

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY  
LÉČIV



## DIPLOMOVÁ PRÁCA

Identifikace příbuzných látek pomocí GC-MS

V Hradci Králové 2010  
Vedúci diplomovej práce

Jaroslav Kušnír  
PharmDr. Radim Kučera, Ph. D.

„Prehlasujem, že táto práca je mojím autorským dielom, ktoré som vypracoval samostatne. Všetka literatúra a zdroje, z ktorých som čerpal spracovanie, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované.“

Táto diplomová práca vznikla za podpory grantu SVV-2010-261-001.

Jaroslav Kušník

Na tomto mieste by som rád poďakoval PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D. za odborné vedenie, trpezlivosť a pomoc pri vypracovaní diplomovej práce. Ďalej by som rád poďakoval všetkým pracovníkom katedry za ochotu a pomoc.

# OBSAH

---

1	ÚVOD.....	6
2	TEORETICKÁ ČASŤ .....	8
2.1	CHROMATOGRAFICKÉ SEPARAČNÉ METÓDY .....	9
2.1.1	Rozdelenie chromatografických metód.....	9
2.2	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIA .....	10
2.2.1	Dávkovacie zariadenie.....	11
2.2.2	Chromatografické kolóny .....	12
2.2.3	Detektory .....	15
2.2.4	Riadiaca jednotka .....	19
2.3	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIA-HMOTNOSTNÝ SPEKTROMETER.....	20
2.3.1	Iontový zdroj .....	21
2.3.1.1	Electrónová ionizácia (EI) .....	21
2.3.1.2	Chemická ionizácia (CI).....	22
2.3.2	Detekcia signálu a spracovanie dát.....	27
2.3.3	Fragmentácia ionizovanej molekuly.....	27
2.4	DERIVATIZÁCIA .....	28
2.5	FYZIKÁLNO-CHEMICKÉ VLASTNOSTI 1,3-butandiolu .....	31
3	CIEĽ PRÁCE .....	33
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	35
4.1	CHEMIKÁLIE A PRÍSTROJE.....	36
4.1.1	Chemikálie.....	36
4.1.2	Prístroje.....	36
4.1.3	Ďalšie pomôcky .....	36
4.2	PRÍPRAVA VZORIEK.....	37
4.2.1	Derivatizácia.....	37
4.2.2	Roztok 1,3-butandiolu .....	37
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA .....	38
5.1	Meranie 1,3-butandiolu pomocou GC/FID .....	39
5.2	Hmotnostné spektra nečistôt 1,3-butandiolu pomocou EI (GC/MS) .....	41
5.3	Hmotnostné spektra nečistôt 1,3-butandiolu pomocou CI (methan) (GC/MS)...	43
5.4	Derivatizácia 1,3-butandiolu .....	45
5.5	Hmotnostné spektra nečistôt zderivatizovaného 1,3-butandiolu s acetylchloridom pomocou CI (methan)(GC/MS).....	51
5.6	Zisťovanie optimálnych podmienok pri chromatografickom meraní s použitím ionizačného plynu isobutanu v chemickej ionizácii.....	54
5.7	Hmotnostné spektra nečistôt 1,3-butandiolu pomocou CI (isobután) (GC/MS).	59
6	ZÁVER.....	62
7	ABSTRAKT .....	64
8	ABSTRACT .....	66
9	POUŽITÁ LITERATÚRA .....	68

# 1 ÚVOD

Plynová chromatografie (GC) má v analýze liečiv uplatnenie ako citlivá analytická metóda s veľkou separačnou účinnosťou a je využívaná vo všetkých vyspelých zemiach. Má svoje nezastupiteľné miesto vedľa ostatných analytických metód. Využíva sa hlavne pri analýze plyných látok a látok prchavých, ktoré sa zahriatím prevedú do plynného stavu bez toho, aby došlo k ich rozkladu. U látok, ktoré sa pri vysokej teplote rozkladajú alebo sú neprchavé, je nutné, aby sa vzorky pred samotnou analýzou previedli za pomoci derivatizačných činidiel (tzv. derivatizáciou) na prchavé deriváty analyzovaných látok.

Plynová chromatografia je separačná metóda s možnosťou kvalitatívneho a kvantitatívneho hodnotenia skúmanej látky a pri zvolení vhodného detekčného zariadenia môžeme dosiahnuť mimoriadne vysokú citlivosť. Využíva sa aj pri stanovovaní nečistôt vo vzorke.

Kombinácia GC/MS predstavuje veľmi perspektívne spojenie separačnej metódy s vysoko citlivou detekciou. S použitím vhodnej ionizačnej techniky a prípadne vhodného nosného plynu dokážeme okrem kvalitatívneho a kvantitatívneho hodnotenia zistiť aj približnú štruktúru neznámej látky. Vhodnou dedukciou a náležitými chemickými znalosťami vieme z nameraných hodnôt vyčítať, o akú látku by sa mohlo jednáť. Následne si môžeme ďalšími chemickými metódami overiť našu domienku o analyzovanej látke.

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

## 2.1 CHROMATOGRAFICKÉ SEPARAČNÉ METÓDY

Chromatografické separačné techniky sú viacstupňové separačné metódy, pri ktorých sa zložky analyzovanej vzorky rozdeľujú medzi dve fázy, z ktorých jedna je stacionárna a druhá mobilná. Stacionárna (nepohyblivá) fáza môže mať v chromatografii najrôznejšie formy. Niekedy ide o tuhé čiastočky o veľkosti jednotiek až stoviek mikrometrov, inokedy je to tenká vrstvička kvapaliny nanosená na tuhých časticiach alebo to môže byť tenký film kvapaliny na vnútornej strane kapiláry. Mobilnou (pohyblivou) fázou je plyn, kvapalina alebo nadkritická kvapalina. Podľa princípu separácie poznávame metódy adsorpčné, rozdeľovacie, iontomeničové, resp. metódy založené na rozdielnych fyzikálno-chemických vlastnostiach molekúl, ako je ich veľkosť, hmotnosť, objem atď<sup>1 2</sup>.

### 2.1.1 Rozdelenie chromatografických metód

V súčasnej dobe sa používa veľa typov chromatografických metód, ktoré sa líšia z hľadiska povahy:

- **separačného deja** – chromatografia
  - absorpčná
  - rozdeľovacia
  - iontovýmenná
  - na molekulových sitách
- **použitej techniky** – chromatografia
  - stĺpcová
  - papierová
  - na tenkej vrstve
- **spôsobu vyvíjania** – chromatografia
  - elučná
  - vytesňovacia
  - frontálna analýza
- **skupenstvá pohyblivej a nepohyblivej fázy**
  - chromatografia
    - kvapalina – tuhá látka
    - kvapalina – kvapalina
    - plyn – kvapalina
    - plyn – tuhá látka<sup>3</sup>

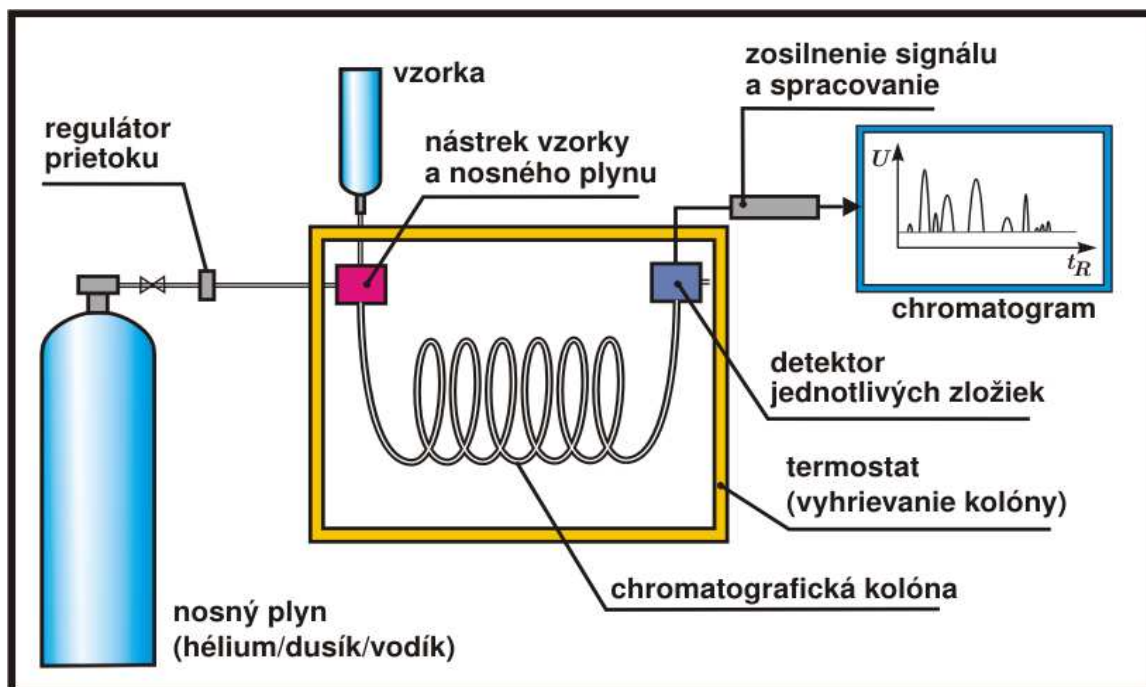
## 2.2 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIA

Plynová chromatografia (GC) je separačná metóda založená na rozdielu distribúcie látok medzi dve nemiešateľné fázy; mobilná fáza je nosný plyn pohybujúci sa skrz alebo pozdĺžne stacionárnou fázou, ktorá je umiestnená v kolóne. Je použiteľná pre látky alebo ich deriváty, ktoré sa dajú previesť do plynnej fázy bez toho aby došlo k ich rozkladu.

Plynová chromatografia je založená na mechanizme adsorpcie, rozdeľovania alebo vylučovania<sup>4</sup>.

Na Obr. 1 je znázornená schéma plynového chromatografu, ktorý sa skladá z týchto hlavných súčastí:

- dávkovacie zariadenie - injektor
- chromatografická kolóna
- detektor
- systém pre spracovanie dát



Obr. 1: Schéma plynového chromatografu<sup>5</sup>.

### 2.2.1 Dávkovacie zariadenie

#### *Injektor*

Injektor je vstupom analyzovanej látky do plynového chromatografu. Nástriek látky sa najčastejšie robí pomocou špeciálnej injekčnej striekačky cez septum, ktoré oddeľuje vnútrojšok injektora od vonkajšieho prostredia. Súčasť injektora je sklenená vložka (*liner*), v ktorej dochádza vysokou teplotou k rýchlemu odpareniu vzorky a k správne premiešaniu pár vzorky s nosným plynom. Medzi injektorom a kolónou je umiestnený delič toku (*splitter*), ktorý umožňuje viesť iba časť odparenej vzorky na kolónu (*splitovací pomer*, split ratio). Technika nástrieku bez splitu (*splitless injection*) sa používa pri stopovej analýze alebo pre analýzu zmesi látok, ktoré sa výrazne líšia v bode varu<sup>6</sup>.

#### Split nástriek:

- Malý objem vzorky (0,1-2 µl) je rýchlo nastrieknutý do vyhriateho lineru.
- Split pomer sa riadi vnútorným priemerom kolóny (viď Tab. 1) a koncentráciou vzorky.
- Najnižšie doporučené splitovacie pomery znázorňuje Tab. 1<sup>7</sup>.

Vnútorný priemer	Split
0,18 – 0,20 mm	1:20 – 1:25
0,25 mm	1:15 – 1:20
0,35 mm	1:10 – 1:12
0,53 mm	1:3 – 1:5

Tab. 1: Pomer splitu k vnútornému priemeru kolóny<sup>8</sup>.

#### Splitless nástriek:

- Všetka nastrieknutá vzorka je prenesená na GC kolónu<sup>7</sup>.

Nástriky plynnej fázy – Dynamické head-space dávkovacie systémy obsahujú prebublávajúce zariadenie, pomocou ktorého sú prchavé látky uvoľňované z roztoku a vyparované do absorpčnej kolóny udržiavanej na nízkej teplote. Zadržané látky sa potom

desorbují do mobilnej fázy rýchlym zahriatím absorpčnej kolóny a prechádzajú do analytickej kolóny<sup>1</sup>.

**Statické head-space** dávkovacie systémy obsahujú termostatovanú komôrku, do ktorej sa vkladajú uzavreté vialky obsahujúce pevné alebo kvapalné vzorky na predom stanovenú dobu potrebnú k ustáleniu rovnováhy prchavých zložiek vzorku medzi pevnou alebo kvapalnou fázou a plynnou fázou. Po dosiahnutí tejto rovnováhy je určené množstvo plynnej fázy z vialky dávkované do plynového chromatografu pomocou plynotesnej striekačky<sup>1</sup>.

### 2.2.2 Chromatografické kolóny

**Kapilárne kolóny** majú vnútorný priemer 0,1 mm až 0,53 mm a dĺžku 5 m až 60 m. Kvapalina alebo stacionárna fáza, ktorá môže byť chemicky viazaná na vnútorný povrch kolóny tvorí film 0,1 až 5,0  $\mu\text{m}$  silný<sup>1</sup>.

Typy kapilárnych kolón:

*WCOT* (Wall-Coated Open Tubular column) – **kvapalinový polymer** na vnútornej strane kapiláry.

*SCOT* (Support-Coated Open Tubular column) – **kvapalinový polymer** zakotvený na nosiči zachyteným na vnútornej strane kapiláry.

*PLOT* (Porous-Layer Open Tubular column) – **adsorbent** zachytený na kapiláre chemickou väzbou ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )<sup>9</sup>.

**Náplňové kolóny** vyrobené zo skla alebo kovu sú obvykle 1 m až 5 m dlhé s vnútorným priemerom 2 mm až 4 mm. Stacionárnou fázou sú najčastejšie porezné polymery alebo tuhé nosiče impregnované kvapalnou fázou<sup>1</sup>.

**Multikapilárne kolóny** sú napríklad tvorené z 919 kapilár v jednej sklenenej kolóne a dĺžke 1m. Používajú sa na rýchle analýzy bez straty účinnosti v širokom rozmedzí prietokov<sup>9</sup>.

*Stacionárne fázy*

Plynová chromatografia sa obvykle delí na chromatografiu v systéme plyn – pevná látka (GSC) a na chromatografiu plyn – kvapalina (GLC). V prípade GSC je distribúcia analytu medzi stacionárnou a mobilnou fázou založená na absorpcii. Nevýhodou je úzka oblasť linearitu absorpčnej isotermy. GLC je príkladom rozdeľovacej chromatografie, kde dochádza k rozdeľovaniu látok v oboch fázach. Kvapalná fáza je v kolóne ukotvená, musí mať nízku tenziu pár a musí byť chemicky stabilná aj pri vysokej pracovnej teplote. Ako kvapalnú stacionárnu fázou pre GLC sa často používajú napr. polyethylenglykoly, polyestery alebo polysiloxany<sup>6</sup>.

Ako absorbenty hlavne v náplňových kolónach pre GSC sa používajú:

- aktívne uhlie, silikagel, oxid hlinitý, molekulové síto
- makroporézny polymerný sorbent<sup>2</sup>

V Tab. 2 sú príklady najčastejšie používaných kvapalných stacionárnych fáz.

Názov	Zloženie	Polarita
<b>Rtx®-1</b>	100% dimethyl polysiloxane	nepolárna
<b>Rtx®-624</b>	6% cyanopropylphenyl - 94% dimethyl polysiloxane	slabo polárna
<b>Rtx®-35</b>	35% diphenyl - 65% dimethyl polysiloxane	medzipolárna
<b>Rtx®-1701</b>	14% cyanopropylphenyl - 86% dimethyl polysiloxane	medzipolárna
<b>Rtx®-2330</b>	90% biscyanopropyl - 10% cyanopropylphenyl polysiloxane	veľmi polárna
<b>Stabilwax®-WAX</b>	Carbowax® PEG	polárna
<b>Rtx®-225</b>	50% cyanopropylphenyl - 50% phenylmethyl polysiloxane	polárna

Tab. 2: Kvapalnú stacionárnu fázou (komerčné označenie podľa firmy Restek)<sup>10</sup>.

*Mobilná fáza*

V plynovej chromatografii je mobilná fáza predstavovaná nosným plynom. Ako nosné plyny sa najčastejšie používajú vodík, dusík, hélium, argón. Pri voľbe nosného plynu sa berú do úvahy nasledujúce faktory: viskozita, účinnosť, čistota, reaktivita, typ používaného detektoru a cena plynu<sup>6</sup>.

Prietok mobilnej fázy musí byť optimalizovaný tak, aby sa dosiahlo čo najlepšieho rozdelenia látok na kolóne, tj. najmenšieho rozšírenia zón separovaných látok. Štyri hlavné deje, ktoré sa podieľajú na rozširovaní zón počas prechodu kolónou sú:

*Vírová difúzia* – rôzne molekuly musia uraziť rôzne vzdialenosti

*Pozdĺžna molekulárna difúzia* – molekuly putujú z miesta o vyššej koncentrácií do miesta o nižšej koncentrácií, po i proti smeru prúdenia mobilnej fázy

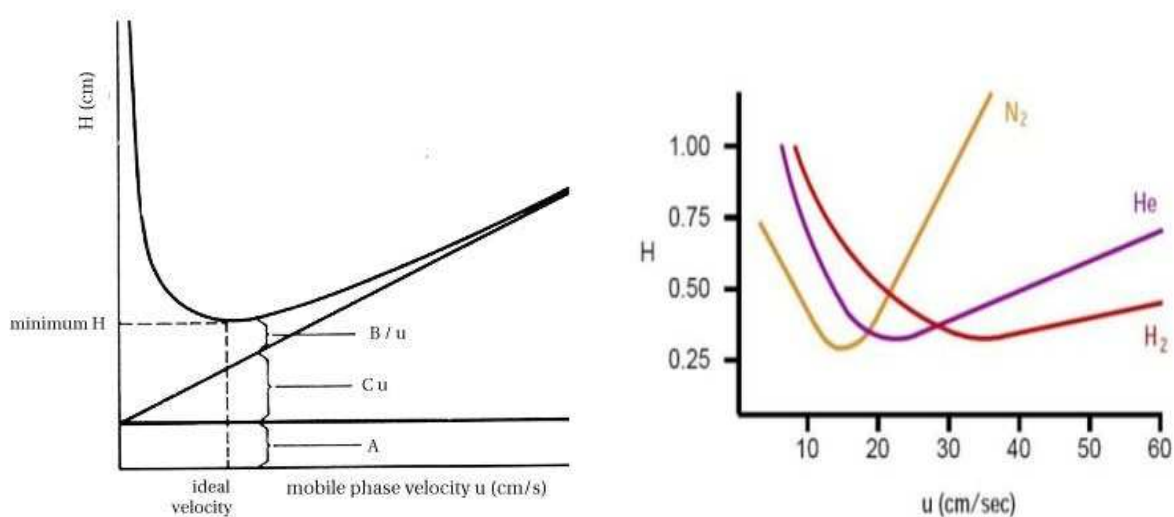
*Odpor proti prenosu hmoty v stacionárnej fázy* – rôzne molekuly difundujú rôzne hlboko do stacionárnej fázy.

*Odpor proti prenosu hmoty v mobilnej fázy* – rýchlostný profil mobilnej fázy je parabolický.

Závislosť výškového ekvivalentu teoretického patra ( $H$ ) na priemernej lineárnej rýchlosti mobilnej fázy ( $u$ ) pre daný typ nosného plynu popisuje van Deemterova rovnica:

$$H = A + B/u + C \cdot u$$

Kde  $A$  je vírová difúzia,  $B$  pozdĺžna difúzia a  $C$  odpor proti prenosu hmoty ako v stacionárnej tak v mobilnej fázy. Obr. 2 zobrazuje van Deemterové krivky pre najčastejšie používané nosné plyny v plynovej chromatografii<sup>6</sup>.



Obr. 2: Van Deemterové krivky pre vybrané nosné plyny.<sup>11 12</sup>

Z krivky na Obr. 2 vyplýva:

DUSÍK – najlepšia účinnosť (malé h) pri nízkych prietokových rýchlostiach nosného plynu

- $\Rightarrow$  vysoké retenčné časy
- krivka veľmi strmá  $\Rightarrow$  malá zmena rýchlosti znamená veľkú zmenu účinnosti
- ak nie je konštantný prietok, je veľa zlúčenín eluovaných za neoptimálnych lineárnych rýchlostí
- lacný

HÉLIUM – účinnosť mierne nižšia než u dusíku

- optimálna rýchlosť vyššia  $\Rightarrow$  podobné rozlíšenie za kratšiu dobu
- krivka nie je tak strmá  $\Rightarrow$  menšie riziko so zmenou rýchlosti
- drahý

VODÍK – účinnosť mierne nižšia ako u dusíku, rovnaká ako u hélia

- optimálna rýchlosť vo vysokých hodnotách  $\Rightarrow$  zníženie retenčných časov bez straty účinnosti
- krivka veľmi plochá
- lacnejší ako hélium, drahší ako dusík
- najlepší pre kapilárne kolóny (najrýchlejší)<sup>13</sup>

### 2.2.3 Detektory

Detekčný systém v plynovej chromatografii (GC), ako aj v iných chromatografických metódach, poskytuje odozvu signálu z chemických zlúčenín separovaných chromatografickou kolónou. Tok konečných množstiev chemických entít prichádza do detektoru v jednotlivých časticách – v GC sú tieto entity v plynnej fáze. Tieto častice majú pomerne krátky pobytový čas v detektore, ktorý preto musí veľmi rýchlo odpovedať na chovanie toku chromatografického materiálu. V niektorých prípadoch je to aj menej než jedna sekunda.

Detektor sa typicky používa na zistenie množstva známych látok v zmesi vzorky. V iných prípadoch, prvotným cieľom detektoru je poskytnúť chemickú informáciu, ktorá by viedla k správnej identifikácii zlúčeniny. V oboch prípadoch je dôležité pochopiť detekčný mechanizmus a experimentálne parametre citlivosti detekčnej odozvy na získanie presných a spoľahlivých výsledkov pre správne vyhodnotenie experimentálnych dát<sup>14</sup>.

Sú rôzne druhy detekčných systémov v GC:

**A) Tepelne vodivostný detektor (TCD – *The thermal conductivity detector*)**

Je univerzálny a nedeštruktívny detekčný systém. Základným princípom merania je rozdiel medzi tepelnou vodivosťou nosného plynu a analyzovanej látky<sup>4 13</sup>.

Podstatnou časťou detektoru je tenké odporové vlákno umiestnené v kovovom bloku. Vláknom, ktorý je zahrievaný na určitú teplotu, prechádza konštantný elektrický prúd. Teplota vlákna má byť aspoň o 100°C vyššia, ako je teplota bloku. Pokiaľ detektorom vyhriatym na konštantnú teplotu prechádza čistý nosný prúd o stálom prietoku, je tiež teplota odporového vlákna konštantná. Ak obsahuje plyn eluovanú látku, ktorá má inú tepelnú vodivosť, zmení sa teplota vlákna a tým aj jeho elektrický odpor<sup>2</sup>.

**B) Detektory ionizačné**

Tento typ detektorov meria ionizačný prúd, ktorý vzniká v dôsledku prítomnosti nabitých častíc v nosnom plyne. Ionizačný zdroj môže byť buď kyslíkovodíkový plameň alebo zdroj ionizačného žiarenia<sup>15</sup>.

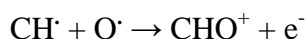
○ **Hmotnostno spektrometrický detektor (MS – *The mass spectrometry detector*)**

Princípom MS je ionizácia neutrálneho atómu či molekuly za vzniku iontov a ich fragmentov, ktoré sú ďalej separované a detekované na základe pomeru  $m/z$ , kde  $m$  je hmotnosť iontu a  $z$  je náboj iontu<sup>15</sup>. (vid' kapitola 2.3)

○ **Plameňovo-ionizačný detektor (FID - *The flame ionization detector*)**

FID bol prvýkrát uvedený v roku 1958. Od tejto doby sa stal najčastejšie používaným detektorom v GC. Na popularitu FID majú podiel rôzne faktory. Jedným z nich je to, že detektor reaguje prakticky so všetkými organickými zlúčeninami s dostatočnou citlivosťou. Odozva detektoru nie je ovplyvnená zmenou prúdu, tlakom alebo teplotou. Nemá odozvu ani na bežné nečistoty nosného plynu ako CO<sub>2</sub> a vlhkosť<sup>14</sup>.

FID pozostáva z malého kyslíkovodíkového plameňa horiaceho na konci trisky, do ktorého sú usmerňované eluované častice z kolóny s nosným plynom. Ionty a elektróny, ktoré sa vytvoria spálením komponent obsiahnutých v nosnom plyne, umožňujú elektrický tok medzi elektródami, na ktoré je vložené stabilizované jednosmerné napätie (maximálne 300 V). Vzduch ako pomocný plyn sa privádza do spodnej časti detektoru. V redukčnej zóne plameňa dochádza k hydrogenácií a vytvoreniu radikálov  $\text{CH}_3^{\cdot}$ , ktoré ďalšou reakciou s kyslíkom produkujú ionty schopné prenosu elektrického prúdu. Z toho vyplýva, že iba hydrogenovateľný uhlík je v podmienkach FID ionizovaný<sup>2 14</sup>.



o *Detektor elektrónového záchytu (ECD – The electron capture detector)*

Dnes je to jeden z najviac populárnych a cenných detektorov v plynovej chromatografii. ECD využíva  $\beta$  žiarenie produkujúce elektróny na kolíziu s plynným nosičom a tvorbou merateľného konštantného prúdu. Ako zdroj mäkkého rádioaktívneho žiarenia sa využíva tritium alebo  $^{63}\text{Ni}$ . Výskyt určitých častíc eluovaných z chromatografickej kolóny môže zachytiť elektróny a ich ubúdanie v konštantnom prúde je následne zaznamenané. Táto detekčná metóda založená na reakcii elektrónového záchytu plynnej fázy môže odpovedať na pikogramy a často femtogramy špecifickej substancie v komplexu matric. Je zvlášť citlivý na niektoré molekuly, ako sú alkylhalogenidy, konjugované karbonylové zlúčeniny, nitrily, nitráty a organokovové zlúčeniny. Je však málo citlivý k uhlíkovodíkom, alkoholom a ketónom. Selektívna citlivosť k halogenovým zlúčeninám robí veľmi užitočným detektorom pre environmentálne (analýzy pesticídov) a biomedicínske štúdie<sup>2 4 17</sup>.

Podstatou častí detektoru sú dve elektródy: emitör – zdroj rádioaktívneho žiarenia a korektor. Medzi týmito elektródami prechádza ionizačný prúd vybudovaný vloženým napätím zo zdroja. Nosný plyn vstupuje do detektoru triskou. Ak obsahuje nosný plyn molekulu majúcu afinitu k elektrónom, dôjde k poklesu ionizačného prúdu, ktorý je zaznamenaný<sup>2</sup>.

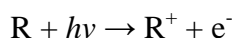


- ***Termoionizačný detektor (TID – The thermionic detector)***

Je to bežne používaný detektor GC na selektívne stanovenie organických zlúčenín obsahujúcich dusík a fosfor, preto sa niekedy môžeme stretnúť aj s označením NPD (Nitrogen-Phosphorous detector). To zahŕňa detekovanie farmaceutických, pesticidných a environmentálnych imisií. Detektor sa môže javiť funkčne ako FID, ale fungovanie je založené na kompletne rozdielnom princípe, čo je ionizácia organických látok v kyslíkovodíkovom plameni, ktorý je vedený cez prstenec solí alkalických zemín (CsBr, KCl, Rb<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)<sup>14 15</sup>.

- ***Fotoionizačný detektor (PID – The photoionization detector)***

Detektor využíva UV žiarenie ako spôsob ionizácie analytu opušťajúceho chromatografickú kolónu. Moderné detektory používajú lampy ako zdroj UV žiarenia. Keď molekula absorbuje fotón svetla dostatočnej energie, molekula sa môže rozštiepiť na molekulárny iont a elektrón<sup>14</sup>.



- ***Heliumionizačný detektor (HID – The helium ionization detector)***

Podobne ako detektor elektronového záchytu je HID vyvinutý z argón ionizačného detektoru. V tomto prípade je tvorené nestabilné hélium namiesto agonových jednotiek. Metastabilné hélium má energiu 19,8 eV pričom argón má 11 eV. To dáva schopnosť ionizovať molekuly, ktorý by argónový ionizačný detektor nemohol. Vytvorené ionizačné produkty sú vystavené elektrickému pólu a zmenený prúd je zmeraný. Metastabilné časti nevyhnutne nepotrebujú byť tvorené z elektrónov indukovaných radioaktívnym zdrojom. Elektrický výboj môže často tvoriť elektróny, ktoré po zrážke s He produkujú vysoko energetické metastabilné častice<sup>14</sup>.

○ ***Plameňofotometrický detektor (FPD – The flame photometric detector)***

FPD je založený na meraní emisie svetla pri horení látok v svietivom vodíkovom plameni.

Zložky vychádzajúce z chromatografickej kolóny sú rozložené a následne excitované na vyšší elektrónový stav v plameni bohatom na vodík. Tieto častice vyžarujú svetlo charakterizujúce heteroatómy uvedených do plameňa. Intenziva emitovaného spektra je monitorované vo fotonásobiči, pred ktorým je optický filter prepúšťajúce svetlo určitej vlnovej dĺžky. FPD je často používaný pre monitorovanie organickej síry a organofosforečnanových častíc, pre ktoré má detektor požadovanú citlivosť.

Detekčný mechanizmus FPD nie je momentálne celkom pochopený. Zlúčeniny obsahujúce síru sú chemicky pozmenené v plameni na rôzne zlúčeniny síry, ako napríklad HS, S, S<sub>2</sub>, SO, H<sub>2</sub>S, SO<sub>2</sub> a iné, ktoré môžu obsahovať uhlíkovo sírove súčasti častíc. Energeticky excitované častice síry sú výsledkom kolíznej reakcii v plameni.

V prípade fosforu, zlúčeniny obsahujúce fosfor sú rozložené na PO častice, ktoré budú podrobené kolíznej reakcie s tvorbou excitovaných HPO častíc. Tieto excitované častice sa rozložia na nižší energetický stav vytvárajúce svetelné žiarenie. Tento fenomén sa môže prirovnáť ako chemoluminiscenčný proces v plameni<sup>2 14</sup>.

Iné detektory - ***Ultrazvukový detektor***

- ***Hall Elektrolytic Conductivity Detector***

- ***Atómový emisný detektor***

- ***Chemoluminiscenčný detektor***<sup>14</sup>

#### **2.2.4 Riadiaca jednotka**

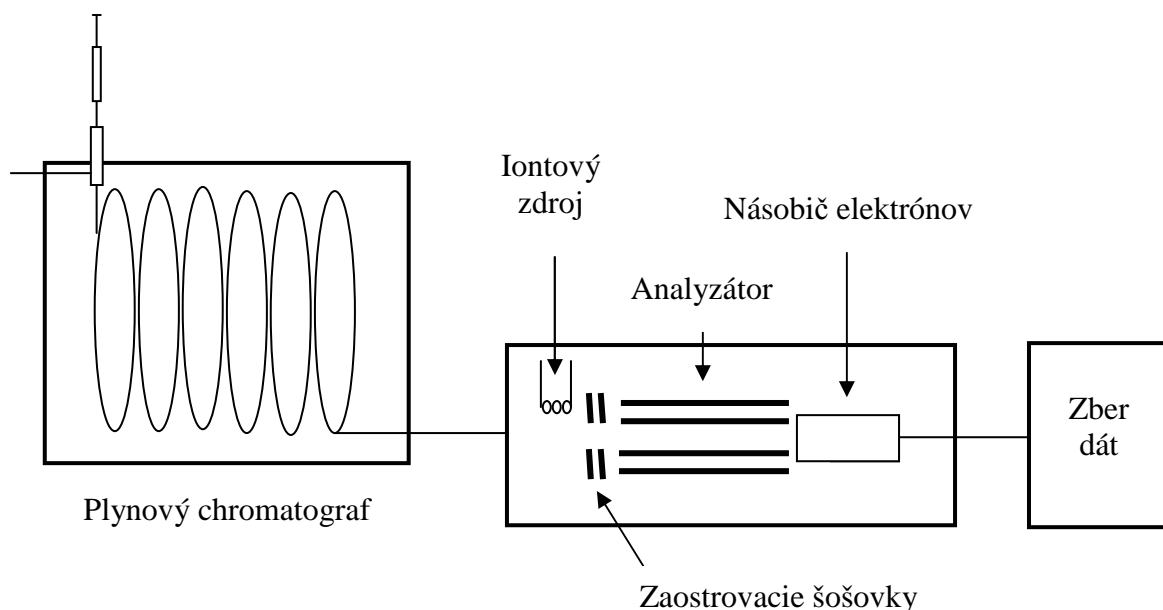
V súčasnej dobe sa v plynovej chromatografii spracúvajú údaje z plyného chromatogramu výhradne pomocou počítača so špeciálnym programom k tomu určeným, ktorý zároveň ovláda celý systém.

## 2.3 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIA-HMOTNOSTNÝ SPEKTROMETER

Plynová chromatografia v spojení s hmotnostnou spektrometriou (GC/MS) je v súčasnosti bežnou analytickou metódou, ktorá kombinuje vysokú separačnú schopnosť kapilárnej plynovej chromatografie s detekciou vysoko špecifickou pre daný analyt a zároveň umožňuje získanie informácie o štruktúre neznámych látok.

Principiálne je do hmotnostného spektrometra privádzaná vzorka v plynnom skupenstve, kde následne podlieha ionizácií a je rozdelená podľa pomeru hmotnosti a náboja iontov. V priebehu ionizácie získajú molekuly takmer vždy dostatočné množstvo vybračnej energie k tomu, aby mohli aspoň do určitej hmoty fragmentovať. Výsledkom takého rozpadu je vznik jednoduchších iontov vedľa neutrálnych molekúl a radikálov. Štruktúrna informácia je obsiahnutá v čiarovom spektre, kde je vynesená závislosť efektívnej hmotnosti ionizovanej častice –  $m/z$  na relatívnej intenzite (abundance)<sup>16</sup>.

Na Obr. 3 je znázornená základná schéma GC/MS.



Obr. 3: Schéma základného GC/MS systému<sup>14</sup>.

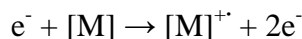
Eluované plynné analyty sú smerované do ionizátora, kde sú ionizované. Akonáhle je vzorka ionizovaná, ona a jej ionizované fragmenty sú usporiadané zaostrovacími šošovkami, kde sú ďalej poháňané do analyzátoru, roztriedené podľa  $m/z$  a počet každého vytvoreného fragmentu je vyhodnotený detektorom.

### 2.3.1 Iontový zdroj

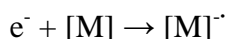
Cieľom iontového zdroju, ako názov naznačuje, je poskytnúť energiu nevyhnutnú na ionizáciu analyzovaných molekúl, pričom je udržiavaná dostatočne vysoká teplota na zabránenie skvapalneniu analytu. Elektrostatické zaostrovacie šošovky sú zvyčajne zovreté na zrýchlenie iontov a zoradenie iontového lúča. Dva typy ionizácie normálne používané v GC/MS sú elektrónová ionizácia (EI) a chemická ionizácia (CI)<sup>14</sup>.

#### 2.3.1.1 Elektrónová ionizácia (EI)

Neutrálne molekuly [M] ktoré eluujú z kolóny plynového chromatogramu, musia byť nabité pozitívne alebo negatívne na ich manipuláciu v hmotnostnom analyzátoe. Tieto neutrálne molekuly náhodne rozptýlené cez iontový zdroj sú vystavené prúdu elektrónov s kinetickou energiou (obvykle 70 eV), ktorá je vyššia ako ionizačná energia vzorku. Ak sa elektrón s dostatočnou energiou zrazí alebo preletí v dostatočnej blízkosti orbity neutrálnej molekuly, odtrhne z nej elektrón a vznikne radikálový kation [M]<sup>+</sup>. Tento radikálový kation je prepisovaný ako molekulárny iont.



Ak molekula prijme elektrón, vznikne radikálový anion [M]<sup>-</sup>.



V spektre je možno okrem molekulových iontov pozorovať fragmentové ionty, ktoré sú charakteristické pre štruktúru pozorovaných molekúl.

Nemalo by sa zabudnúť, že veľa bombardovaných elektrónov sú samostatne pružne a netvoria ionty. Z toho dôvodu, iba pár stotín percent vzorku molekúl sú ionizované na molekulárne ionty behom týchto podmienok s väčšinou vzorku molekúl tvorené odlišne vákuovými pumpami. Negatívne ionty sú 10<sup>4</sup> menej bohaté ako pozitívne ionty o 70 eV. Metóda nie je vhodná pre látky polárne, tepelne nestále alebo vysokomolekulárne<sup>4 14</sup>.

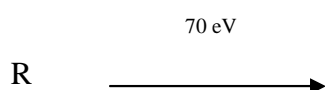
### 2.3.1.2 Chemická ionizácia (CI)

Rozdiel medzi EI a CI môže byť jednoducho pochopený vzhľadom k množstvu vlozenej energie do vzorku molekúl počas procesu ionizácie. V EI vzorka molekúl sú ionizované na radikálové kationy elektrónmi. Miera vlozenej energie v týchto radikálových kationov môže mať rozsah 0 – 70 eV a môže spôsobiť rozsiahlu fragmentáciu. V CI sú vzorky molekúl ionizované na kationy inými kationmi a miera vlozenej energie v týchto kationov závisí na termochemickej reakcii kation/molekula. Rozsah energie týchto kation/molekula reakciách je omnoho nižší (0 ~ 20 eV) s nižšou fragmentáciou<sup>14</sup>.

V CI sú vždy nevyhnutné dva kroky. V *primárnej reakcii* dochádza pomocou vysokoenergetických elektrónov v reakčnom plyne k vytvoreniu stabilných iontových klastrov. Zastúpenie jednotlivých iontov v klastre je typické pre použitý reakčný plyn.

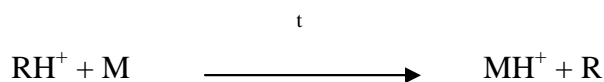
V *sekundárnej reakcii* molekula M v GC eluate reaguje s vytvorenými iontmi z reakčného plynu. Produkty iontovej reakcie sú detekované a zobrazované ako CI spektrum. CI spektrum poskytujú iba exotermické reakcie. V prípade protonizácie to znamená, že afinita protónu PA molekuly M musí byť väčšia ako u reagenčného plynu PA(R). Voľbou reagenčného plynu R môžeme kontrolovať množstvo energie transformovanej do molekuly a stupeň fragmentácie. Ak je PA(R) vyššia ako PA(M), protonizácia nenastane.

Primárna reakcia:



Zoskupenie reagenčného plynu

Sekundárna reakcia:



Protonizácia

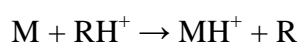
V plynnej reakčnej fázy nemusia byť tvorené iba pozitívne ionty ale často aj negatívne. Komerčné smerovanie GC systému často uplatňuje detekciu pozitívnych iontov (pozitívna chemická ionizácia, PCI). Na detekciu negatívnych iontov (negatívna chemická ionizácia, NCI) je požadované špeciálne zariadenie na zmenu potenciálu polarít analyzátoru a násobič s upravenou dynodou<sup>17</sup>.

## 2.3.1.2.1 Pozitivna chemická ionizácia

*Najčastejšie používanou chemickou ionizáciou je:*

Protonizácia

Protonizácia je veľmi často používaná reakcia v pozitívne chemickej ionizácii. V protonizácii vedie tvorba kvazimolekulového iontu  $(M + H)^+$ , ktorý môže potom podstúpiť fragmentáciu.



Ako protonizačné reagenčné plyny sú najčastejšie používané – metán, isobután alebo amoniak. Metán je menej selektívny a je označený ako ťažký CI plyn. Isobután a amoniak sú typické jemné CI plyny. Ďalej sa používajú ako reakčné plyny aj ďalšie látky (vid' Tab. 3)<sup>17</sup>.

Plyn	Reagenčný ion	PA [kJ/mol]
CH <sub>4</sub>	CH <sub>5</sub> <sup>+</sup>	527
NH <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	840
i-C <sub>4</sub> H <sub>10</sub>	t-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> <sup>+</sup>	807
H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub> <sup>+</sup>	422
H <sub>2</sub> O	H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	706
CH <sub>3</sub> OH	CH <sub>3</sub> OH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	761

Tab. 3: Tabuľka reagenčných plynov<sup>17</sup>.

*Ďalšie spôsoby chemickej ionizácie:*

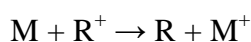
Odstránenie vodíka

V tejto reakcii je vodíkový ión ( $H^+$ ) prenesený z molekulovej látky na reagenčný ión<sup>17</sup>.



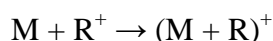
Výmena náboja

Reakcia výmeny náboja prináša radikálový molekulový ión s nepárnym počtom elektrónov ako v ionizácii elektrónového zrážania. Kvalita fragmentácie je porovnateľná s EI spektrom. Rozsah fragmentácie je určený ionizačným potenciálom IP reagenčného plynu<sup>17</sup>.



Tvorba zlúčeniny

Ak sa premenený popísaný komplex neoddelí, produkt je viditeľný na spektre<sup>17</sup>.

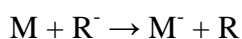


### 2.3.1.2.2 Negatívna chemická ionizácia

Negatívne ióny často vznikajú aj behom elektrónovej ionizácie v iontovom zdroji, ale ich počet je tak extrémne nízky, že nie sú analyticky využiteľné. Negatívne ióny, analyticky využiteľné, vznikajú za podmienok chemickej ionizácie a to procesom: prenosom náboja, odstránením protónu, záchytnom negatívnych iónov z reakčného plynu, elektrónovým záchytnom<sup>17</sup>.

Prenos náboja

Ionizácia vzorku molekuly je dosiahnutá prenosom elektrónu medzi reagujúcim iónom a molekulou<sup>17</sup>.



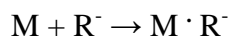
### Odstranenie protónu

Prenos protónu v negatívnej chemickej ionizácii môže byť chápaný ako odstránenie protónu zo vzorku molekuly. Touto cestou môžu podstúpiť všetky zlúčeniny s kyslými vodíkmi – alkoholy, fenoly alebo ketóny jemnej ionizácií<sup>17</sup>.



### Záchyt negatívnych iontov z reakčného plynu

Záchyt negatívnych iontov z reakčného plynu sa využíva pri analýze dlhých alyfatických uhľovodíkov s hydroxylovými iontmi<sup>17</sup>.



### Elektrónový záchyt

Elektrónový záchyt s tvorbou negatívnych iontov u NCI je veľmi často používaný v GC/MS alanýze. Proces vzniku negatívnych iontov je analogický ako u ECD<sup>17 18</sup>.

### Separácie iontov

#### *Separácie iontov magnetickým a elektrickým polom:*

- prístroje s jednoduchou fokusáciou
- prístroje s dvojitou fokusáciou

#### *Dynamické separácie iontov:*

- kvadrupólový analyzátor
- iontová past

#### *Separácia podľa doby letu (TOF)*

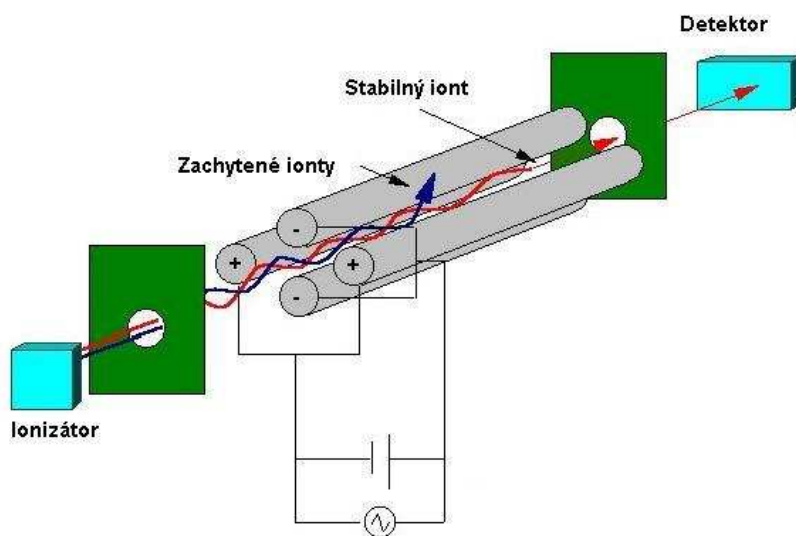
#### *Iontová cyklotrónová rezonancia (ICR)*

#### *Rádiofrekvenčné analyzátory<sup>19</sup>*

### 2.3.2.1 Kvadrupólový analyzátor

Analyzátor pozostáva zo štyroch rovnakých kovových tyčí kruhového prierezu dĺžky 20 - 30 cm. Na dve protíahlé je vložené kladné jednosmerné napätie a na ďalšie dve záporné jednosmerné napätie. Na všetky je superponované vysokofrekvenčné striedavé napätie (viď Obr. 4).

Princíp: iont, ktorý je privedený do stredu osy kvadrupólu, začne oscilovať. V daný časový okamžik pre určitý pomer  $U/V$  sú oscilácie stabilné iba pre iont s určitou hmotnosťou  $m/z$ , ktorý prejde kvadrupólom a dostane sa na detektor. Všetky ostatné ionty sú zachytené na tyčiach kvadrupólu ako to je vidieť na Obr. 4. Plynulou zmenou (skenovaním) hodnôt jednosmerného napätia  $U$  a amplitúdy  $V$  (ich pomer ostáva konštantný) sú postupne prepúšťané na detektor všetky ionty (ide vlastne o hmotnostný filter)<sup>20</sup>.



Obr. 4: Schéma kvadrupólového analyzátoru<sup>21</sup>

#### Citlivosť vs. skenovací rozsah

Ak sa vzorka skenuje napr. v rozsahu 1000  $m/z$ , na detekciu jednej hodnoty  $m/z$  je iba 1/1000 z celkového času. V zostávajúcom čase (tj. 999/1000 času) sú ionty s touto hodnotou zachytené na tyčiach kvadrupólu. Akonáhle znížime hmotnostný rozsah, zvýšime citlivosť detekcie<sup>20</sup>.

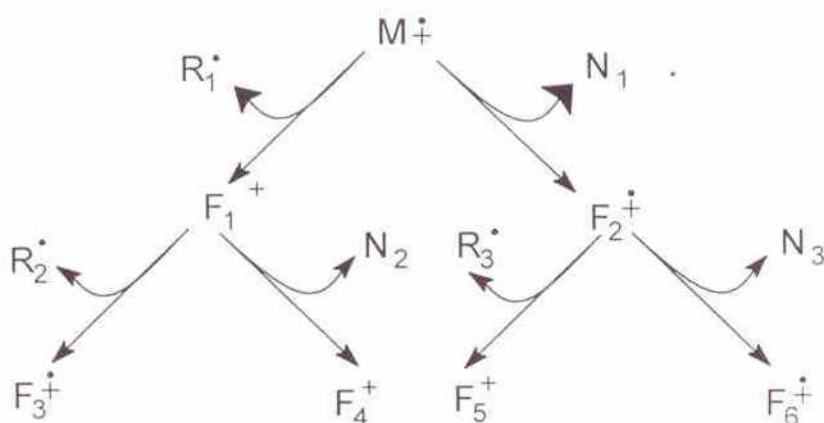
Ak použijeme tzv. selektívny záznam iontu ( Selected Ion Monitoring – SIM), zvýšime výrazne citlivosť, ale už nemeríme hmotnostné spektrum, ale iba záznam intenzity iontu na čase (poprípade aj viac iontov) – vhodné pre kvantitatívnu a stopovú analýzu kedy poznáme štruktúru<sup>20</sup>.

### 2.3.2 Detekcia signálu a spracovanie dát

Ionty separované v analyzátoe sú prevedené na elektrické signály detekčným systémom typu fotonásobiča alebo elektronásobiča. Signál je ďalej digitalizovaný a spracovaný v počítači pomocou vhodného programového vybavenia.

### 2.3.3 Fragmentácia ionizovanej molekuly

K vytvoreniu molekulárneho iontu je dostatočná ionizačná energia okolo 10 eV. Bežne sa však používajú energie značne vyššie – okolo 70 eV – pretože iba vtedy sa dá zaistiť reprodukovateľnosť spektra. Tento prebytok energie má za následok štiepenie slabých väzieb medzi atómami a vznik fragmentov. Zatiaľ čo molekulárnym iontom je kation-radikál, fragmenty môžu byť neutrálne molekuly, radikály, kationty alebo opäť kation-radikály. Posledné dva typy sú pozorovateľné v spektre. Všeobecne sa dá fragmentácia popísať schémou na Obr. 5<sup>19</sup>.



Obr. 5: Schéma fragmentácie molekuly<sup>19</sup>.

## 2.4 DERIVATIZÁCIA

Plynová chromatografia je používaná na oddeľovanie prchavých organických zlúčenín. Funkčná obmena molekuly zvyšuje, niekedy znižuje prchavosť. Derivatizačné činidla umožňujú chromatografom analýzu zlúčenín, ktoré inak nie sú ľahko zmerateľné GC. Derivatizácia často redukuje absorbciu analytu v GC systéme a zlepšuje detekčnú odpoveď, oddeľovanie píku a symetriu píku.

Derivatizácia je používaná u nasledujúcich dôvodov:

- na zvýšenie rozpoznania a redukcii odpadu polárnych zlúčenín (-OH, -COOH, =NH, -NH<sub>2</sub>, -SH a ďalšie funkčné skupiny).
- na analýzu relatívne neprchavých zlúčenín.
- na zvýšenie analytickej účinnosti a detekcie.
- na zvýšenie stability zlúčeniny.

Výber derivatizačného činidla je založená na funkčnej skupine požadovanej derivatizácie, chovaní ostatných funkčných skupín v molekule a dôvod vykonania derivatizácie. Chemická štruktúra a vlastnosť molekuly ovplyvňuje výber činidla.

Dobré činidlo - vytvára derivatizačnú reakciu ktorá je 95 – 100%.

- nespôsobuje žiadne preskupenie štruktúrnych zmien behom derivatizácie.
- nesmie prispieť k strate vzorku behom reakcie.
- vytvára deriváty, ktoré nebudú interagovať s analytickou kolónou.
- vytvára derivát, ktorý je stabilný s ohľadom na čas.

Máme tri druhy derivatizácie :  
Acylácia  
Alkylácia  
Silykácia<sup>22</sup>

### 2.4.1 Acylácia

Je to premena zlúčenín, ktorá pozostávajú z aktívneho vodíka (-NH, -OH, -SH) v amidoch, esteroch alebo thioesteroch reakciou karboxylovej kyseliny alebo jej derivátu.

Acylácia má veľa výhod:

- zvyšuje stabilitu analytu ochranou nestabilných skupín.
- môže dodať prchavosť zlúčeninám, ako napríklad karbohydráty alebo aminokyseliny, ktoré majú veľa polárnych skupín. Tie sú neprchavé a normálne rozkladajúce v teple.
- pomáhajú chromatografickým separáciám, ktoré by neboli možné s nederivatizovanými zlúčeninami.
- zlúčeniny sú detekované vo veľmi nízkych koncentráciách s použitím detektoru elektrónového záchytu.

Acylácia často môže byť používaná na tvorbu fragmentov derivátu pre MS.

- Derivačné činidla:
  - anhydrid perfluoro kyseliny
  - perfluoroacylimidazol<sup>22</sup>

### 2.4.2 Alkylácia

Alkylácia zahŕňa pridávanie alkylovej skupiny (alifatickej alebo aromatickej) do aktívnej funkčnej (H) skupiny. Nahradenie vodíka s alkyl skupinou je dôležité, pretože deriváty majú nižšiu polaritu. Alkylačné činidla sú používané na zmenu zlúčenín obsahujúce kyslý vodík, ako napríklad karboxylové kyseliny alebo fenoly. Výsledné produkty sú ethery, estery, thioetery, thioestery, n-alkylaminy a n-alkylamidy.

Esterifikácia – reakcia alkoholu a kyselinou tvorí ester. Je to veľmi populárna alkylačná metóda. Alkyl ester je často výbornej stability a tvorí rýchle a v dostatočnom množstve vzorky pre GC analýzu. Proces zahŕňa zhlukovanie karboxylovej skupiny kyseliny a hydroxylovej skupiny alkoholu s elimináciou vody<sup>22</sup>.

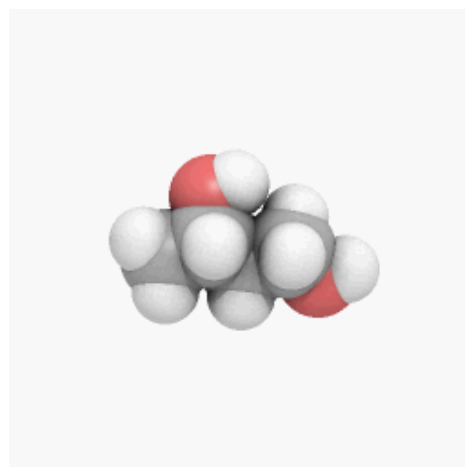
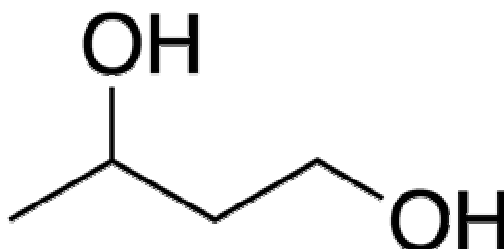
### 2.4.3 Silykácia

Silykácia je zavedenie kremičitej skupiny do molekuly substitúciou aktívneho uhlíka. Nahradením aktívneho vodíka kremičitou skupinou znižuje polaritu zlúčeniny a znižuje spájanie vodíku. Kremičitanové deriváty sú prchavejšie a stabilnejšie. Detekcia je rozšírená. Veľa hydroxy a amino zlúčenín vystupujú ako neprchavé a nestabilné pri 200-300°C. Silykácia umožňuje ich detekovanie. Kremičitanové činidla sú kompatibilné s veľa detekčnými systémami, ale ak sú v nadbytku môžu spôsobiť rozdiely v FID.

Trimethylsilyl (TMS) skupina je veľmi populárna a všestranná kremičitanová skupina pre GC analýzu. TMS činidla a deriváty reagujú s aktívnymi atómami vodíka<sup>22</sup>.

**2.5 FYZIKÁLNO-CHEMICKÉ VLASTNOSTI 1,3-butandiolu**(C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>)

Vzorec:

Obr. 6: Vzorec 1,3-butandiolu<sup>23</sup>

Synonymum – 1,3-butylenglykol

Mr = 90,123

Racemát DL

$t_t$	-50°C
$t_v$	207,5°C
$\rho^{20}$	1,005 3
$n_D^{20}$	1,441 0
$n_D^{25}$	1,439

Optické izoméry:

D(+)

$t_v$	204°C
$\rho^{20}$	1,005 3
$n_D^{20}$	1,441 8
$[\alpha]^{22}$	+18,5 (EtOH 4%)

L(-)

$t_v$	107°C (3.0 kPa)
$\rho^{20}$	1,005
$[\alpha]^{22}$	-18,8 (EtOH 4%)

24

1,3-butandiol je číra, bezfarebná, hydroskopická a viskózná kvapalina. Je neobmedzene miešateľný s vodou, acetónom, etanolom a čiastočne rozpustný v étere. Je nerozpustný v olejoch. Rozpúšťa väčšinu silíc a syntetické aroma<sup>25</sup>.

Využitie:

1,3-butandiol sa používa vo farmaceutickej technológii často ako rozpúšťadlo a pre svoju viskozitu aj ako náhrada glycerolu.

Pôsobí lokálne dehydratačne. Má aj baktericidný účinok a spektrum jeho pôsobenia zahrňuje aj zárodky významné pre lokálnu antisepsiu. Je často používaný ako pomocná látka bez dráždivého pôsobenia.

Aj pri jeho použití ako rozpúšťadla u injekčných prípravkov nebola zistená žiadna neznášanlivosť<sup>26</sup>.

## 3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce bolo:

- zistiť molekulovú hmotnosť troch nečistôt, ktoré sa vyskytujú v substancií 1,3-butandiolu.

## 4 EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

## **4.1 CHEMIKÁLIE A PRÍSTROJE**

### **4.1.1 Chemikálie**

**1,3-butandiol** – Sigma Aldrich, ČR

**Acetylchlorid** – Sigma Aldrich, ČR

**Benzoylchlorid** – Sigma Aldrich, ČR

**Dinitrobenzoylchlorid** – Sigma Aldrich, ČR

**Methanol** – Lichrosolv Merck, ČR

**Dichlormethan** – Balex, ČR

**Pyridín** – Balex, ČR

**Chloroform** – Penta, ČR

### **4.1.2 Prístroje**

Shimadzu Gas Chromatograph GC-2010 s FID

Shimadzu Gas Chromatograph GC-2010 s GCMS-QP2010 Plus

Kolóny: Supelcowax 10 FUSED SILICA Capillary Column: 30m x 0,32mm x 0,5 um film thickness, Supelco Inc., ČR

Supelcowax 10 FUSED SILICA Capillary Column: 30m x 0,52mm x 0,5 um film thickness, Supelco Inc., ČR

SPB-624 FUSED SILICA Capillary Column: 30m x 0,32mm x 1,8um film thickness, Supelco Inc., ČR

PC program: GCMS solution Version 2.50 SU3, Shimadzu

GC solution Version 2.30.00 SU7, Shimadzu

Analytické váhy AND, Japonsko

Vákuová odparka BUCHI R-114

Miešačka LT 2

### **4.1.3 Ďalšie pomôcky**

kadičky, odmerné banky, varné banky s plochým dnom, odmerné valce, pipety, balónik k pipete, automatické pipety, skúmavky, laboratórne lyžičky, vialky

## 4.2 PRÍPRAVA VZORIEK

### 4.2.1 Derivatizácia

POSTUP:

#### Vzorka

Do varnej banky (25ml) sa pridalo 10ml dichlormethanu, 0,5g 1,3-butandiolu, 1ml pyridínu a 1ml acetylchloridu alebo 10ml dichlormethanu, 0,5g 1,3-butandiolu, 1ml pyridínu a 1,5ml benzoylchloridu alebo 5ml dichlormethanu, 0,1g 1,3-butandiolu, 0,2ml pyridínu a 0,5g dinitrobenzoylchloridu.

Pripravený roztok sa nechal zreagovať 1 hodinu za pretrepávania. Po zreagovaní sa z roztoku nechali vo vákuovej pumpe odpariť prchavé látky. Odparok sa zriedil s vodou a pretrepával 3x v deliacom lieviku s chloroformom. Chloroformová vrstva sa odpustila do skúmavky a odparila pomocou dusíka.

Výsledný produkt sa kvantitatívne preniesol do 10ml odmernej banky a doplnil sa methanol po risku. Takto pripravený roztok zderivatizovaného 1,3-butandiolu sa ďalej používal na meranie v plynovej chromatografii.

#### Slepá vzorka

Postupovalo sa rovnako ako pri príprave vzorky ale nepoužil sa 1,3-butandiol. U derivatizácií sa pred samotným použitím musela slepá vzorka prefiltrovať, aby sa zbavila vyzrážaných produktov reakcie.

### 4.2.2 Roztok 1,3-butandiolu

POSTUP:

1,3-butandiol o koncentrácii 1,5mg/ml sa navážil do 10ml odmernej banky a banka sa doplnila methanolom po risku. Takto pripravená vzorka sa používala na meranie v plynovej chromatografii.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

## 5.1 Meranie 1,3-butandiolu pomocou GC/FID

### Chromatografické podmienky:

#### Injektor

Nosný plyn: H<sub>2</sub>

Teplota injektoru 250°C

Rýchlosť nástriku 150,0 cm/sek

Split 5,0

#### Kolóna

Supelcowax 3

Dĺžka 30,0 m

Priemer 0,53 mm ID

Hrúbka filmu 0,50 µm

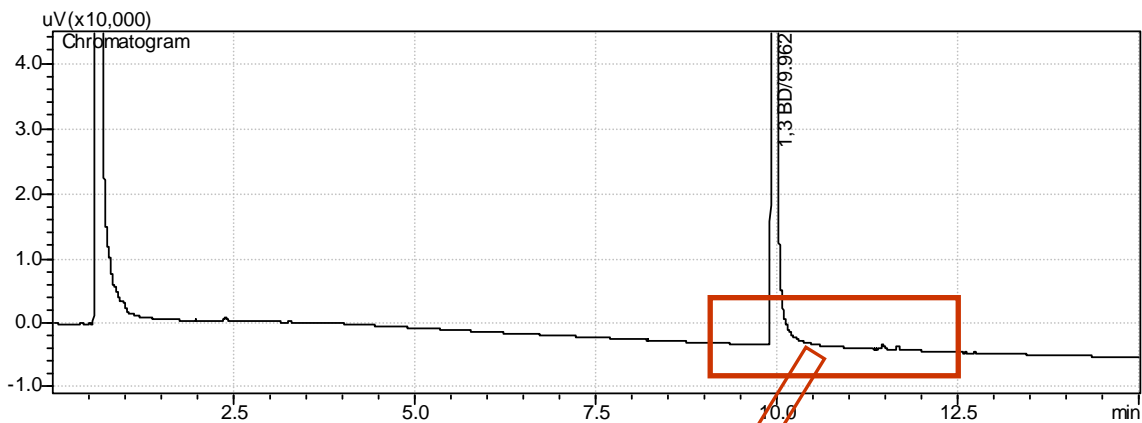
### Teplotný program:

Gradient °C/min	Teplota (°C)	Čas (min.)
-	60,0	3
10,0	230,0	20

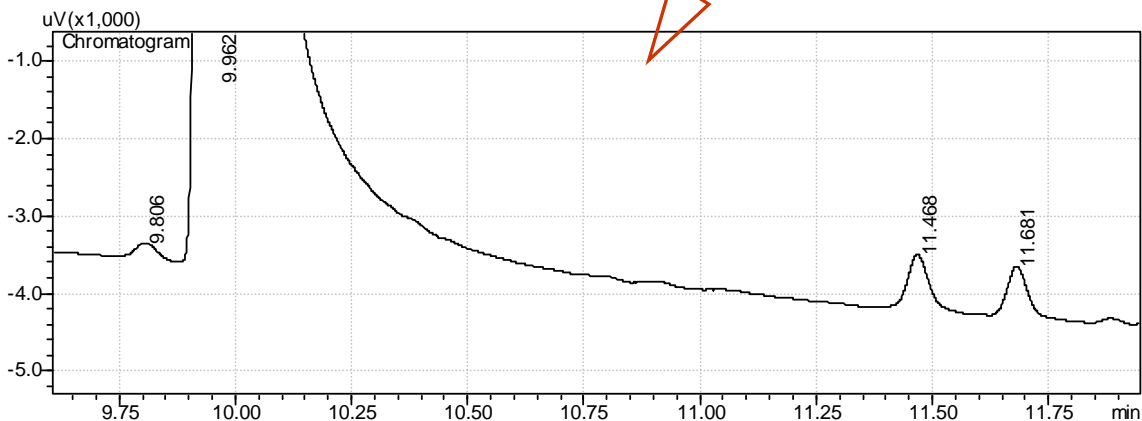
#### Detektor

Teplota 300°C

Na chromatograme (vid' Obr. 7 a 8) sa okrem píku 1,3-butandiol s retenčným časom 9,962 sledovali ešte píky s retenčnými časmi 9,806; 11,468 a 11,681, ktoré predstavujú nečistoty pri výrobe výsledného produktu. U týchto nečistôt bolo hlavnou úlohou zistiť ich molekulovú hmotnosť, ktorá by pomohla k identifikácii látok.



Obr. 7: Chromatogram 1,3-butandiolu.



Obr. 8: Zväčšený chromatogram (Obr. 7) 1,3-butandiolu a nečistôt.

## 5.2 Hmotnostné spektra nečistôt 1,3-butandiolu pomocou EI (GC/MS)

### Chromatografické podmienky:

#### GC

Teplota injektoru	250°C
Nosný plyn: He	
Tlak	44,4 kPa
Rýchlosť nástriku	50,0 cm/sek
Split	50,0 (prvý pík) 10,0 (druhý a tretí pík)

#### Kolóna

SPB - 624	
Dĺžka	30,0 m
Priemer	0,32 mm ID
Hrúbka filmu	1,80 µm

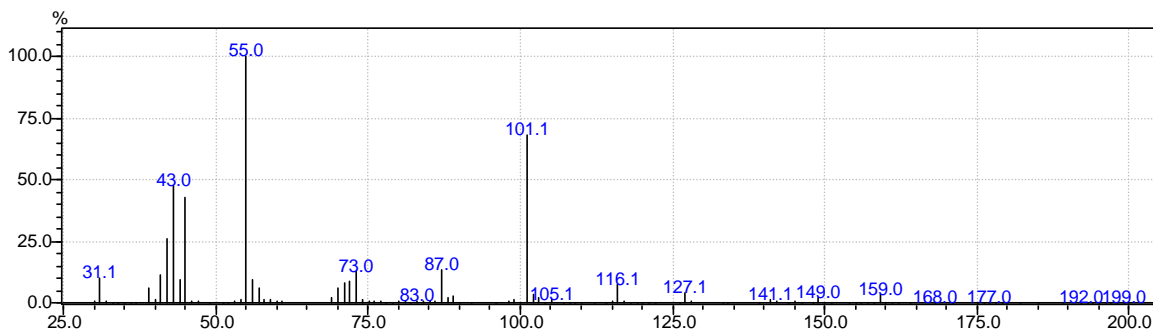
### Teplotný program:

Gradient °C/min	Teplota (°C)	Čas (min.)
-	100,0	9,00
15,0	170,0	1,34

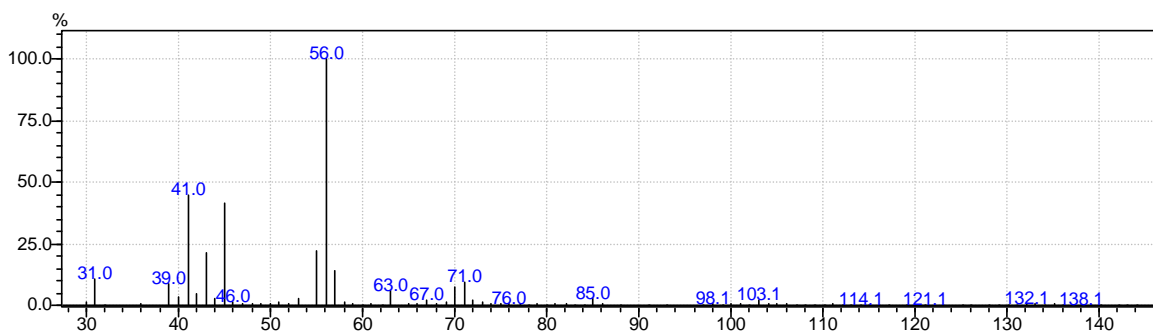
#### MS

Teplota ionizátora	200°C
Rozmedzie detektoru	30,00 – 200,00 <i>m/z</i> (prvý pík) 30,00 – 145,00 <i>m/z</i> (druhý a tretí pík)

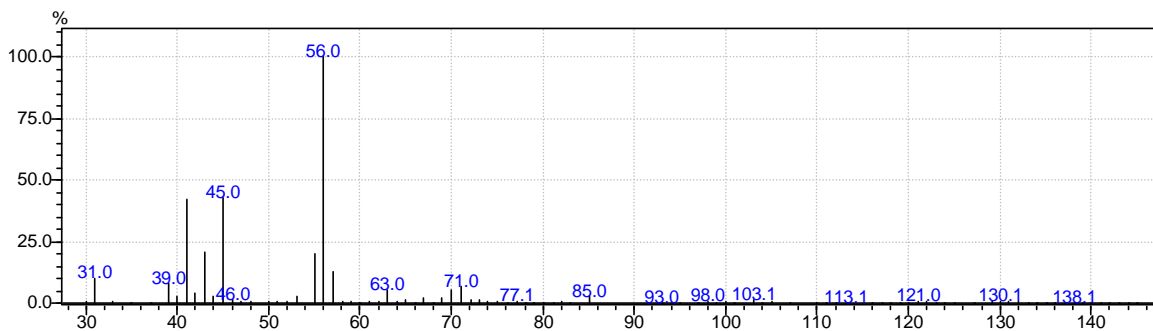
Z hmotnostných spektier (vid' Obr. 9, 10 a 11) je vidieť jednotlivé fragmenty nečistôt, z ktorých sa nedá vyčítať ich molekulovú hmotnosť. Elektrónová ionizácia (EI) neprinesla žiadny výsledok, preto sa v nasledujúcich pokusoch bude používať chemická ionizácia.



Obr. 9: Hmotnostné spektrum u píku s retenčným časom 9,806 z Obr. 8.



Obr. 10: Hmotnostné spektrum u píku s retenčným časom 11,468 z Obr. 8.



Obr. 11: Hmotnostné spektrum u píku s retenčným časom 11,681 z Obr. 8.

### **5.3 Hmotnostné spektra nečistôt 1,3-butandiolu pomocou CI (methan) (GC/MS)**

#### **Chromatografické podmienky:**

##### GC

Teplota injektoru	250°C
Nosný plyn: He	
Tlak	44,4 kPa
Rýchlosť nástriku	50,0 cm/sek
Split	5,0 (prvý pík)

##### Kolóna

SPB - 624	
Dĺžka	30,0 m
Priemer	0,32 mm ID
Hrúbka filmu	1,80 µm

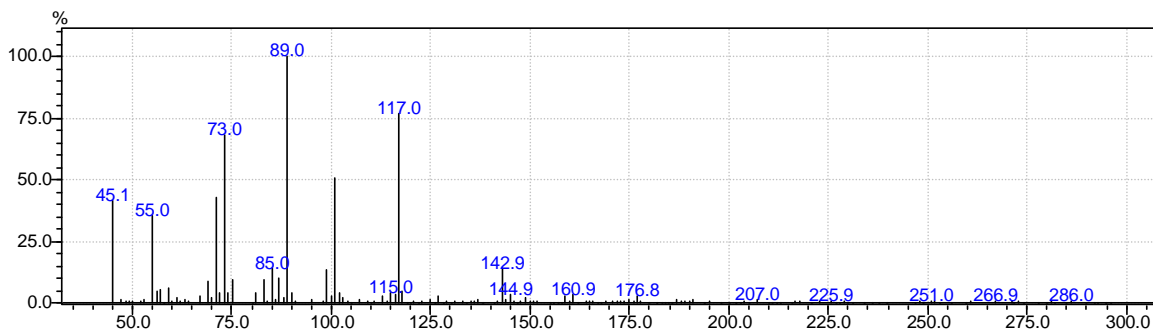
#### Teplotný program:

Gradient °C/min	Teplota (°C)	Čas (min.)
-	100,0	9,00
15,0	170,0	1,34

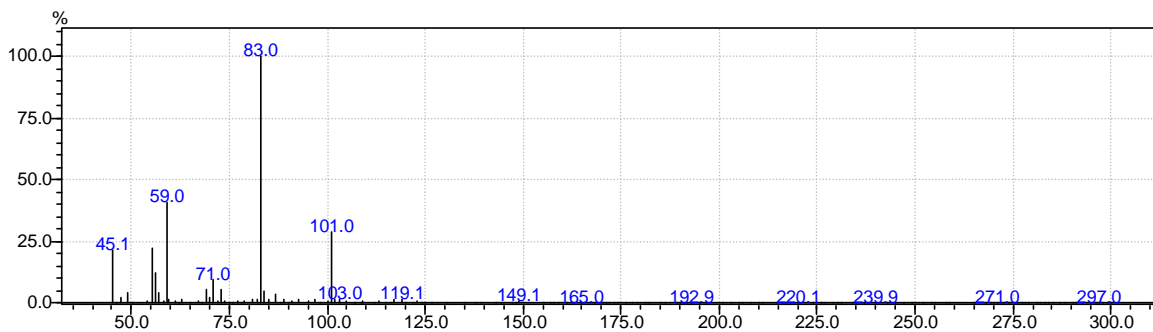
##### MS

Teplota ionizátora	200°C
Rozmedzie detektoru	44,00 – 300,00 <i>m/z</i> (prvý pík)

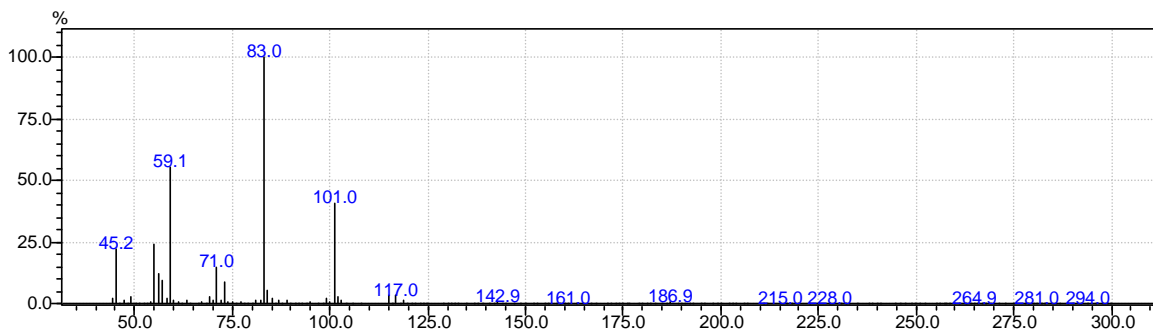
Po porovnání hmotnostných spektier EI a CI je vidieť, že chemická ionizácia má lepšie spektrum (viď Obr. 12, 13 a 14), ale ešte stále nie je jasné, aké majú nečistoty molekulové hmotnosti. V pokusoch sa bude pokračovať a to pomocou derivatizácie 1,3-butandiolu.



Obr. 12: Hmotnostné spektrum u píku s retenčným časom 9,806 z Obr. 8.



Obr. 13: Hmotnostné spektrum u píku s retenčným časom 11,468 z Obr. 8.



Obr. 14: Hmotnostné spektrum u píku s retenčným časom 11,681 z Obr. 8.

## 5.4 Derivatizacia 1,3-butandiolu

### 5.4.1 Derivatizacia 1,3-butandiolu s acetylchloridom

#### Chromatografické podmienky:

##### Injektor

Nosný plyn: H<sub>2</sub>

Teplota injektoru 250°C

Rýchlosť nástriku 150,0 cm/sek

Split 5,0

##### Kolóna

Supelcowax 3

Dĺžka 30,0 m

Priemer 0,53 mm ID

Hrúbka filmu 0,50 µm

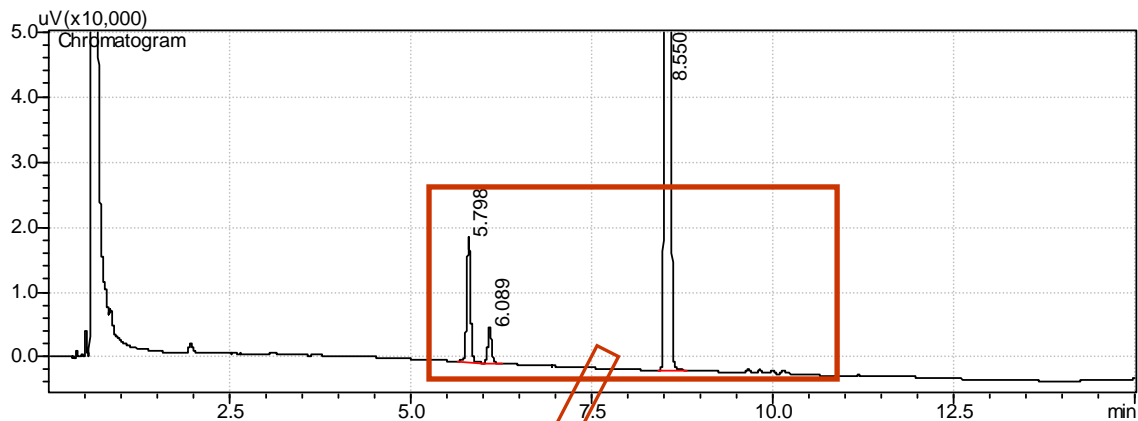
#### Teplotný program:

Gradient °C/min	Teplota (°C)	Čas (min.)
-	60,0	3
10,0	180,0	20

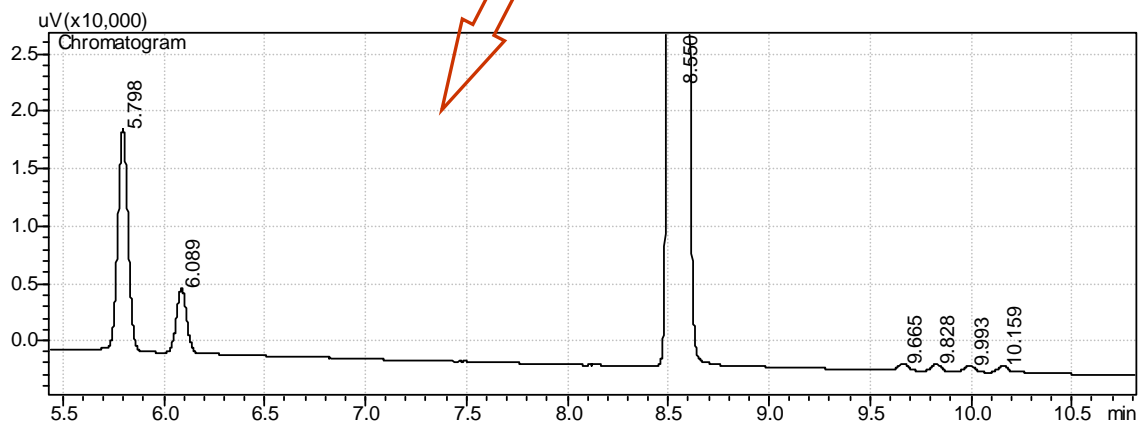
##### Detektor

Teplota 300°C

Na chromatograme (viď Obr. 15 a 16) sa okrem zderivatizovaného 1,3-butandiolu s retenčným časom 8,550 objavili ďalšie píky. Píky s retenčnými časmi 5,798 a 6,089 sú pravdepodobne vedľajšie produkty derivatizácie, pretože na to aby to boli nečistoty, majú veľkú plochu. Niektoré z píkov s retenčnými časmi 9,665; 9,828; 9,993 a 10,159 by mohli odpovedať nečistotám predstavujúce píky retenčných časov 11,468 a 11,681 z Obr. 8.



Obr. 15: Chromatogram zderivatizovaného 1,3-butandiolu.



Obr. 16: Zväčšený chromatogram (Obr. 15) zderivatizovaného 1,3-butandiolu a nečistôt.

### 5.4.2 Derivatizácia 1,3-butandiolu s benzoylchloridom

#### Chromatografické podmienky:

##### Injektor

Nosný plyn: H<sub>2</sub>

Teplota injektoru 250°C

Rýchlosť nástriku 150,0 cm/sek

Split 5,0

##### Kolóna

Supelcowax 10

Dĺžka 30,0 m

Priemer 0,53 mm ID

Hrúbka filmu 0,50 µm

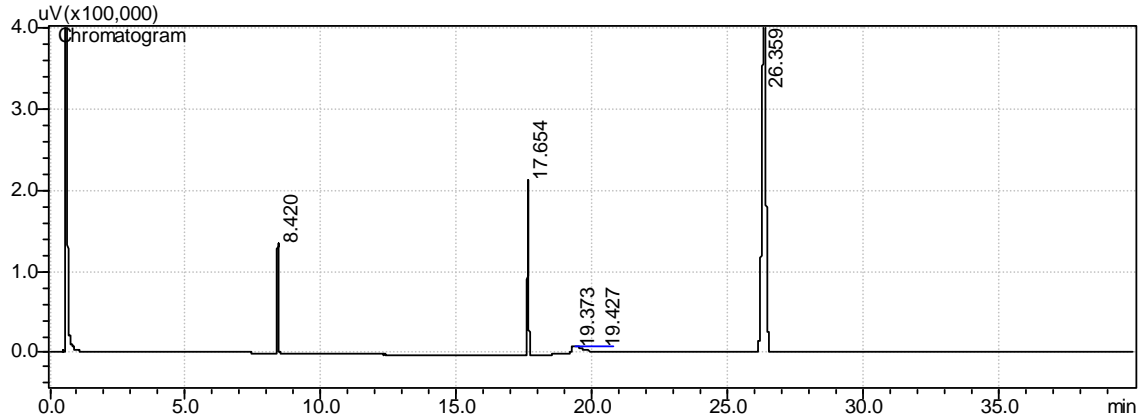
Teplotný program:

Gradient °C/min	Teplota (°C)	Čas (min.)
-	60,0	3
10,0	180,0	20

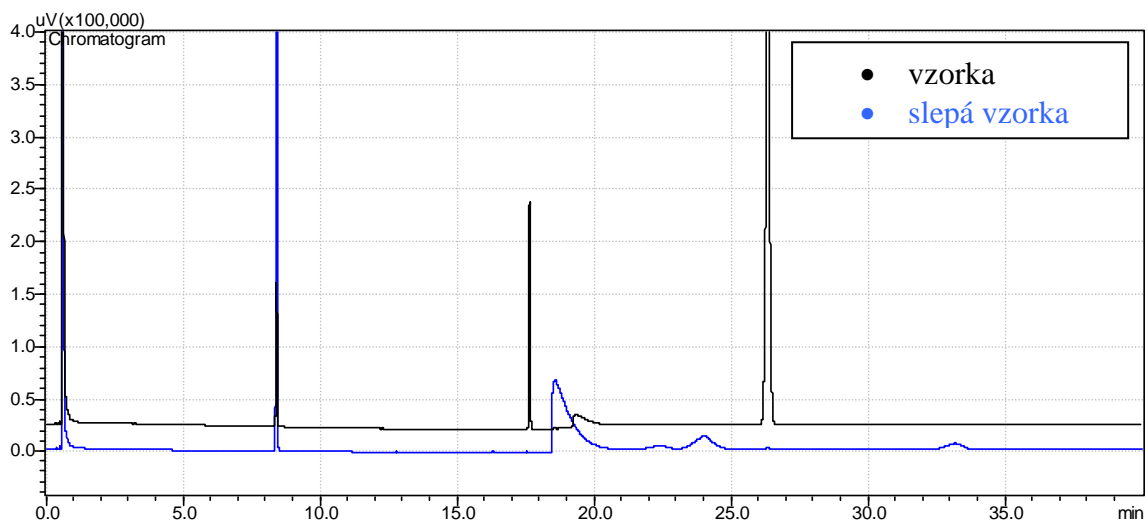
##### Detektor

Teplota 300°C

Na Obr. 17 je znázorněný chromatogram zderivatizovaného 1,3-butandiolu pomocou benzoylchloridu.



Obr. 17: Chromatogram zderivatizovaného 1,3-butandiolu.



Obr. 18: Porovnanie chromatogramu zderivatizovaného 1,3-butandiolu s chromatogramom slepého vzorku.

Porovnaním chromatogramu vzorky a slepej vzorky (viď Obr. 18) sa z chromatogramu zderivatizovaného 1,3-butandiolu odstránili píky, ktoré patria slepej vzorke. Takto nám na chromatograme ostali píky s retenčným časom 17,645 a 26,359 (zderivatizovaný 1,3-butandiol je s veľkou pravdepodobnosťou pík s retenčným časom 26,359). Hľadané nečistoty sa neobjavili.

### 5.4.3 Derivatizácia 1,3-butandiolu s dinitrobenzoylchloridom

#### Chromatografické podmienky:

##### Injektor

Nosný plyn: H<sub>2</sub>

Teplota injektora 240°C

Rýchlosť nástriku 65,0 cm/sek

Split 5,0

##### Kolóna

SPB - 624

Dĺžka 30,0 m

Priemer 0,32 mm ID

Hrúbka filmu 1,80 µm

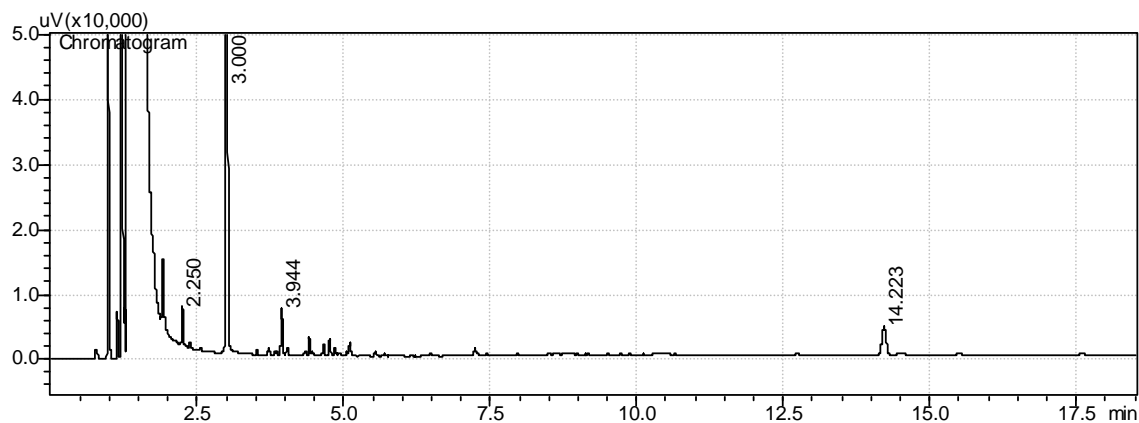
Teplotný program:

Gradient °C/min	Teplota (°C)	Čas (min.)
-	60,0	0,5
20,0	222,0	10

##### Detektor

Teplota 280°C

Na Obr. 19 je znázorněný chromatogram zderivatizovaného 1,3-butandiolu pomocou dinitrobenzoylchloridu.



Obr. 19: Chromatogram derivatizácie 1,3-butandiolu.



Obr. 20: Porovnanie chromatogramu zderivatizovaného 1,3-butandiolu s chromatogramom slepého vzorku.

Z nameraných chromatogramov je vidieť, že po porovnaní chromatogramu vzorky a slepej vzorky (vid' Obr. 20) sa nezobrazil ani zderivatizovaný 1,3-butandiol a ani hľadané nečistoty.

Zo zistených meraní sa dospelo k výsledku, že najlepšie podmienky pre derivatizáciu 1,3-butandiolu je derivatizácia acetylchloridom. Tieto vzorky sa následne premeriavali pomocou GC/MS.

## **5.5 Hmotnostné spektrá nečistot zderivatizovaného 1,3-butandiolu s acetylchloridom pomocou CI (methan)(GC/MS)**

### **Chromatografické podmienky:**

#### GC

Teplota injektoru	250°C
Nosný plyn: He	
Tlak	52,1 kPa
Rýchlosť nástriku	52,6 cm/sek
Split	10,0

#### Kolóna

SPB - 624	
Dĺžka	30,0 m
Priemer	0,32 mm ID
Hrúbka filmu	1,80 µm

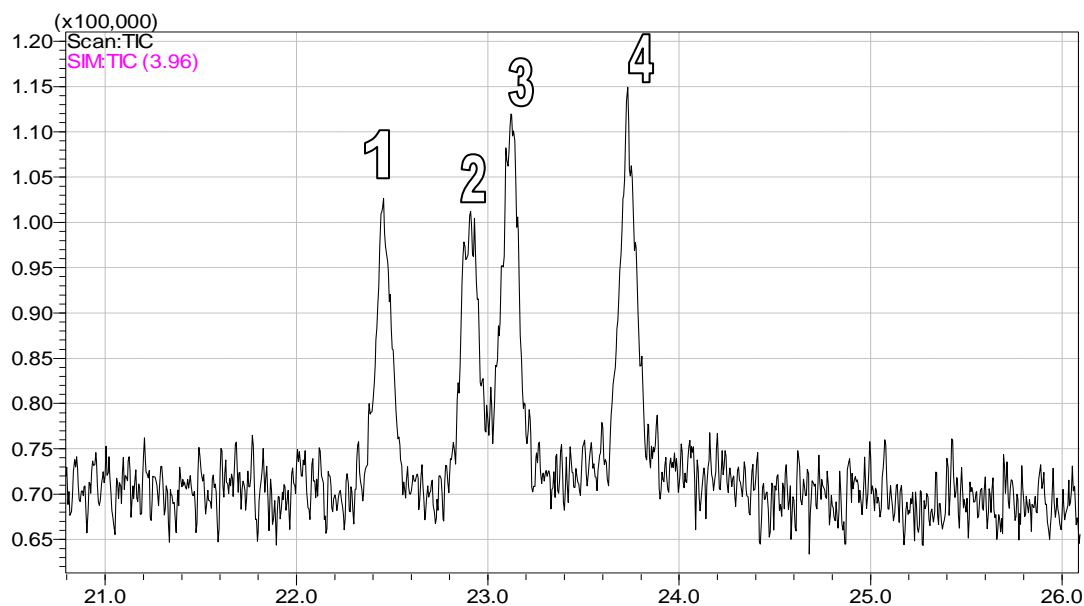
#### Teplotný program:

Gradient °C/min	Teplota (°C)	Čas (min.)
-	100,0	1,00
2,00	160,0	7,00

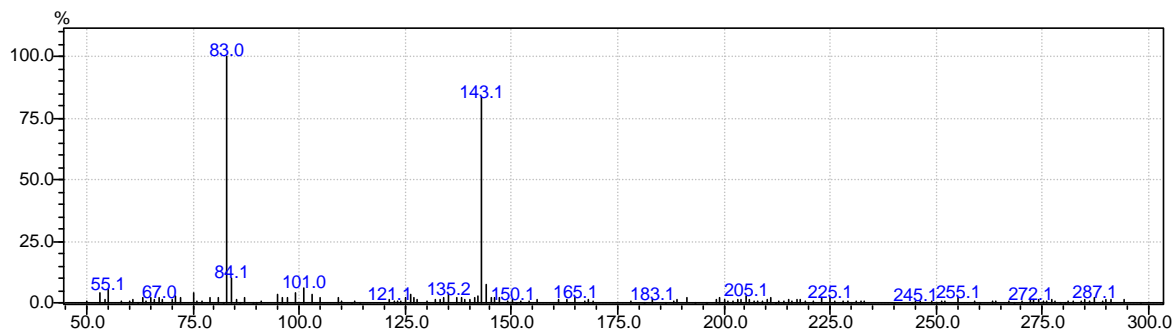
#### MS

Teplota ionizátora	200°C
Rozmedzie detektoru	50,00 – 300,00 <i>m/z</i>

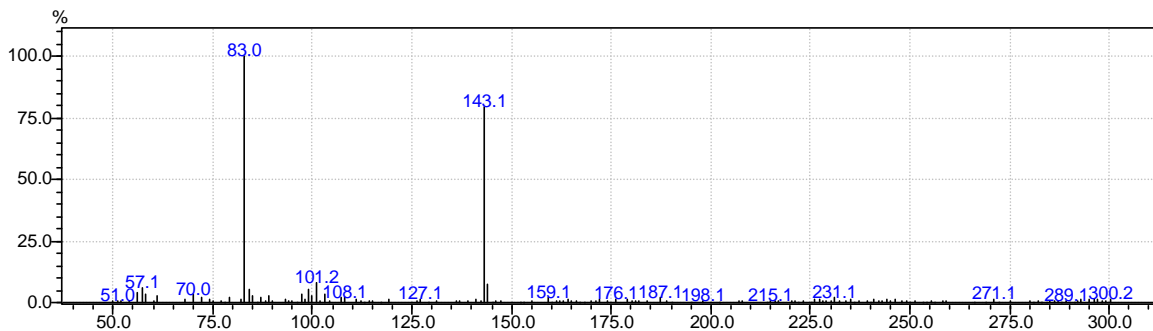
Derivatizáciou (viď Obr. 21) vznikli 4 píky, ktoré pravdepodobne patria píkom o retenčných časoch 11,468 a 11,681 z Obr. 8. Pík s retenčným časom 9,806 z Obr. 8 sa nám na chromatograme neobjavil. Pravdepodobne došlo ku koelicií, ale je tiež možné, že k reakcií nedošlo alebo bol malý výtťažok.



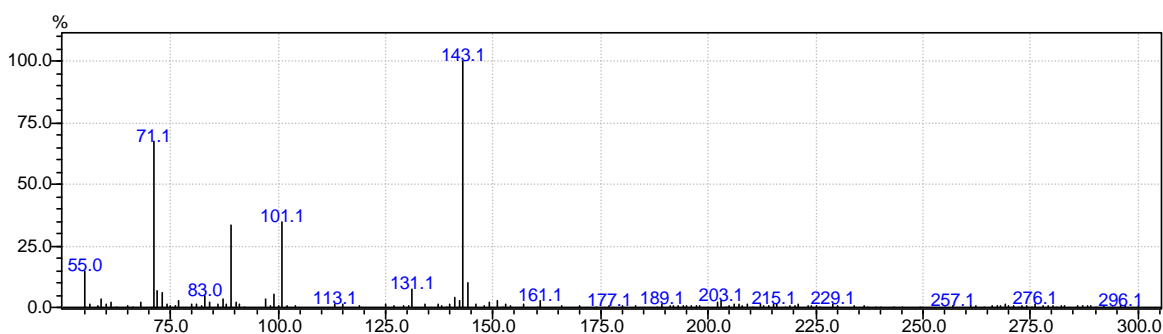
Obr. 21: Časť chromatogramu zderivatizovaného 1,3-butandiolu s píkami nečistot.



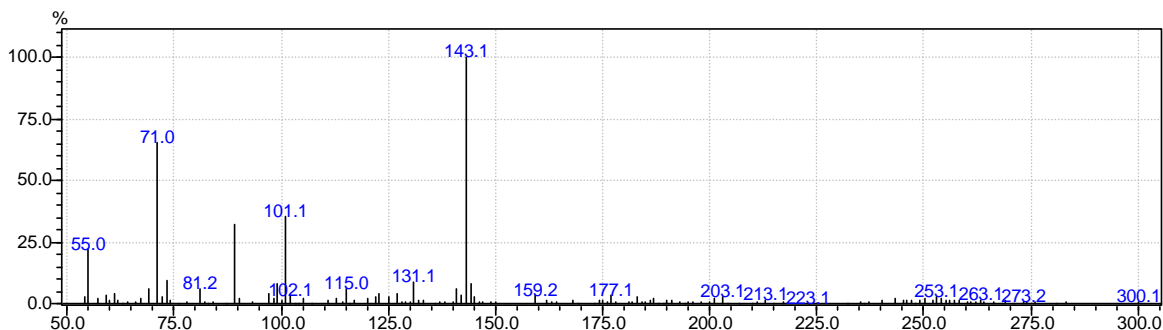
Obr. 22: Hmotnostné spektrum prvého píku na chromatograme (Obr. 21).



Obr. 23: Hmotnostné spektrum druhého píku na chromatograme (Obr. 21).



Obr. 24: Hmotnostné spektrum tretieho píku na chromatograme (Obr. 21).



Obr. 25: Hmotnostné spektrum štvrtého píku na chromatograme (Obr. 21).

Z hmotnostných spektier (viď Obr. 22, 23, 24 a 25) je zrejmé, že píky 1 a 2 sú totožné ako aj píky 3 a 4. Môže sa jednať o izoméry, ale ani v tomto prípade nevieme určiť molekulovú hmotnosť nečistôt a ani či sa jedná o nečistoty alebo o vedľajšie produkty reakcie.

Derivatizáciou sme si chceli vypomôcť, pretože sme ešte nemali ionizačný plyn (isobutan), ktorý je šetrnejší k fragmentácii molekuly a tým pádom sa v hmotnostnom spektre môže objaviť intenzívnejší iont  $(M+H)^+$ , z ktorého by sa dala určiť molekulová hmotnosť skúmaných nečistôt. Derivatizácia neprinesla žiadny výsledok.

## **5.6 Zist'ovanie optimálnych podmienok pri chromatografickom meraní s použitím ionizačného plynu isobutanu v chemickej ionizácii**

### **Chromatografické podmienky:**

#### GC

Teplota injektoru	250°C
Nosný plyn: He	
Tlak	185,4 kPa
Rýchlosť nástriku	150,0 cm/sek
Split	5,0

#### Kolóna

Supelcowax 10	
Dĺžka	30,0 m
Priemer	0,32 mm ID
Hrúbka filmu	0,50 µm

#### Teplotný program:

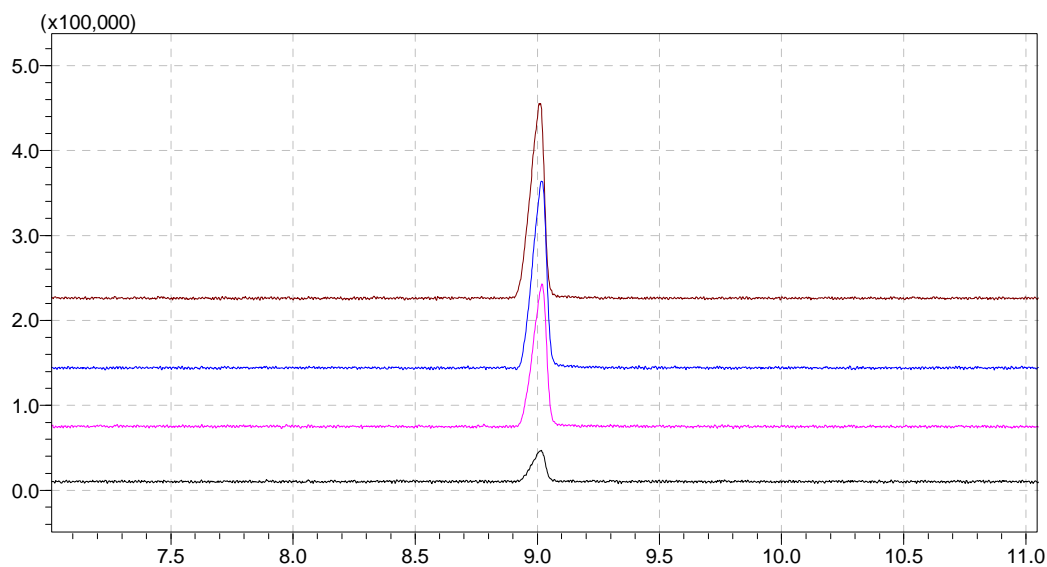
Gradient °C/min	Teplota (°C)	Čas (min.)
-	110,0	4,50
5,0	150,0	2,00

#### MS

Teplota ionizátora	200°C
Rozmedzie detektoru	70,00 – 300,00 <i>m/z</i>
Napätie na detektore zvýšené o	+ 0 kV + 0,1 kV + 0,2 kV + 0,3 kV + 0,4 kV + 0,5 kV

### 5.6.1 Zisťovanie optimálnych podmienok isobutánu so zvyšujúcim sa tlakom

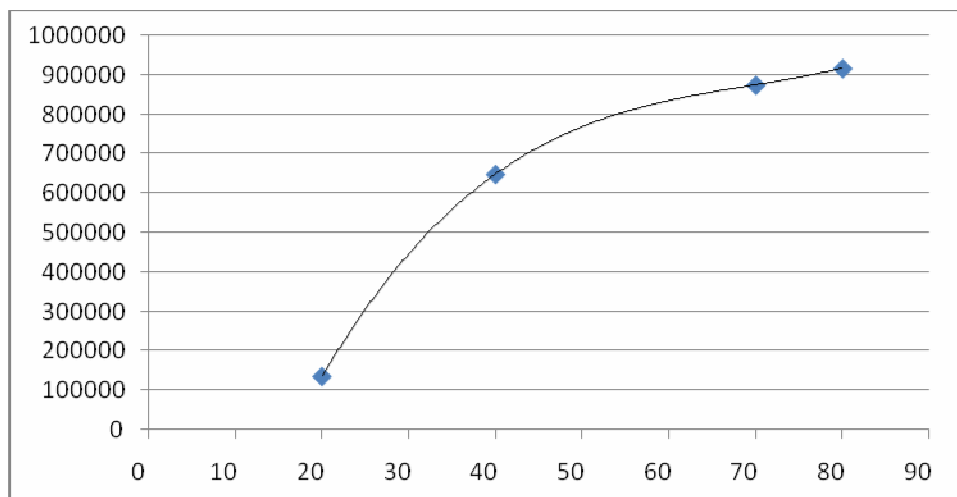
Na Obr. 27 sú znázornené porovnania chromatogramov 1,3-butandiolu pri zvyšovaní tlaku ionizačného plynu.



Obr. 26: Porovnanie chromatogramov vzorky 1,3-butandiolu pri skúmaní najlepších podmienok odozvy píku s použitím ionizačného plynu isobutánu pri postupnom zvyšovaní tlaku (20, 40, 70, 80 kPa) v chemickej ionizácii.

tlak [kPa]	Plocha
20	136400
40	648904
70	875182
80	917218

Tab. 4: Plocha píku na základe zvyšovania tlaku ionizačného plynu isobutanu.

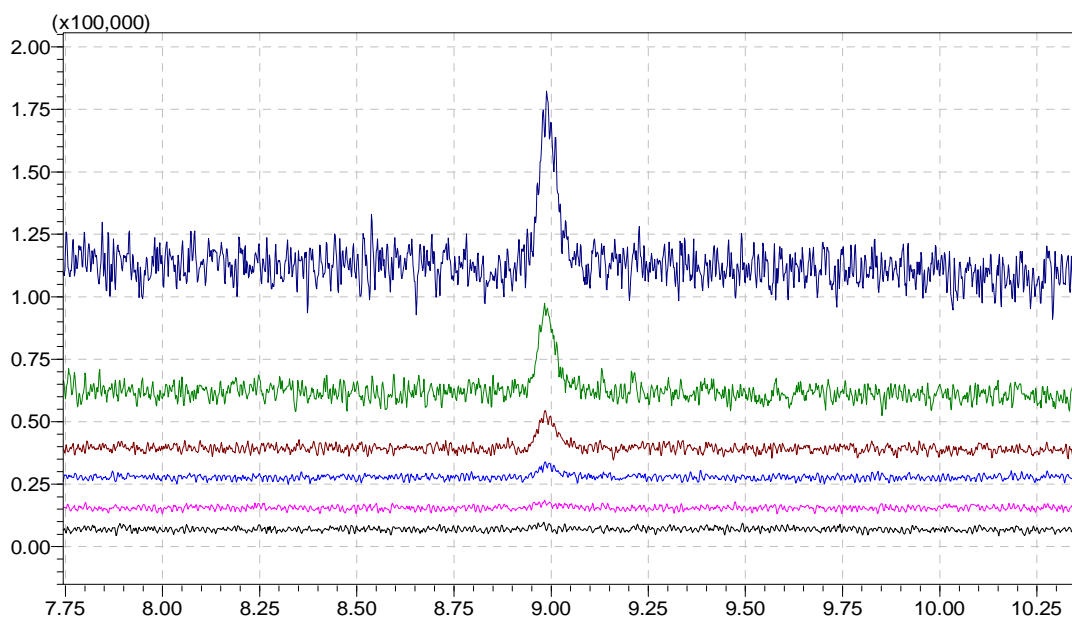


Graf 1: Znáozornenie narastajúceho zvyšovania plochy píku so zvyšujúcim tlakom ionizačného plynu isobutanu.

Z nameraných hodnôt (vid' Tab. 4 a Graf 1) je vidieť, že plocha píku narastá so zvyšujúcim tlakom ionizačného plynu isobutanu. Takto sa dospelo k záveru, že najvýhodnejší tlak ionizačného plynu je 80 kPa, ktorý sa používal pri analýze.

### 5.6.2 Zisťovanie optimálnych podmienok isobutánu so zvyšujúcim napätím na detektore oproti základnému nastaveniu.

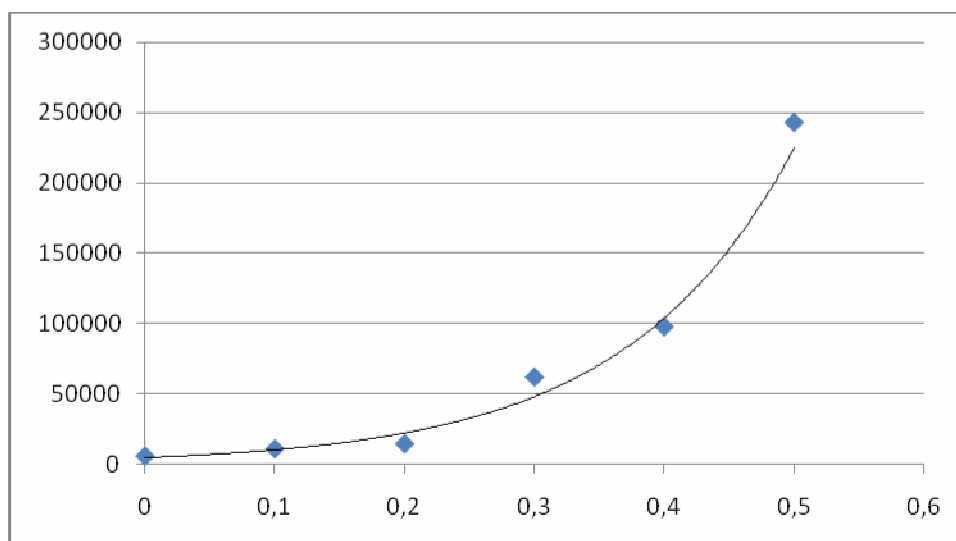
Na Obr. 27 sú znázornené porovnania chromatogramov 1,3-butandiolu pri zvyšovaní napätia na detektore od základného nastavenia.



Obr. 27: Porovnanie chromatogramov vzorky 1,3-butandiolu pri skúmaní najlepších podmienok odozvy píku s použitím ionizačného plynu isobutánu pri postupnom zvyšovaní napätia na detektore oproti základnému nastaveniu (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 kV) v chemickej ionizácii.

Napätie na detektore zvyšené o [kV]	Plocha
0	5546
0,1	10692
0,2	14322
0,3	61666
0,4	97490
0,5	242701

Tab. 5: Plocha píku na základe zvyšovania napätia na detektore oproti základnému nastaveniu.



Graf 2: Znárodnenie narastajúceho zvyšovania plochy píku so zvyšujúcim napätím na detektore oproti základnému nastaveniu.

So zvyšujúcim napätím na detektore narastá plocha píku (viď Tab. 5 a Graf 2). Je však vidieť, že okrem zväčšujúceho píku látky narastá aj šum. Z tohto dôvodu sa pri meraní skúmanej látky zvyšovalo napätie na detektore o 0,4 kV oproti základnému nastaveniu.

Merania ukázali, že najvýhodnejšie podmienky pre použitie ionizačného plynu isobutanu bude tlak 80 kPa a zvýšenie napätia na detektore o 0,4 kV oproti základnému nastaveniu.

Toto zistenie sa využilo pri určovaní molekulových hmotností nečistôt u skúmanej látky 1,3-butandiolu.

## 5.7 Hmotnostné spektra nečistôt 1,3-butandiolu pomocou CI (isobután) (GC/MS)

### Chromatografické podmienky:

#### GC

Teplota injektoru	250°C
Nosný plyn: He	
Tlak	185,4 kPa
Rýchlosť nástriku	150,0 cm/sek
Split	5,0

#### Kolóna

Supelcowax 10	
Dĺžka	30,0 m
Priemer	0,32 mm ID
Hrúbka filmu	0,50 µm

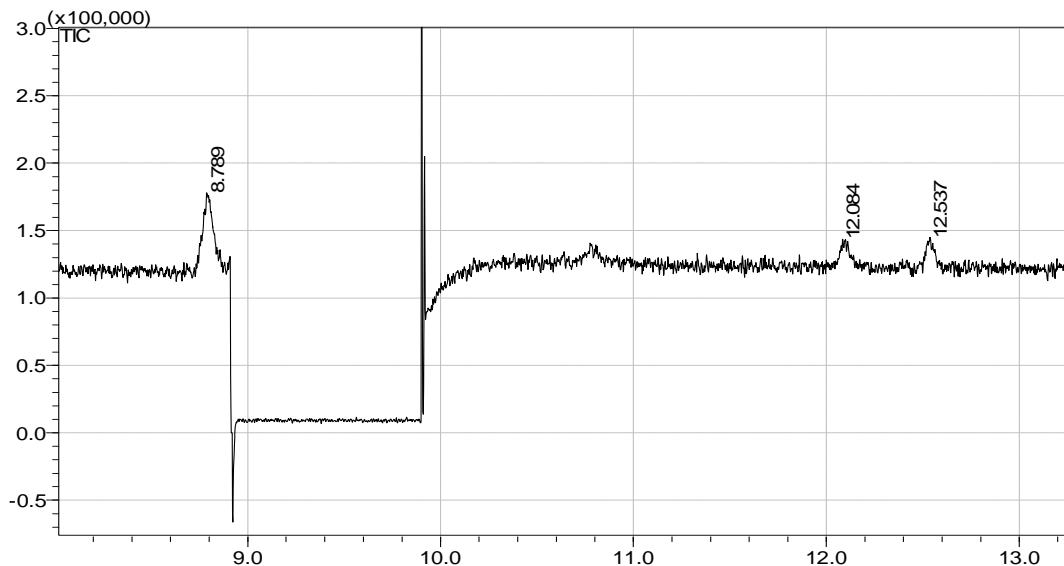
### Teplotný program:

Gradient °C/min	Teplota (°C)	Čas (min.)
-	110,0	4,50
5,0	150,0	2,00

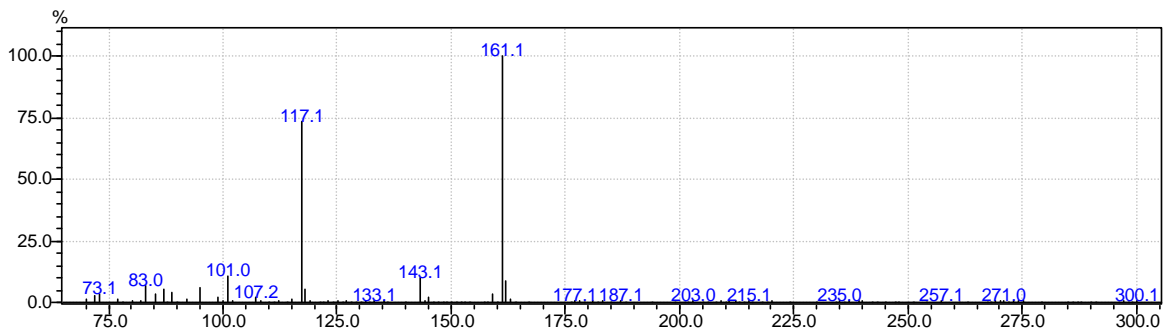
#### MS

Teplota ionizátora	200°C
Rozmedzie detektoru	70,00 – 300,00 <i>m/z</i>
Napätie na detektore zvýšené o	+ 0,4 kV

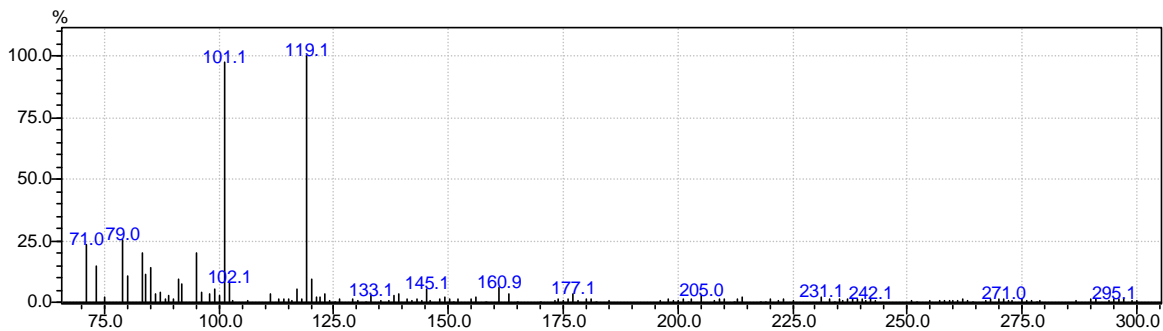
Na Obr. 28 je znázorněný chromatogram skúmaných nečistôt za použitia isobutanu ako ionizačného plynu v GC/MS. Z neho sú následne na Obr. 29, 30 a 31 znázornené ich hmotnostné spektrá.



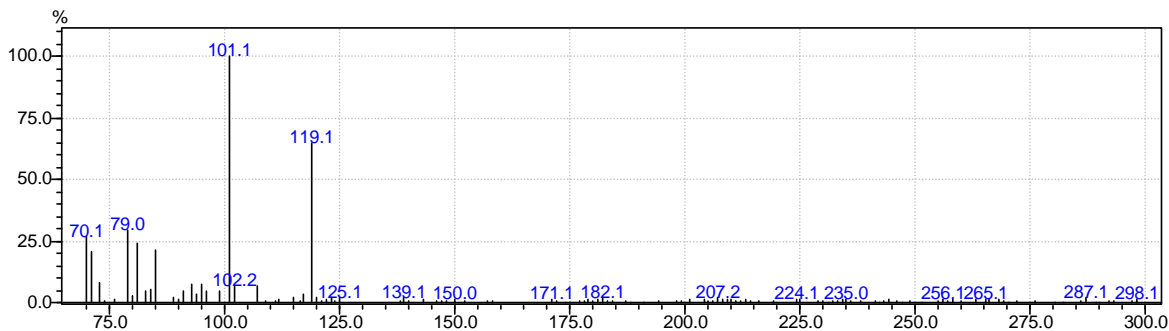
Obr. 28: Chromatogram nečistôt 1,3 butandiolu.



Obr. 29: Hmotnostné spektrum píku s retenčným časom 8,789 z Obr.28.



Obr. 30: Hmotnostné spektrum píku s retenčným časom 12,084 z Obr.28.



Obr. 31: Hmotnostné spektrum píku s retenčným časom 12,537 z Obr.28.

Pomocou chemickej ionizácií s použitím isobutánu sa dospelo k zreteľným výsledkom hmotnosti molekúl skúmaných nečistôt 1,3-butandiolu.

Hmotnosť molekuly u nečistoty, ktorá predstavuje pík s retenčným časom 8,789 (pík s retenčným časom 9,806 na Obr. 8) je 161  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

Hmotnosť molekuly u nečistoty, ktorá predstavuje pík s retenčným časom 12,084 (pík s retenčným časom 11,468 na Obr. 8) je 119  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

Hmotnosť molekuly u nečistoty, ktorá predstavuje pík s retenčným časom 12,537 (pík s retenčným časom 11,681 na Obr. 8) je 119  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

Z nameraných hodnôt sa dá vyčítať, že skúmané nečistoty sa skladajú z uhlíka, vodíka a kyslíka a neobsahujú prvky ako chlór, bróm síra a iné. Z hmotnostného spektra sa dá odhadnúť aj počet uhlíkov v molekule.

Zisťovanie presnej štruktúry skúmaných nečistôt ako aj prípadných rozkladných produktov 1,3-butandiolu bude náplňou rigorózneho práce.

## 6 ZÁVER

Z analýzy 1,3-butandiolu pomocou GC-FID vyplýva, že v substancií sa okrem 1,3-butandiolu vyskytujú ešte ďalšie tri látky ako nečistoty (vedľajšie produkty výroby poprípade rozkladné produkty). Pomocou rôznych metód sme sa snažili určiť ich molekulovú hmotnosť.

Postupovalo sa najprv elektrónovou ionizáciou v GC/MS. Z hmotnostného spektra sa nedá vyčítať molekulová hmotnosť nečistôt, pretože chýba  $M^+$

Za použitia chemickej ionizácie v GC/MS a ionizačného plynu methanu je hmotnostné spektrum lepšie, ale ešte stále nie je jasné akú má molekulovú hmotnosť nečistota.

Ďalším spôsobom určenia hmotnosti nečistôt bola derivatizácia – acetylácia. Z rôznych spôsobov acetylácie je najlepšia derivatizácia 1,3-butandiolu pomocou acetylchloridu. Po chemickej ionizácii s methanolom sa však opäť nedospelo k žiadnému výsledku, takže ani k molekulovej hmotnosti nečistôt.

Až za použitia isobutánu ako ionizačného plynu v chemickej ionizácii GC/MS sa zistili molekulové hmotnosti nečistôt. Isobután je šetrnejší k fragmentácii molekúl, tým pádom sa na hmotnostnom spektre výraznejšie ukázala hmotnosť molekuly  $(M+H)^+$ .

Z nameraných výsledkov je vidieť, že ako najlepšia metóda pre zistenie hmotnosti nečistôt 1,3-butandiolu je chemická ionizácia pomocou isobutánu v GC/MS.

Z Obr.8 má pík s retenčným časom 9,806 molekulovú hmotnosť 161  $m/z$   $(M+H)^+$ , pík s retenčným časom 11,468 hmotnosť 119  $m/z$   $(M+H)^+$  a pík s retenčným časom 11,681 hmotnosť 119  $m/z$   $(M+H)^+$ .

S týmito výsledkami sa ďalej pracovalo v rigoróznej práci, kde sme sa snažili určiť molekulovú štruktúru nečistôt.

## 7 ABSTRAKT

# ABSTRAKT

## Identifikace příbuzných látek pomocí GC-MS

Diplomová práce

Jaroslav Kušnír

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Bola zisťovaná molekulová hmotnosť za účelom identifikácie troch nečistôt, ktoré boli zistené v substancií 1,3-butandiolu pri analýze pomocou GC/FID. Pre zisťovanie molekulovej hmotnosti sa využila technika GC/MS. K ionizácii vzorky boli použité nasledujúce techniky - elektrónová ionizácia, chemická ionizácia pomocou ionizačného plynu methanu a isobutanu. K získaniu stabilnejšieho molekulárneho iontu boli skúšané aj rôzne typy derivaizačných reakcií (napr. acetylácia). Výsledky neboli však uspokojivé.

Ako najlepšia metóda pri zisťovaní molekulovej hmotnosti nečistôt sa ukázala chemická ionizácia pomocou ionizačného plynu isobutanu. Ten je šetrnejší ionizačný plyn ako je metan a preto sa v hmotnostnom spektre môže objaviť intenzívnejší iont  $(M+H)^+$ , z ktorého sa dá určiť molekulová hmotnosť. Okrem zisťovaní molekulových nečistôt sa skúmali aj najlepšie podmienky pri používaní ionizačného plynu isobutanu v GC/MS. Z meraní vyšlo, že najlepšie podmienky sú pri tlaku plynu 80 kPa a zvýšeného napätia na detektore o 0,4 kV oproti základnému nastaveniu.

Boli stanovené molekulové hmotnosti všetkých troch študovaných nečistôt, a to  $M_r = 160 - m/z (M+H)^+ = 161$ ,  $M_r = 118 - m/z (M+H)^+ = 119$ ,  $M_r = 118 - m/z (M+H)^+ = 119$ . Vzhľadom k veľkej podobnosti spektier látok s  $M_r = 119$  sa jedná s najväčšou pravdepodobnosťou o polohové izomery. Tieto experimentálne dáta budú využité k určeniu štruktúry nečistôt 1,3-butandiolu.

## 8 ABSTRACT

---

# ABSTRACT

## Identification of Related Substances Using GC-MS

Thesis

Jaroslav Kušnír

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

A molecular weight was researched for the purpose of identifying three foreign matters, which were found in 1,3-butanediol substance during GC/FID. GC/MS technique was used for researching molecular weight. Following techniques were used to ionize the samples - electron ionization, chemical ionization using methane and isobutene reagent gases. To acquire a more stable molecular ion, different derivative reactions were tried as for example acylation. Nevertheless result were not satisfiable.

Chemical ionization using isobutene reagent gas was found to be the most effective for researching molecular weight of the foreign matters. Isobutene is more sensitive reagent gas than methane and therefore a more intensive ion  $(M+H)^+$  can be found in the mass spectrum, from which it is possible to define molecular weight. Apart from researching molecular foreign matters, the best conditions for using reagent gas isobutene in GC/MS were examined. From the measuring it was found that the best conditions are during 80 kPa pressure and increased voltage by 0.4 kV from the default setting of the detector.

Molecular weight of all of the three examined foreign matters was set as follows  $M_r = 160 - m/z (M+H)^+ = 161$ ,  $M_r = 118 - m/z (M+H)^+ = 119$ ,  $M_r = 118 - m/z (M+H)^+ = 119$ . Because of the large similarities between the specters of the substances with  $M_r = 119$ , it is most probably a position isomer. These experimental data will be used to define the structure of foreign matters of 1,3-butanediol.

## 9 POUŽITÁ LITERATÚRA

- 
- <sup>1</sup> Slovenský liekopis, prvé vydanie (SL 1), Obzor, Bratislava 2005
- <sup>2</sup> Popl, M. a kol.: Instrumentální analýza, SNTL – nakladatelství technické literatury, Praha 1986
- <sup>3</sup> Karlíček, R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2001
- <sup>4</sup> Český lékopis 2009 (ČL 2009), Grada, Praha 2009
- <sup>5</sup> Schéma GC, Wikibooks [online] 2006 [cit. 2010-03-30] dostupné na <<http://en.wikibooks.org/w/index.php?title=File:SchemaGC.png&filetimestamp=20061029184003>>
- <sup>6</sup> Literák J., Plynová chromatografie, Ústav chemie, Masaryková univerzita [online] 2007 [cit. 2010-03-30] dostupné na <<http://www.chemi.muni.cz/~literak/uvod.pdf>>
- <sup>7</sup> Čajka T., přednáška Analýza potravin a přírodních produktů, Ústav chemie a analýzy potravin, Vysoká škola chemicko-technologická [online] 2010 [cit. 2010-03-30] dostupné na <[http://web.vscht.cz/cajkat/doc/tutorials/ANP\\_seminar\\_09.pdf](http://web.vscht.cz/cajkat/doc/tutorials/ANP_seminar_09.pdf)>
- <sup>8</sup> D. Rood: A Practical Guide to the Care, Maintenance, and Troubleshooting of Capillary Gas Chromatography System, 3<sup>rd</sup> Edition, Wiley, 1999
- <sup>9</sup> Riddelová K., Plynová chromatografie – kolóny, Ústav chemie a analýzy potravin, Vysoká škola chemicko-technologická [online] 2009 [cit. 2010-03-30] dostupné na <[http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM\\_GC\\_KOLONY\\_1107.pdf](http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM_GC_KOLONY_1107.pdf)>
- <sup>10</sup> Restek GC Column Selection Guide, Restek [online] 2010 [cit. 2010-03-30] dostupné na <[http://www.restek.com/guide\\_gccolselel\\_sect2.asp](http://www.restek.com/guide_gccolselel_sect2.asp)>
- <sup>11</sup> Van Deemter graf, DalcoChromtech [online] 2008 [cit. 2010-03-30] dostupné na <<http://www.dalcochromtech.se/ctnytt/ct0803/b%C3%A4rgaser.jpg>>
- <sup>12</sup> Van Deemter graf, Wordpress [online] 2008/09 [cit. 2010-03-30] dostupné na <<http://afewideas.files.wordpress.com/2008/09/van-deemter5.jpg>>
- <sup>13</sup> Riddelová K., Plynová chromatografie – základní teorie, Ústav chemie a analýzy potravin, Vysoká škola chemicko-technologická [online] 2009 [cit. 2010-03-30] dostupné na <[http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM\\_GC\\_TEORIE\\_1007.pdf](http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM_GC_TEORIE_1007.pdf)>
- <sup>14</sup> Grob, R., L., Barry, E., F.: Modern practice of gas chromatography 4th ed., Wiley-Interscience, New Jersey 2004
- <sup>15</sup> Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2006
- <sup>16</sup> Kašer P., Syslová K., Použití GC/MS spektrometrie, Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická [online] 2008 [cit. 2010-03-30] dostupné na <<http://www.vscht.cz/kot/resources/studijni-materialy/lab/c.pdf>>
- <sup>17</sup> Hübschmann, H., J.: Handbook of GC/MS, Wiley-VCH, Weinheim 2009
- <sup>18</sup> Gross, Jürgen H.: Mass Spectrometry - A Textbook, Springer, Heidelberg 2004
- <sup>19</sup> Vrešťál, J. a kol.: Hmotnostní spektrometrie, Vydavatelství MU, Brno 1998
- <sup>20</sup> Holčapek M., Hmotnostní spektrometrie, Katedra analytické chemie, Fakulta chemických technologií, Univerzita Pardubice [online] 2009 [cit. 2010-03-30] dostupné na <[http://holcapek.upce.cz/teaching/MS\\_exper\\_vyzkum\\_cast2.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_exper_vyzkum_cast2.pdf)>

<sup>21</sup> Quadrupole mass analyzer, The University of Adelaide [online] 2003 [cit. 2010-03-30] dostupné na <<http://www.chemistry.adelaide.edu.au/external/soc-rel/content/images/quad-sch.png>>

<sup>22</sup> Bulletin 909A, Guide to derivatization reagents for GC, Sigma-Aldrich 1997

<sup>23</sup> 1,3-Butanediol, Wikipedia [online] 2010 [cit. 2010-03-30] dostupné na <[http://en.wikipedia.org/wiki/1,3-Butanediol#cite\\_ref-0](http://en.wikipedia.org/wiki/1,3-Butanediol#cite_ref-0)>

<sup>24</sup> Vohlídal, J., Julák, A., Štulík, K.: Chemické a analytické tabulky, Grada, Praha 1999

<sup>25</sup> Institut of medicine of the national academies: Food Chemical Codex 5, 2004

<sup>26</sup> SPC Otobacid N [online] 2008 [cit. 2010-03-30] dostupné <[www.torrex.cz/sukl/SPC81595otobacid.doc](http://www.torrex.cz/sukl/SPC81595otobacid.doc)>