejspíše nacházel ve struktuře nečistoty E, která se vymyká ze skupiny ostatních použitých nečistot a IBU, jelikož nečistota E jako jediná z našich analytů neobsahuje karboxylovou skupinu, která by mohla podléhat derivatizaci (acylaci – v našem případě reakci s alkylchloroformiátem). Nečistota E tedy vždy zůstávala v našich pokusech jako jediná nederivatizovaná. Z chování látek jsme zjistili, že jsou určité interakce, které mají všechny deriváty navíc oproti nečistotě E (a všechny stejně silné, protože retenční časy, resp. vzdálenosti mezi píky derivátů byly poměrově stejné), a tyto interakce slábnou s rostoucí teplotou na polárnějších kolonách evidentně rychleji než jiné interakce, což způsobuje menší zádrž těchto derivátů na koloně. V literatuře je tento jev popisován jako fenomén teplotního efektu (popsaný v kapitole o IL jako stacionárních fázích v GC), kdy disperzní interakce slábnou na polárnějších kolonách s rostoucí teplotou rychleji než interakce dipól-indukovaný dipól. [26]

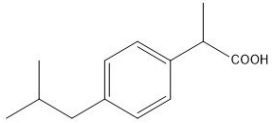
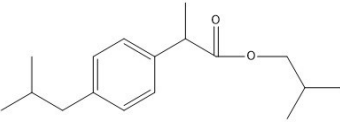
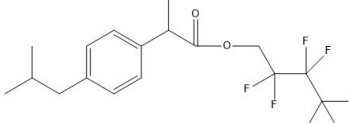
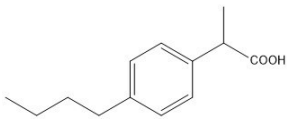
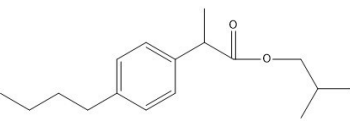
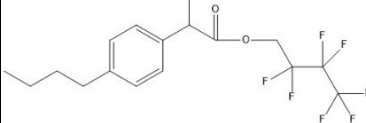
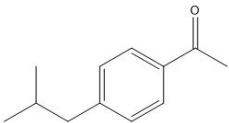
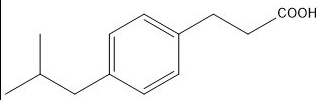
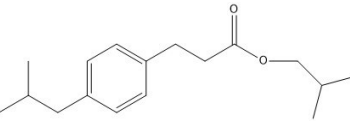
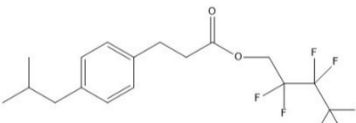
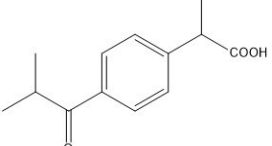
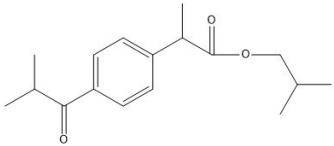
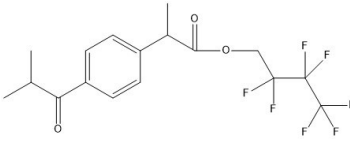
Dospěli jsme tedy k závěru, že tento jev způsoboval nejspíše isobutyl (případně 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutyl) na části molekuly vznikající při derivatizaci. Tento jev byl dobře pozorovatelný na vysoce polární koloně SLB-IL76, o něco hůře na méně polárních kolonách SLB-IL59 a SLB-IL61, a na koloně HP-5ms Ultra Inert, která je nepolární, jsme tento jev nepozorovali.

5.4.1 Tabulka ibuprofenu a jeho čtyř lékopisných nečistot a jejich derivátů

Následující tabulka (tabulka 17) ukazuje strukturu molekul IBU a jeho čtyř lékopisných nečistot a jejich iBCF a HFBCF derivátů spolu s jejich s hodnotami teplot varu a log P. Tato tabulka nám byla určitou pomůckou při pokusu o vysvětlení retenčních mechanismů, které hrály roli při separaci našich sloučenin na námi použitých kolonách (viz dále). Pro úplnost jsme do tabulky zahrnuli i nederivatizované sloučeniny, ačkoli samy jako takové v našich popisech retenčních mechanismů nevystupovaly.

Hodnoty teplot varu a log P v tabulce 17 byly získány predikcí v programu ChemDraw Professional 17.1 a absolutní hodnoty tedy nemusí přesně odpovídat skutečnosti, nicméně vzájemné vztahy mezi hodnotami pro jednotlivé sloučeniny by odpovídat měly.

Tabulka 17 - Ibuprofen a jeho čtyři lékopisné nečistoty a jejich deriváty

	Bez derivatizace	Deriváty iBCF	Deriváty HFBCF
IBU			
	teplota varu: 400,18 °C log P: 3,75	teplota varu: 403,97 °C log P: 5,24	teplota varu: 389,61 °C log P: 6,2
nečistota B			
	teplota varu: 400,62 °C log P: 3,84	teplota varu: 404,41 °C log P: 5,33	teplota varu: 390,05 °C log P: 6,29
nečistota E			
	teplota varu: 286,10 °C log P: 3		
nečistota F			
	teplota varu: 400,62 °C log P: 3,6	teplota varu: 404,41 °C log P: 5,09	teplota varu: 390,05 °C log P: 6,05
nečistota J			
	teplota varu: 454,05 °C log P: 2,63	teplota varu: 457,84 °C log P: 4,12	teplota varu: 443,48 °C log P: 5,08

5.5 Porovnání kolon pomocí modelového vzorku isobutylchloroformiátových derivátů ibuprofenu a jeho čtyř lékopisných nečistot

Nejprve jsme vyvinuli metodu pro rozdělení iBCF derivátů IBU a jeho čtyř lékopisných nečistot na koloně s konvenční nepolární stacionární fází, konkrétně se jednalo o kolonu HP-5ms Ultra Inert.

Tuto metodu jsme dále používali s mírnými úpravami (dle teplotního limitu kolon) jako srovnávací metodu pro všechny použité kolony a deriváty.

Pro tato měření jsme používali výše popsany Vzorek derivátů iBCF – IBU s nečistotami B, E, F, J.

Použité teplotní programy jsou uvedeny v tabulkách 18–21, výsledné chromatogramy jsou na obrázcích 16–19.

Stálé chromatografické podmínky:

GC:

Teplota termostatické pece: 80 °C

Teplota injektoru: 250 °C

Nosný plyn: Helium

Tlak plynu: 64,9 kPa

Celkový průtok plynu: 9,0 ml/min

Průtok plynu kolonou: 1,00 ml/min

Lineární rychlost: 36,8 cm/sec

Purge flow: 3,0 ml/min

Split: 5

MS:

Teplota iontového zdroje: 210 °C

Interface temperature: 250 °C

SCAN (m/z): 100,00–400,00

SIM (m/z): 233,00

161,00

163,00

262,00

117,00

119,00

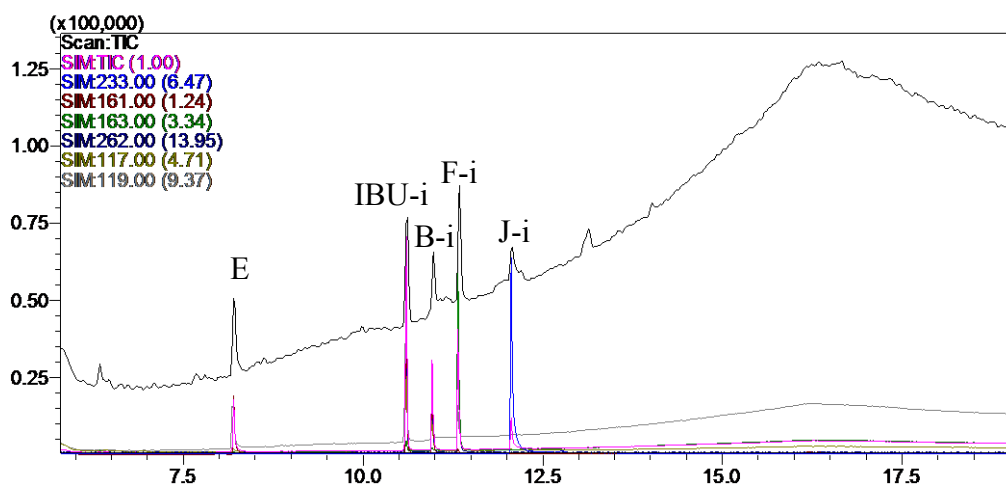
Proměnné chromatografické podmínky a výsledky měření:

kolona HP-5ms Ultra Inert

vlastnosti kolony: 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm; teplotní limit: 325/350 °C

Tabulka 18 – Teplotní program srovnávací metody pro HP-5ms Ultra Inert – deriváty iBCF

teplotní gradient [°C/min]	teplota [°C]	čas po který se udržovala teplota [min]
-	80	1,5
15	300	3



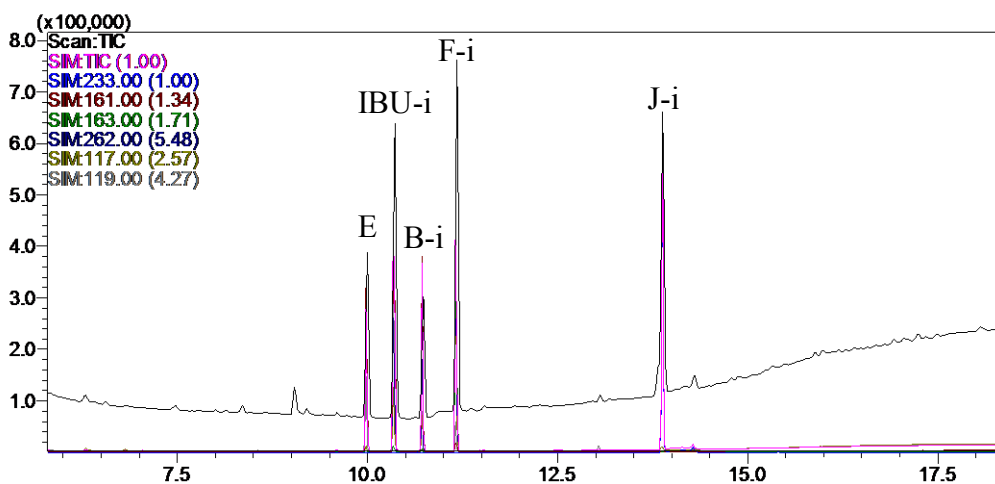
Obrázek 16 – Chromatogram srovnávací metody pro HP-5ms Ultra Inert – deriváty iBCF

kolona SLB-IL59

vlastnosti kolony: 30 m × 0,25 mm × 0,2 μm; teplotní limit: 300 °C

Tabulka 19 – Teplotní program srovnávací metody pro SLB-IL59 – deriváty iBCF

teplotní gradient [°C/min]	teplota [°C]	čas po který se udržovala teplota [min]
-	80	1,5
15	290	3



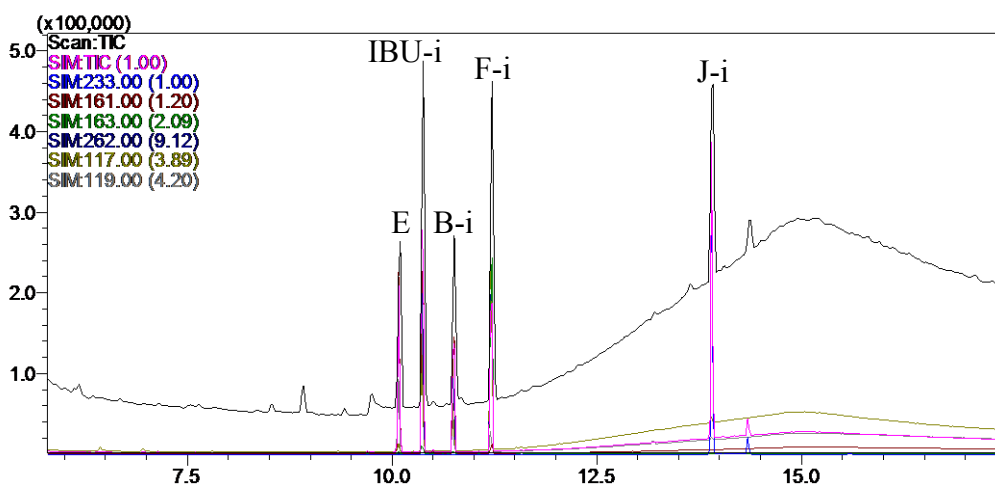
Obrázek 17 – Chromatogram srovnávací metody pro SLB-IL59 – deriváty iBCF

kolona SLB-IL61

vlastnosti kolony: 30 m × 0,25 mm × 0,2 μm; teplotní limit: 290 °C

Tabulka 20 – Teplotní program srovnávací metody pro SLB-IL61 – deriváty iBCF

teplotní gradient [°C/min]	teplota [°C]	čas po který se udržovala teplota [min]
-	80	1,5
15	280	3



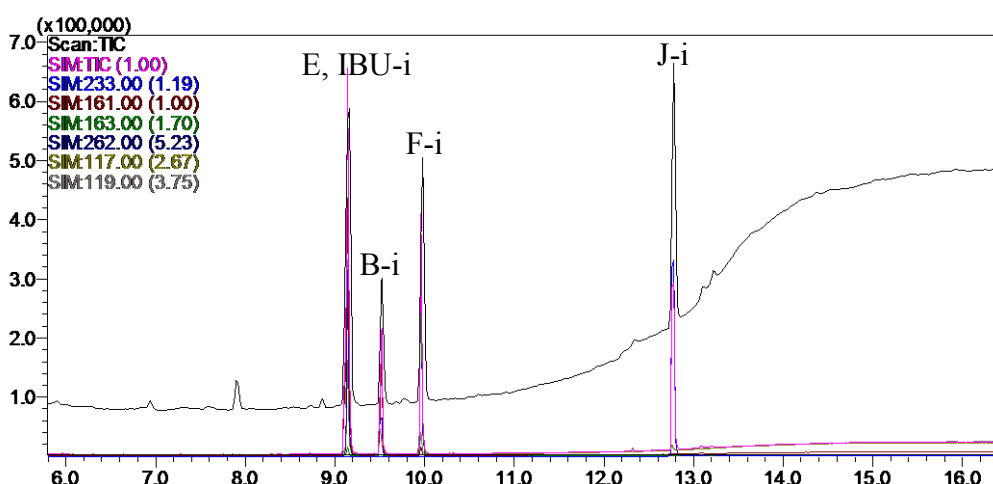
Obrázek 18 – Chromatogram srovnávací metody pro SLB-IL61 – deriváty iBCF

kolona SLB-IL76

vlastnosti kolony: 30 m × 0,25 mm × 0,2 μm; teplotní limit: 270 °C

Tabulka 21 – Teplotní program srovnávací metody pro SLB-IL76 – deriváty iBCF

teplotní gradient [°C/min]	teplota [°C]	čas po který se udržovala teplota [min]
-	80	1,5
15	260	3



Obrázek 19 – Chromatogram srovnávací metody pro SLB-IL76 – deriváty iBCF

5.5.1 Popis retenčních mechanismů

Retenční mechanismy na nepolární koloně (deriváty iBCF)

Testované látky jsou eluovány z kolony podle své stoupající teploty varu, tedy v pořadí nečistota E, IBU-i, nečistota B-i, F-i a J-i. Určitou roli v retenčních mechanismech hrají také hodnoty log P jednotlivých analytů, jelikož látky s vyšší hodnotou log P jsou na nepolárních kolonách zadržovány více než látky s hodnotou log P nižší.

Nečistota E, která jako jediná nepodléhá derivatizaci, má nejkratší retenční čas, protože má nejnižší teplotu varu a nejnižší hodnotu log P. IBU-i a nečistoty B-i a F-i mají podle výpočtů v softwaru ChemDraw Professional 17.1 velmi podobné teploty varu – liší se v rozmezí přibližně 0,5 °C. V databázi SciFinder jsme zjistili hodnotu teploty varu pro

derivát IBU-i, ale nečistota B-i ani F-i v tomto softwaru nebyla zanesená, nicméně vyjdeme-li z predikce na příkladu analogie ethylderivátů IBU, B a F, jejichž teplota varu stoupá následovně: IBU $304,3 \pm 11,0$ °C; B $309,4 \pm 11,0$ °C; F $312,3 \pm 11,0$ °C (software Advanced Chemistry development (ACD/Labs) verze 11.02), můžeme usuzovat, že IBU-i a nečistoty B-i a F-i se eluují v pořadí závislém na svých teplotách varu. Toto můžeme podpořit obecným tvrzením, že s větvením molekuly klesá teplota varu. Eluční pořadí IBU-i a nečistoty B-i bychom na nepolární koloně mohli vysvětlit také jejich hodnotami log P. Další možná hypotéza by mohla být, že nečistota F-i je schopná tvořit svou nestíněnou karbonylovou skupinou silnější interakce s 5 % fenylu ve stacionární fázi a zadržuje se tím na koloně o trochu déle než IBU-i a nečistota B-i, jejichž karbonylová skupina je stíněná. Nejdelsí retenční čas má nečistota J-i, jelikož má nejvyšší teplotu varu, ale její nižší hodnota log P způsobí, že rozdíl retenčních časů mezi nečistotami F-i a J-i bude menší než u IL kolon (viz dále).

Retenční mechanismy na IL kolonách v porovnání s nepolární kolonou (deriváty iBCF)

Pro separaci analytů na polárních IL kolonách platí v podstatě stejné principy jako na kolonách nepolárních. Látky jsou eluovány v pořadí závislém na jejich stoupající teplotě varu. Důležitá je možnost polárních interakcí karbonylových skupin analytů se stacionární fází tvořenou IL. Možnou roli v retenci analytů by mohly hrát také hodnoty jejich log P, jelikož na polárnějších kolonách by mohly způsobovat nižší hodnoty log P větší zádrž analytu.

U kolon s IL jako stacionární fází jsme pozorovali menší zádrž méně polárních analytů (IBU-i, nečistoty B-i a F-i) v porovnání s nepolární kolonou (tedy kratší retenční časy oproti nepolární koloně), a naopak větší zádrž analytů polárnějších (nečistoty E a J-i). Nicméně celá analýza proběhla nejrychleji na nepolární koloně HP-5ms Ultra Inert.

Důvod, proč má nečistota E nejkratší retenční čas a proč rozdíl mezi retenčním časem nečistoty E a IBU-i je na polárních kolonách menší, než na nepolární koloně můžeme vysvětlit tím, že má nečistota E ze všech analytů nejnižší teplotu varu, nejnižší hodnotu log P a nestíněnou karbonylovou skupinu, kterou může interagovat se stacionární fází. Retenční pořadí IBU-i, B-i a F-i můžeme vysvětlit pomocí jejich teplot varu, případně zde můžeme uvažovat o vlivu stíněných a nestíněných karbonylových skupin derivátů při interakcích se stacionární fází. U nečistoty F-i bychom případně mohli zvážit i vliv

nižšího log P. Skutečnost, že se nečistota J-i se eluuje jako poslední a rozdíl mezi retenčními časy F-i a J-i je větší, než na nepolární koloně můžeme vysvětlit tím, že nečistota J-i má z iBCF derivátů nejvyšší teplotu varu a obsahuje dvě karbonylové skupiny. Další možný efekt na retenci by teoreticky mohla mít její nízká hodnota log P.

S rostoucí polaritou kolony sílí také fenomén teplotního efektu, který se na koloně SLB-IL76 při srovnávací metodě podílel na koeluci nečistoty E a IBU-i (zde však i vliv teplotního gradientu metody).

5.6 Porovnání kolon pomocí modelového vzorku derivátů 2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutylchloroformiátu

Srovnávací metodu jsme použili i pro analýzu HFBCF derivátů IBU a jeho nečistot.

Pro tato měření jsme používali výše popsany Vzorek derivátů HFBCF – IBU s nečistotami B, E, F, J.

Chromatografické podmínky zde zůstaly téměř stejné jako u původní srovnávací metody, změnil se ale dvě sledované hodnoty m/z (SIM).

Použité teplotní programy jsou uvedeny v tabulkách 22–25, výsledné chromatogramy jsou na obrázcích 20–23.

Stálé chromatografické podmínky:

GC:

Teplota termostatické pece: 80 °C

Teplota injektoru: 250 °C

Nosný plyn: Helium

Tlak plynu: 64,9 kPa

Celkový průtok plynu: 9,0 ml/min

Průtok plynu kolonou: 1,00 ml/min

Lineární rychlost: 36,8 cm/sec

Purge flow: 3,0 ml/min

Split: 5

MS:

Teplota iontového zdroje: 210 °C

Interface temperature: 250 °C

SCAN (m/z): 100,00–400,00

SIM (m/z): 359,00

161,00

163,00

388,00

117,00

119,00

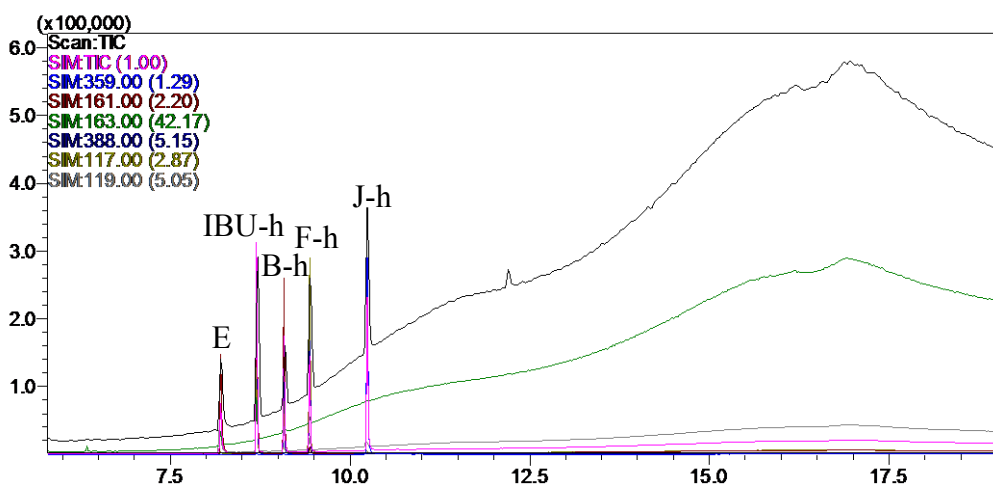
Proměnné chromatografické podmínky a výsledky měření:

kolona HP-5ms Ultra Inert

vlastnosti kolony: 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm; teplotní limit: 325/350 °C

Tabulka 22 – Teplotní program srovnávací metody pro HP-5ms Ultra Inert – deriváty HFBCF

teplotní gradient [°C/min]	teplota [°C]	čas po který se udržovala teplota [min]
-	80	1,5
15	300	3



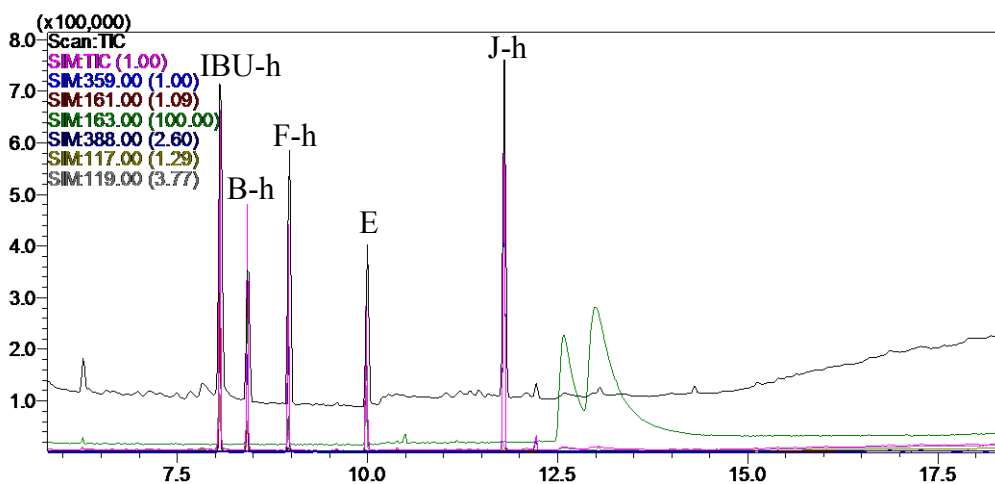
Obrázek 20 – Chromatogram srovnávací metody pro HP-5ms Ultra Inert – deriváty HFBCF

kolona SLB-IL59

vlastnosti kolony: 30 m × 0,25 mm × 0,2 μm; teplotní limit: 300 °C

Tabulka 23 – Teplotní program srovnávací metody pro SLB-IL59 – deriváty HFBCF

teplotní gradient [°C/min]	teplota [°C]	čas po který se udržovala teplota [min]
-	80	1,5
15	290	3



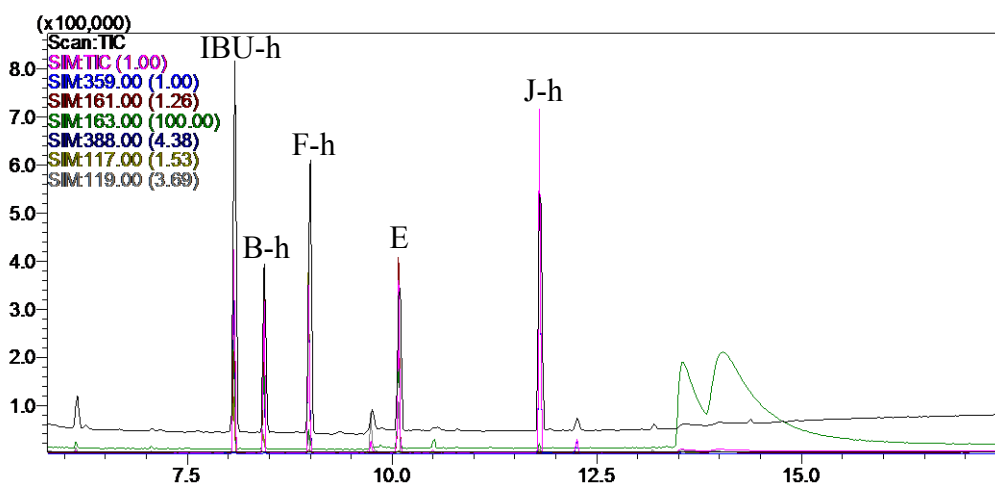
Obrázek 21 – Chromatogram srovnávací metody pro SLB-IL59 – deriváty HFBCF

kolona SLB-IL61

vlastnosti kolony: 30 m × 0,25 mm × 0,2 μm; teplotní limit: 290 °C

Tabulka 24 – Teplotní program srovnávací metody pro SLB-IL61 – deriváty HFBCF

teplotní gradient [°C/min]	teplota [°C]	čas po který se udržovala teplota [min]
-	80	1,5
15	280	3



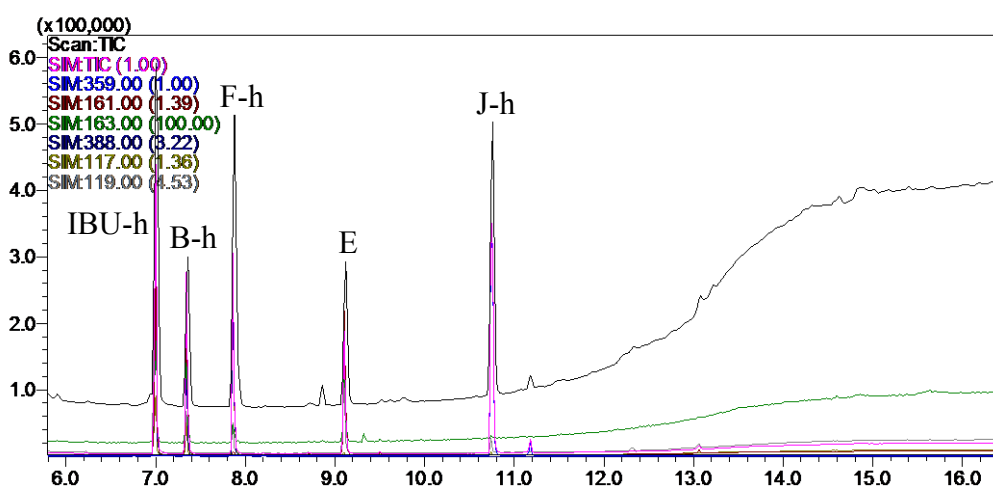
Obrázek 22 – Chromatogram srovnávací metody pro SLB-IL61 – deriváty HFBCF

kolona SLB-IL76

vlastnosti kolony: 30 m × 0,25 mm × 0,2 μm; teplotní limit: 270 °C

Tabulka 25 – Teplotní program srovnávací metody pro SLB-IL76 – deriváty HFBCF

teplotní gradient [°C/min]	teplota [°C]	čas po který se udržovala teplota [min]
-	80	1,5
15	260	3



Obrázek 23 – Chromatogram srovnávací metody pro SLB-IL76 – deriváty HFBCF

5.6.1 Popis retenčních mechanismů

Retenční mechanismy na nepolární koloně (deriváty HFBCF)

Pro separaci analytů derivatizovaných HFBCF platí v podstatě stejné principy jako pro deriváty iBCF. Látky jsou eluovány podle své stoupající teploty varu a roli v retenci hrají také jejich hodnoty log P. Derivatizace pomocí HFBCF, a tedy zavedení atomů fluoru do molekuly analytu, způsobuje zvýšení hodnot log P, zvýšení těkavosti a z toho vyplývající snížení teploty varu derivátů. Nižší teplota varu způsobí, že se tyto deriváty eluují z kolony dříve než deriváty iBCF (platí také u IL kolon). Na druhou stranu se ale na nepolární koloně projeví vyšší hodnoty log P větší zádrží analytů. Ve výsledku mají derivatizované analyty na nepolární koloně kratší retenční časy než deriváty iBCF, ale

pořadí píků zůstává stejné. Nečistota E má ve vzorcích derivatizovaných iBCF i HFBCF stejné retenční časy (v rámci jedné kolony), protože derivatizaci nepodléhá.

Retenční mechanismy na IL kolonách v porovnání s nepolární kolonou (deriváty HFBCF)

Při separaci derivátů HFBCF na polárních IL kolonách platí v podstatě stejné principy jako na nepolární koloně. Důležitá je teplota varu analytů a možnost polárních interakcí karbonylových skupin analytů se stacionární fází tvořenou IL. Jako další aspekt, který by mohl ovlivňovat retenci analytů, můžeme zkusit zahrnout do úvahy hodnoty log P, které, pokud jsou vyšší, by mohly na polárnějších kolonách způsobovat menší zádrž analytu.

V důsledku polárních interakcí, které jsou silnější u nečistoty E a J-h oproti ostatním dochází k delší zádrži těchto analytů na polárních kolonách vůči koloně nepolární. Naopak IBU-h a nečistoty B-h a F-h mají na polárních kolonách kratší retenční časy než na koloně nepolární. Ve výsledku dochází ke změně elučního pořadí analytů oproti pokusu na nepolární koloně na: IBU-h, nečistoty B-h, F-h, E a J-h. Nicméně celá analýza proběhla opět nejrychleji na nepolární koloně HP-5ms Ultra Inert.

5.7 Optimalizace metody

Po provedení srovnávacích pokusů jsme se pro vzorky derivatizované pomocí iBCF pokusili optimalizovat separaci na jednotlivých kolonách.

Pro tato měření jsme používali výše popsany Vzorek derivátů iBCF – IBU s nečistotami B, E, F, J.

Při optimalizaci metod jsme zkoušeli manipulovat s teplotním gradientem, teplotou a časem, po který se udržovala teplota, a s nástřikovou teplotou.

Z dílčích (pomocných) pokusů jsme zjistili, že počáteční teplota a čas, po který se udržovala počáteční teplota sice ovlivňují retenční časy analytů, ale neovlivňují, při jaké teplotě kolony se analyt eluuje. Teplotní gradient ovlivňoval retenční časy analytů i teplotu kolony, při které se analyt eluoval. Při manipulaci s nástřikovou teplotou se neměnil retenční čas analytů ani teplota kolony, při které se analyty eluovaly.

Analyt tedy po vstupu na kolonu stagnoval až do dosažení určité teploty, a teprve poté se začal pohybovat kolonou dále ve směru toku nosného plynu. Nižší počáteční teplota a delší čas, po který se tato teplota udržovala, způsobovaly prodloužení retenčních časů všech analytů.

Pro dosažení optimálního výsledku jsme kombinovali většinou co nejvyšší počáteční teplotu a co nejnižší čas, po který se tato teplota udržovala. V případech, kdy ale takto upravená metoda poskytovala podstatně širší píky, jsme raději zvolili nižší počáteční teplotu či delší čas, po který se tato teplota udržovala.

S teplotním gradientem jsme manipulovali dle potřeby.

U kolony SLB-IL76 bylo potřeba rozlišit píky nečistoty E a IBU-i, které koeluovaly. Proto jsme volili nejdříve malý teplotní gradient, kterým jsme dosáhli rozdělení těchto dvou píků a následně jsme teplotní gradient zrychlili, aby se snížil retenční čas nečistoty J-i a tím i celková doba analýzy.

U kolon SLB-IL59 a SLB-IL61 jsme nemuseli řešit koeluci píků, ale bylo potřeba zkrátit retenční čas nečistoty J-i, proto jsme v průběhu metody zvýšili hodnotu teplotního gradientu.

U kolony HP-5ms Ultra Inert nebylo potřeba řešit koeluci píků a ani výrazně zkracovat retenční čas nečistoty J-i (oproti ostatním kolonám). Proto jsme volili jednokrokový teplotní gradient rovnou vyšší.

U nečistoty J-i jsme při snaze zkrátit retenční čas pomocí teplotního gradientu narazili na technické omezení – teplotní limit kolony.

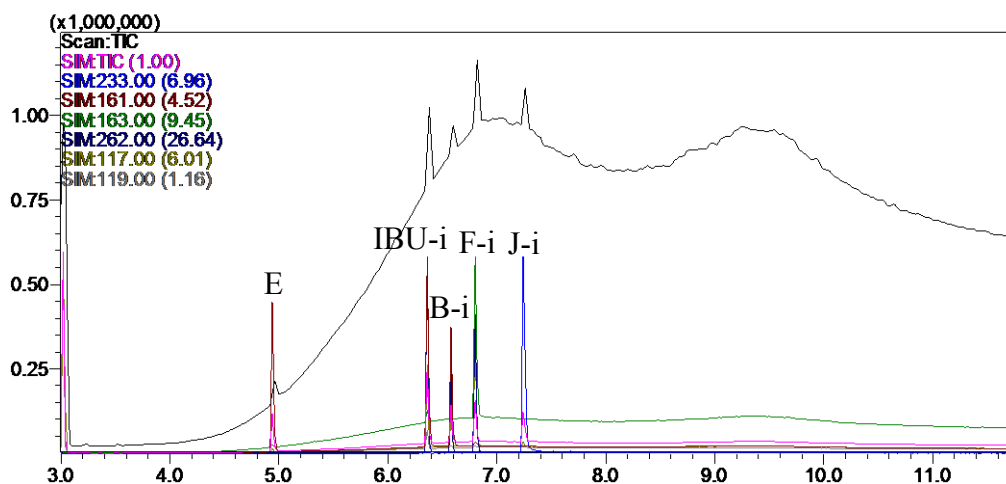
Použité teplotní programy optimalizovaných metod jsou uvedeny v tabulkách 26–29, výsledné chromatogramy jsou na obrázcích 24–27.

HP-5ms Ultra Inert

vlastnosti kolony: 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm; teplotní limit: 325/350 °C

Tabulka 26 – Teplotní program optimalizované metody pro HP-5ms Ultra Inert

teplotní gradient [°C/min]	teplota [°C]	čas po který se udržovala teplota [min]
-	80	0
25	260	3



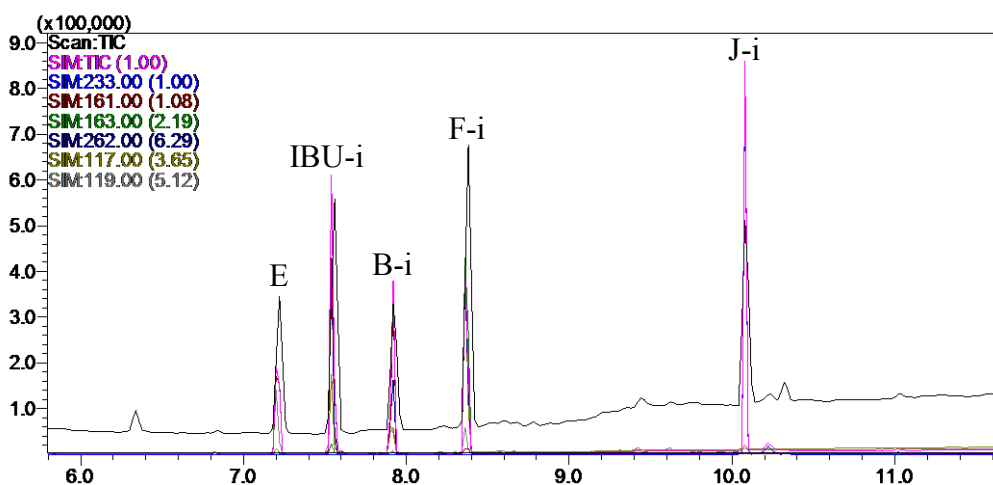
Obrázek 24 – Chromatogram optimalizované metody pro HP-5ms Ultra Inert

SLB-IL59

vlastnosti kolony: 30 m × 0,25 mm × 0,2 μm; teplotní limit: 300 °C

Tabulka 27 – Teplotní program optimalizované metody pro SLB-IL59

teplotní gradient [°C/min]	teplota [°C]	čas po který se udržovala teplota [min]
-	100	0
15	225	0
140	290	3



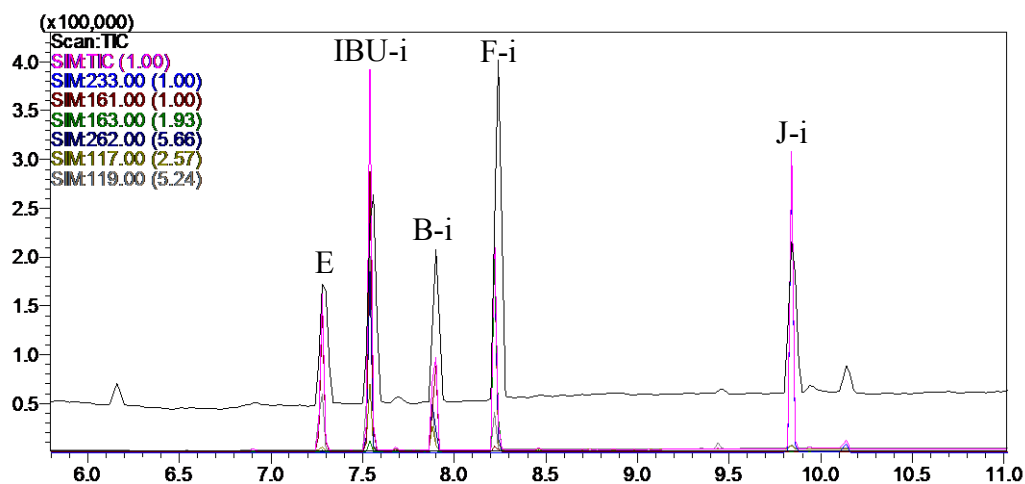
Obrázek 25 – Chromatogram optimalizované metody pro SLB-IL59

SLB-IL61

vlastnosti kolony: 30 m × 0,25 mm × 0,2 μm; teplotní limit: 290 °C

Tabulka 28 – Teplotní program optimalizované metody pro SLB-IL61

teplotní gradient [°C/min]	teplota [°C]	čas po který se udržovala teplota [min]
-	100	0
15	215	0
150	280	3



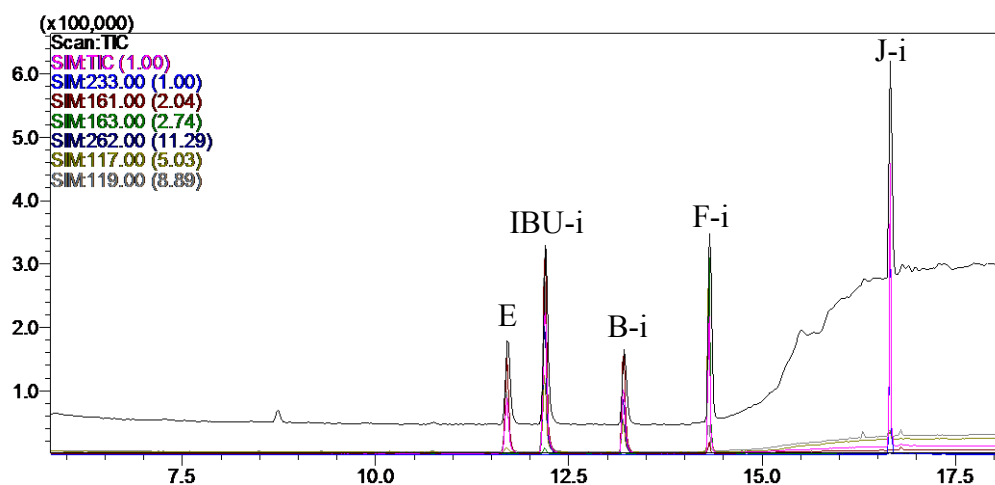
Obrázek 26 – Chromatogram optimalizované metody pro SLB-IL61

SLB-IL76

vlastnosti kolony: 30 m × 0,25 mm × 0,2 μm; teplotní limit: 270 °C

Tabulka 29 – Teplotní program optimalizované metody pro SLB-IL76

teplotní gradient [°C/min]	teplota [°C]	čas po který se udržovala teplota [min]
-	100	0
5	170	0
70	260	3



Obrázek 27 – Chromatogram optimalizované metody pro SLB-IL76

Dospěli jsme tedy k závěru, že metodu lze na všech kolonách optimalizovat tak, aby se separace uskutečnila nejdéle do 10,2 minuty, kromě kolony SLB-IL76, kde kvůli řešení koeluce píků vychází poslední analyt před 17. minutou.

Pokud bychom porovnali všechny vyzkoušené metody, nejlépe (nejkratší retenční časy, bez koeluce píků) vychází optimalizovaná metoda na koloně HP-5ms Ultra Inert. Nevýhodou této kolony je však její „krvácení“. Metody zkoušené na konvenční nepolární koloně patří obecně k těm nejlepším, které jsme naměřili, důvodem je ale nejspíše skutečnost, že na této koloně jsme začínali a srovnávací metodu, kterou jsme pak používali na další kolony a pokusy, jsme zde vyvinuli.

Výsledky jsou jinak dost srovnatelné. Všechny IL kolony jsou použitelné, ale nepřinášejí z hlediska separace velké benefity. Snad by se dala využít změna v selektivitě u kolony SLB-IL76, kde při velkém teplotním gradientu nastává změna v elučním pořadí píků (IBU-i, E, B-i, F-i, J-i). Možný benefit by se mohl skrývat i v jiných vzdálenostech mezi píky iBCF a HFBCF derivátů na IL kolonách oproti konvenční nepolární koloně, ale toto nejsme momentálně schopni posoudit.

Při výraznějším zkrácení retenčních časů analytů docházelo k patrnému rozšíření píků. Jak moc je to důležité, by se zjistilo při validaci.

6 ZÁVĚR

V této práci jsme porovnávali výsledky získané analýzou modelového vzorku IBU a jeho čtyř lékopisných nečistot (po derivatizaci iBCF nebo HFBCF) na koloně s konvenční nepolární polysiloxanovou stacionární fází a na třech IL kolonách. U derivátů iBCF i HFBCF jsme na IL kolonách pozorovali menší zadrž méně polárních analytů oproti koloně nepolární, a naopak větší zadrž analytů polárnějších. Ve výsledku probíhala analýza s oběma druhy derivátů nejrychleji na koloně nepolární.

Při snaze o popis a vysvětlení retenčních mechanismů, které hrály důležitou roli při separaci našich analytů na kolonách jsme dospěli k závěru, že jedním z hlavních aspektů, které ovlivňovaly retenční časy analytů, a tedy pořadí píků, byla teplota varu analytů. Na nepolární koloně se také více projevoval vliv míry lipofility analytů (vyjádřené hodnotou log P). U IL kolon jsme usoudili, že k hlavním aspektům ovlivňujícím separaci patřila teplota varu analytů, a jako další jsme uvažovali vliv polárních interakcí analytů s kolonou. Na nejpolárnější použité koloně (SLB-IL76) jsme již při pokusu se srovnávací metodou viděli koeluci nečistoty E a IBU-i, což jsme přisoudili z velké míry vlivu fenoménu teplotního efektu.

Při snaze o optimalizaci metody na jednotlivých kolonách jsme dospěli k závěru, že metodu lze na všech kolonách optimalizovat tak, aby se separace uskutečnila nejdéle do 10,2 minuty, kromě kolony SLB-IL76, kde kvůli řešení koeluce píků vycházel poslední analyt až před 17. minutou.

Při zkoumání možností vytřepávání derivátu IBU do nepolární fáze jsme se potýkali s relativně malou výtěžností a špatnou opakovatelností vytřepávání. Zkoušeli jsme tedy postup modifikovat a tím zvýšit výtěžnost vytřepávání (vysolování, přidavek různého množství vody, jiný postup přípravy vzorku). Jako nejlepší se nám jevily pokusy s vytřepáváním vzorku do 600 μ l HEX s přidavkem 100 μ l vody, případně pokusy s vytřepáváním vzorku do 600 μ l ISOO s přidavkem 100 μ l vody. Nicméně ani u těchto se nám v průměru nepodařilo převést do nepolární fáze více než 83,0 % derivátu IBU-i.

Kvůli nelineárním výsledkům, které vycházely ještě před servisním úkonem na hmotnostním spektrometru jsme zkoumali také linearitu metody a stabilitu vzorků. Testovali jsme tři vzorky o různých koncentracích IBU-i s vnitřním standardem a zjistili jsme, že v rozmezí 24 hodin jsou vzorky o všech koncentracích IBU-i relativně stabilní, nejlepší stabilitu vykazovaly vzorky s největší testovanou koncentrací IBU-i.

Hlavní přínos této práce tedy vidíme v prozkoumání chování se devíti konkrétních látek na třech různých stacionárních fázích tvořených fosfoniovou IL.

Prostor pro další zkoumání, které by navazovalo na tuto práci vidíme v možnosti otestovat deriváty IBU a jeho nečistot na dalších polárních kolonách s imidazoliiovými iontovými kapalinami jako stacionární fází (SLB-IL82, SLB-IL100, SLB-IL111).

7 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- [1] Karlíček, R.; Polásek, M.; Pospíšilová, M.; Solich, P. Chromatografické metody. V: *Analytická chemie pro farmaceuty*. 3. vyd., Karolinum, Praha 2009. ISBN 978-80-246-1453-3
- [2] Cahlíková, L. *Fytochemické metody*. Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, [Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, 2015], [online], [cit. 2018-03-10]. Dostupné z <https://intranet.faf.cuni.cz/getmedia/bbf2f802-84ec-4a00-87fe-9192edd07f76/Fytochemicke-metody2015_2016_izolacni-metody.aspx?disposition=attachment>.
- [3] Council of Europe, Gas chromatography. In: Council of Europe, *European Pharmacopoeia*, Vol. 1. 9th Ed., EDQM, Strasbourg 2016. ISBN 978-92-871-8127-5
- [4] Klimeš, J.; Sochor, J.; Mokřý, M.; Kastner, P.; Pilařová, P. Plynová chromatografie. V: *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 2. vyd., Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2015. ISBN 978-80-260-8175-3
- [5] Klouda, P. Plynová chromatografie. V: Klouda, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd., Pavel Klouda, Ostrava 2003. ISBN 80-86369-07-2
- [6] [Literák, J.]; 06. *Plynová chromatografie (GC)*. [C6390 Fyzikální metody organické chemie, Masarykova Univerzita, Brno 2009] [online], [cit. 2018-03-10]. Dostupné z <<https://is.muni.cz/el/1431/jaro2009/C6390/7480488/uvod.pdf>>.
- [7] Riddellová, K. *Plynová chromatografie (Teorie)*. Izolační a separační metody, [Ústav analýzy potravin a výživy, Fakulta potravinářské a biochemické technologie,] VŠCHT Praha, [online], [cit. 2018-03-10]. Dostupné z <https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20Cz-11%20GC_TEORIE_1007.pdf>.
- [8] Literák, J. *Plynová chromatografie*. C5060 Metody chemického výzkumu, Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, [Brno], 2016 [online], [cit. 2018-03-10]. Dostupné z <<https://is.muni.cz/el/1431/podzim2016/C5060/um/prezentace.pdf>>.
- [9] Colón, L. A.; Baird L. A. Detectors in Modern Gas Chromatography. In: Grob, R. L.; Barry, E. F. (Eds) *Modern practice of gas chromatography*. 4th Ed. Wiley-Interscience, New Jersey 2004. ISBN 0-471-22983-0

- [10] [Holčapek, M.] Hmotnostní spektrometrie. [Katedra analytické chemie, Fakulta chemických technologií, Univerzita Pardubice], [online], [cit. 2018-03-08]. Dostupné z <http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf>.
- [11] Cahlíková, L. Základy hmotnostní spektrometrie. [Fytochemické metody, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, 2015], [online], [cit. 2018-03-08]. Dostupné z <https://intranet.faf.cuni.cz/getmedia/26aeb99f-94a7-484d-a2ae-18d41a129626/Hmotnostni_spektrometrie_bioorganika_2015_2016.aspx?disposition=attachment>.
- [12] [Holčapek, M.] Spojení MS a separačních technik. [Katedra analytické chemie, Fakulta chemických technologií, Univerzita Pardubice], [online], [cit. 2018-03-08]. Dostupné z <http://holcapek.upce.cz/teaching/06_Spojeni_MS_separace.pdf>.
- [13] Základy hmotnostní spektrometrie a interpretace EI spekter. [Fytochemické metody, Katedra farmaceutické botaniky, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, 2015], [online], [cit. 2018-03-08]. Dostupné z <https://intranet.faf.cuni.cz/getmedia/f783d88a-0eac-49de-9888-3d6688499249/Zaklady-hmotnostni-spektrometrie_ucebni_text.aspx?disposition=attachment>.
- [14] Strukturní analýza organických sloučenin – přírodních látek. [Fytochemické metody. Katedra farmaceutické botaniky. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, 2015], [online], [cit. 2018-03-08]. Dostupné z <https://intranet.faf.cuni.cz/getmedia/6de5c2af-facd-4b0a-8d57-fe44384d1157/Strukturni_analyza_2015_2016.aspx?disposition=attachment>
- [15] Masucci, J. A.; Caldwell, G. W. Electron Ionization. In: Grob, R. L.; Barry, E. F. (Eds) *Modern practice of gas chromatography*. 4th Ed. Wiley-Interscience, New Jersey 2004. ISBN 0-471-22983-0
- [16] Council of Europe, Mass spektrometry. In: Council of Europe, *European Pharmacopoeia*, Vol. 1. 9th Ed., EDQM, Strasbourg 2016. ISBN 978-92-871-8127-5

- [17] chromservis.eu [online]. [cit. 2018-03-08]. Dostupné z <<https://www.chromservis.eu/i/gc-ms-tof-description?lang=EN>>
- [18] [Holčapek, M.] Hmotnostní analyzátoři. [Katedra analytické chemie, Fakulta chemických technologií, Univerzita Pardubice], [online], [cit. 2018-04-17]. Dostupné z <http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf>.
- [19] Hanusek, J. Iontové kapaliny – Nový směr v „zelené“ chemii. *Chem. Listy*, **2005**, *99*, 263-294.
- [20] Zapadlo, M. Využití iontových kapalin v plynové chromatografii. Disertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Olomouc 2012
- [21] Marsh, K. N.; Boxall, J. A.; Lichtenthaler, R. Room temperature ionic liquids and their mixtures – a review. *Fluid Phase Equilib.*, **2004**, *219*, 93-98.
- [22] Yao, C.; Anderson, J. L. Retention characteristics of organic compounds on molten salt and ionic liquid-based gas chromatography stationary phases. *J. Chromatogr. A*, **2009**, *1216*, 1658-1712.
- [23] Poole, C. F.; Poole S. K. Ionic liquid stationary phases for gas chromatography. *J. Sep. Sci.*, **2011**, *34*, 888-900.
- [24] Černá, I.; Klusoň, P.; Drobek M., Cajthaml, T.; Bartek, L. Iontové kapaliny – úvahy o jejich využití v homogenní asymetrické katalýze. *Chem. Listy*, **2007**, *101*, 994-1001.
- [25] Zhao, D.; Liao Y.; Zhang, Z. Toxicity of ionic liquids. *Clean: Soil, Air, Water*, **2007**, *35(1)*, 42-48.
- [26] Supelco Ionic Liquid GC Columns – Introduction to the Technology. Supelco, Sigma-Aldrich, 2014, [online], [cit. 2018-03-11]. Dostupné z <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Posters/1/ionic_liquid_gc_columns.pdf>.
- [27] Armstrong, D. W.; He, L.; Liu, Y. Examination of Ionic Liquids and Their Interaction with Molecules, When Used as Stationry Phases in Gas Chromatography. *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 3873-3876.

- [28] *Capillary HP-5ms Ultra Inert*. Agilent, [online], [cit. 2018-03-11]. Dostupné z <<https://www.agilent.com/en/products/gas-chromatography/gc-columns/capillary/hp-5ms-ultra-inert#features>>.
- [29] Bulletin 909A, Guide to derivatization reagents for GC. Sigma-Aldrich, 1997, [online], [cit. 2018-03-08]. Dostupné z <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Bulletin/t196909.pdf>>.
- [30] Pospíšilová, M. Instrumentální metody, Plynová chromatografie. [Instrumentální metody, Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Moodle pro výuku 1, Univerzita Karlova], [online], [cit. 2018-03-08]. Dostupné z <https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/223908/mod_resource/content/0/Plynova_chromatografie.pdf>.
- [31] Hušek, P.; Šimek, P. Alkylchloroformates in Sample Derivatization Strategies for GC Analysis. Review on a Decade Use of the Reagents as Esterifying Agents. *Curr. Pharm. Anal.*, **2006**, 2, 23-43.
- [32] Derivatization Reagents For Selective Response and Detection in Complex Matrices. Sigma-Aldrich, 2011, [online], [cit. 2018-03-08]. Dostupné z <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/migrationresource4/Derivatization%20Rgts%20brochure.pdf>>.
- [33] Council of Europe, Ibuprofen. In: Council of Europe, *European Pharmacopoeia*, Vol. 2. 9th Ed., EDQM, Strasbourg 2016. ISBN 978-92-871-8127-5
- [34] *Ibuprofen*. SciFinder a CAS solution, [online], [cit. 2018-03-10]. Dostupné z <<https://scifinder-cas-org.ezproxy.is.cuni.cz/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>>.
- [35] *Ibuprofen Impurity B – CAS 3585-49-7*. BOC Sciences, [online], [cit. 2018-03-09]. Dostupné z <<https://www.bocsci.com/ibuprofen-impurity-b-cas-3585-49-7-item-179570.html>>.
- [36] *(2RS)-2-(4-Butylphenyl)propanoic acid solution*. Sigma-Aldrich, [online], [cit. 2018-03-09]. Dostupné z <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/B1220000?lang=en®i>>

on=CZ&gclid=EAiaIQobChMIxPOAjqng2QIVWAOAZCh3LbAKsEAAYASAAEgKR5_D_BwE >.

- [37] *Ibuprofen Impurity E – CAS 38861-78-8*. BOC Sciences, [online], [cit. 2018-03-09]. Dostupné z <<https://www.bocsci.com/ibuprofen-impurity-e-cas-38861-78-8-item-301944.html>>.
- [38] Kučera, R.; Žižkovský, V.; Sochor, J.; Klimeš, J.; Dohnal, J. Utilization of zirconia stationary phases as a tool in drug control. *J. Sep. Sci.*, **2005**, *28*, 1307-1314.
- [39] *Ibuprofen Impurity F – CAS 65322-85-2*. BOC Sciences, [online], [cit. 2018-03-09]. Dostupné z <<https://www.bocsci.com/ibuprofen-impurity-f-cas-65322-85-2-item-203057.html>>.
- [40] *Ibuprofen Impurity J – CAS 65813-55-0*. BOC Sciences, [online], [cit. 2018-03-09]. Dostupné z <<https://www.bocsci.com/ibuprofen-impurity-j-cas-65813-55-0-item-147018.html>>.
- [41] *Acylation reagents*. Regis Technologies, Inc., [online], [cit. 2018-05-07]. Dostupné z <<http://www.registech.com/specialty-reagents/gc-derivatization-reagents/acylation-reagents>>.
- [42] Hušek, P.; Švagera, Z.; Hanzlíková, D.; Šimek, P. Survey of several methods deproteinizing human plazma before and within the chloroformate-mediated treatment of amino/carboxylic acids quantitated by gas chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2012**, *67–68*, 159–162.
- [43] Morgan, P.; Khan, A.; Edge, T. Optimisation of Column Parameters in GC. *Chromatography today*, **2014**, *7*, 6–10.
- [44] Riddellová, K. *Plynová chromatografie (Kolony)*. Izolační a separační metody, [Ústav analýzy potravin a výživy, Fakulta potravinářské a biochemické technologie,] VŠCHT Praha, [online], [cit. 2018-03-10]. Dostupné z <https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20Cz-12%20GC_KOLONY_1107.pdf>.
- [45] Supelco SLB-IL60 Ionic Liquid GC Columns. Supelco, Sigma-Aldrich, 2012, [online], [cit.2018-05-05]. Dostupné

z https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General_Information/1/OTB-slb-il60-selectivity.pdf.

Seznam obrázků

Obrázek 1 – Schéma plynového chromatografu, převzato z [5]

Obrázek 2 – Schéma hmotnostního spektrometru, vlastní zpracování v programu Malování na základě [10, 11]

Obrázek 3 – Schéma elektronové ionizace, převzato z [10]

Obrázek 4 – Schéma kvadrupólového analyzátoru, převzato z [17], obrázek byl dodatečně upraven

Obrázek 5 – Příklady kationtů a aniontů tvořících iontovou kapalinu, převzato z [19], obrázek byl dodatečně upraven

Obrázek 6 – Polysiloxanové polymery a polyethylenglykoly, převzato z [26], obrázek byl dodatečně upraven

Obrázek 7 – Příklad iontové kapaliny používané jako stacionární fáze v plynové chromatografii, převzato z [26]

Obrázek 8 – Škála polaritý stacionárních fází v plynové chromatografii. Vpravo kolony s iontovou kapalinou, vlevo polysiloxanové a polyethylenglykolové kolony, převzato z [26], obrázek byl dodatečně upraven

Obrázek 9 – Reakční schéma alkylchloroformylace ibuprofenu, vlastní zpracování v programu ChemDraw 17.1 na základě [31]

Obrázky 10–15 obsahují grafy, které byly vytvořeny v programu Excel autorkou této práce

Obrázky 16–27 (Chromatogramy) jsou výsledkem měření autorky této práce v programu GCMSsolution Version 2.70, Shimadzu Corporation.

Všechny neocitované chemické vzorce v této práci jsou dílem autorky této práce a byly vytvořeny v programu ChemDraw Professional 17.1.