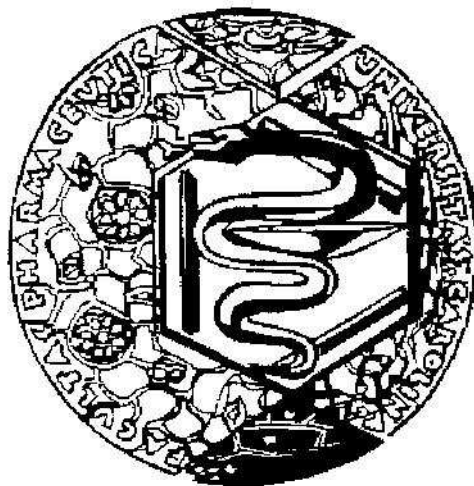


**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**



**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

*Analýza statinů metodou plynové chromatografie*

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

*Hradec Králové 2007*

*Soňa Pavlovičová*

Děkuji PharmDr. Radkovi Sladkovskému, Ph.D. a RNDr. Daliborovi Šatinskému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a všestrannou pomoc při vypracování diplomové práce. Dále děkuji všem pracovníkům katedry analytické chemie za ochotu a pomoc.

1	ÚVOD PRÁCE.....	6
1.1	Úvod práce.....	7
2	CÍL PRÁCE.....	8
2.1	Cíl práce.....	9
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1	Plynová chromatografie.....	11
3.1.1	Plamenový ionizační detektor .....	13
3.2	Chemická derivatizace v plynové chromatografii.....	15
3.2.1	Používání derivátů při chromatografické analýze a obecné zásady jejich přípravy.....	15
3.3	Derivatizace hydroxysloučenin pro GC analýzu.....	17
3.3.1	Silylace .....	19
3.3.2	Acylace .....	23
3.3.3	Alkylace.....	24
3.4	Hlavní aspekty plynové chromatografie.....	26
3.4.1	Využití plynové chromatografie.....	26
3.4.2	Výhody a limitace.....	27
3.5	Teorie plynové chromatografie .....	29
3.5.1	Difúzní (dynamická) teorie.....	30
3.5.2	Efektivní počet teoretických pater.....	34
3.5.3	Rozlišení .....	35
3.6	Chromatografická účinnost kapilárních kolon .....	36
3.6.1	Golayova rovnice versus van Deemterův výraz.....	36
3.6.2	Volba nosného plynu.....	38
3.6.3	Měření lineární průtokové rychlosti .....	39
3.6.4	Distribuční poměr v GC .....	40
3.6.5	Průměr kolony .....	42
3.6.6	Tloušťka filmu stacionární fáze.....	42
3.6.7	Délka kolony .....	43
3.7	Statiny.....	45
3.7.1	Charakteristika.....	45
3.7.2	Vzorce.....	46
3.7.3	Metabolismus .....	47

4	PRAKTICKÁ ČÁST .....	50
4.1	Použité chemikálie.....	51
4.2	Použité roztoky .....	52
4.2.1	Příprava roztoků léčiv.....	52
4.2.2	Příprava vzorků .....	53
4.3	Použité přístroje.....	54
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	55
5.1	Analýza statinů plynovou chromatografií .....	56
5.1.1	Výběr derivatizačního činidla.....	56
5.1.2	Výběr vhodného vnitřního standardu .....	59
5.1.3	Výběr optimální teploty pro derivatizaci.....	59
5.1.4	Volba času nutného pro derivatizaci .....	60
5.1.5	Množství derivatizačního činidla.....	62
5.1.6	Optimalizace citlivosti metody .....	64
5.1.7	Limit detekce a kvantifikace píku .....	67
6	ZÁVĚR.....	68
7	LITERATURA .....	70

## Seznam použitých zkratek:

headspace	nástříková metoda pro těkavé látky
MTBSTFA	<i>N</i> -( <i>tert</i> -butyldimethylsilyl)- <i>N</i> -methyltrifluoroacetamid
BSA	<i>N,O</i> - <i>bis</i> (trimethylsilyl)acetamid
BSTFA	<i>N,O</i> -( <i>bis</i> (trimethylsilyl)trifluoroacetamid)
MSTFA	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -trimethylsilyltrifluoroacetamid
TMCS	trimethylchlorsilan
TMSI	<i>N</i> -trimethylsilylimidazol
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPLC-UV	vysokoučinná kapalinová chromatografie s UV detektorem
GC	plynová chromatografie
GSC	plynová chromatografie s pevnou stacionární fází
GLC	plynová chromatografie s kapalnou stacionární fází
TCD	tepelně vodivostní detektor
MS	hmotnostní spektrometr
ECD	detektor elektronového záchytu
FID	plamenově ionizační detektor
TID, NPD	termoionizační detektor
PID	fotoionizační detektor
FDP	plamenofotometrický detektor
RI	retenční index
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
VLDL	lipoprotein s velmi nízkou hustotou
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A

# 1 Úvod práce

## 1.1 Úvod práce

Kardiovaskulární onemocnění postihují v různé podobě velkou část naší populace. Patří mezi tzv. civilizační choroby, tedy choroby spojené do značné míry s naším životním stylem. Velmi často předepisovanou skupinou léků jsou proto také hypolipidemika, tedy léčiva snižující hladinu cholesterolu a triacylglycerolů v krvi. Do této skupiny patří také statiny, např. simvastatin, atorvastatin, ale také fluvastatin, pravastatin, cerivastatin.

Plynová chromatografie – Gas Chromatography (GC) má v analýze léčiv menší uplatnění než vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), nicméně jako citlivá analytická metoda s velkou separační účinností je využívána ve všech lékopisech vyspělých zemí. Plynová chromatografie se především využívá pro analýzu látek těkavých, které lze zahřátím převést na páry aniž dochází k jejich rozkladu. Přirozeně je s výhodou použitelná pro analýzu plynů. U látek, které se zvýšenou teplotou rozkládají (většina léčiv), je nutné před GC analýzou podrobit analyzovaný vzorek chemické reakci s vhodnými derivatizačními činidly (tzv. derivatizace) za vzniku těkavých derivátů analyzovaných látek.[1]

## **2 Cíl práce**



## 2.1 Cíl práce

Cílem této práce bylo využití plynové chromatografie (GC) v analýze vybraných léčiv ze skupiny hypolipidemik - inhibitorů 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktázy (simvastatin, atorvastatin).

Předmětem bylo nalezení vhodného derivatizačního činidla, které s daným léčivem dává následně těkavý produkt detekovatelný pomocí plamenově-ionizační detekce. Podmínky reakce při derivatizaci byly optimalizovány s cílem získat maximální výtěžnost produktu a ve spojení s chromatografickým systémem zvýšit mez detekce vhodnou metodou nástříku.

## **3 Teoretická část**

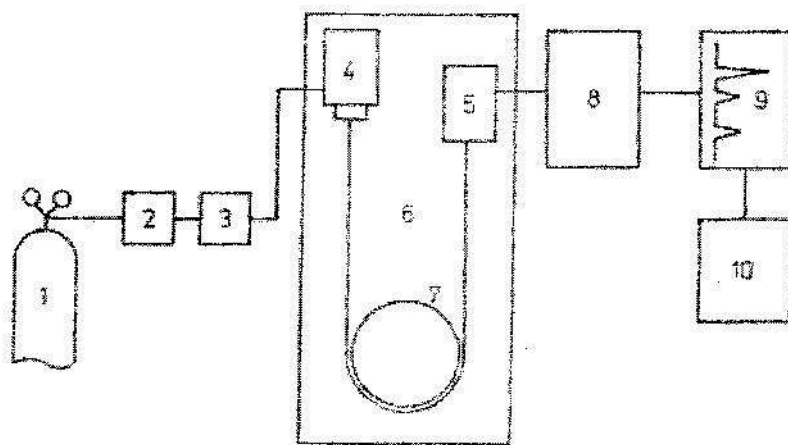
### 3.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie – jako separační metoda s možností kvalitativního i kvantitativního hodnocení separovaných složek – má v podstatě stejné přednosti jako HPLC; některé detektory (např. detektor elektronového záchytu) dosahují mimořádně vysokých citlivostí.

Jako mobilní fáze se v plynové chromatografii nejčastěji používá dusík nebo helium. Kolony se používají buď náplňové nebo kapilární:

- a) náplňové kolony jsou trubice z nerezové oceli nebo skla naplněné granulovaným adsorbentem pro GSC nebo nosičem se zakotvenou kapalnou stacionární fází pro GLC. Analytické náplňové kolony mají vnitřní průměr 2 až 5mm a délku 0,5 až 5m.
- b) kapilární kolony jsou tenké kapiláry z nerezové oceli nebo skla stočené do šroubovice o vnitřním průměru 0,1 až 0,5mm a délce 10 až 100m. Funkci nosiče zastávají vnitřní stěny kapiláry, které jsou povlečeny kapalnou stacionární fází.[1]

Obr. 1 – Schéma plynového chromatografu



Popis: 1- zásobník nosného plynu; 2 - regulace tlaku; 3 – regulace průtoku; 4 – dávkovací zařízení; 5 - detektor; 6 – termostat; 7 – chromatografická kolona; 8 – zesilovač; 9 – zapisovač; 10 – integrátor [2]

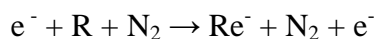
Stejně jako v HPLC je i v plynové chromatografii předpokladem úspěšné analýzy optimalizace chromatografických podmínek tak, aby separované složky směsi poskytovali ostré píky, rozdělené až na základní linii. Stejně jako v HPLC je v plynové chromatografii kvalitativní charakteristikou retenční (eluční) čas  $t_R$  chromatografického píku a kvantitativní charakteristikou jeho plocha (event. výška). Podle charakteru analyzovaného vzorku je třeba zvolit vhodný typ detektoru, který primárně určuje citlivost chromatografické analýzy. Níže je uveden přehled nejčastěji používaných detektorů.

A) tepelně vodivostní detektor (TCD)

B) ionizační detektory

a) Hmotnostní spektrometr (MS). Principem MS je ionizace neutrálního atomu či molekuly za vzniku iontů a jejich fragmentů, které jsou dále separovány a detekovány na základě poměru  $m/z$ , kde  $m$  je hmotnost iontu a  $z$  je náboj iontu. MS patří mezi detektory univerzální s citlivostí 1 ng až 10 pg.

b) Detektor elektronového záchytu (ECD). Principem měření ECD je ionizace nosného plynu  $\beta$  zářením (zdroje záření  $^{63}\text{Ni}$  nebo  $^3\text{H}$ ) za vzniku ionizačního proudu, tj. konstantního proudu pomalých elektronů ( $\text{N}_2 + \beta \rightarrow \text{N}_2^+ + e^-$ ). Elektrony jsou zachycovány elektronegativními atomy (halogeny) nebo skupinami (nitroskupiny):

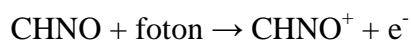


Tento detektor je selektivní pro elektronegativní skupiny, zejména halogeny, popř. nitrolátky. Dosahuje citlivosti 0,05 – 1,0 pg Cl<sup>-</sup> ve sloučenině.

c) Plamenionizační detektor (FID).

d) Termoionizační detektor (TID), v literatuře často označován NP detektor (NPD). Principem TID je ionizace organických látek v kyslíkovodíkovém plameni, který je veden přes prstenec solí alkalických zemin (CsBr, KCl, Rb<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). V podstatě se jedná o modifikaci FID. Detektor je selektivní především pro sloučeniny obsahující ve své molekule dusík a fosfor a dosahuje citlivosti 0,4 – 10 pg N a 0,1 – 1,0 pg P.

e) Fotoionizační detektor (PID). Tento detektor je založen na principu ionizace organických látek fotonem a následné detekci uvolněných elektronů:



PID je univerzální pro organické látky a dosahuje citlivosti 1 – 10 pg CHO.

- f) Plamenofotometrický detektor (FPD). Princip FDP je založen na aktivaci organických látek obsahujících fosfor nebo síru v kyslíkovodíkovém plameni. Aktivované látky emitují záření, které je detekováno. Detektor je selektivní pro sloučeniny obsahující ve své molekule fosfor nebo síru a dosahuje citlivosti 0,9 pg CHP a 20 pg CHS.[1]

Ionizační detektory jsou založeny na přímé úměrnosti elektrické vodivosti plynu vyvolané nabitými částicemi, jejichž koncentrace je úměrná koncentraci vzorku přivedeného do detektoru. Plyny vystupující z chromatografické kolony procházejí ionizačním zdrojem, v němž se část molekul ionizuje. Pak vstupují do prostoru mezi elektrodami. Přítomnost nabitých částic v tomto prostoru vyvolá proud I mezi elektrodami. V důsledku změny napětí na  $R_1$  dojde i ke změně napětí na  $R_2$ , které se zesiluje elektrometrem a registruje zapisovačem. Prostor mezi elektrodami si můžeme představit jako měnitelný odpor  $R_1$ , jehož hodnota závisí na počtu nabitých částic. Prochází-li čistý nosný plyn, je koncentrace nabitých částic v mezielektrodovém prostoru konstantní a způsobí konstantní proud. Jestliže však prochází tímto prostorem nosný plyn se složkou, vzroste zpravidla počet nabitých částic, čímž se zvýší proud, a tedy i signál, který se registruje jako chromatografická vlna.[3]

### 3.1.1 Plamenový ionizační detektor

Princip detekce pomocí FID je založen na složité chemiionizační reakci organických látek v kyslíkovodíkovém plameni. Při této reakci se z organických látek uvolňují ionty, které jsou následně detekovány:



Detektor je univerzální pro organické látky, přičemž kyslík nebo dusík v molekule zvyšují výsledný signál. Dosahuje citlivosti 10-100 pg CHO.[1]

Efluent z kolony se mísí s vodíkem a vstupuje do trysky hořáčku detektoru. Ionizované částice, vzniklé v plameni, zaplňují prostor mezi elektrodami a snižují jeho odpor, takže může procházet proud. Plamenový ionizační detektor dává odezvu téměř na všechny látky s výjimkou těch, které jsou uvedeny v tabulce Tab. 1. Správná funkce tohoto detektoru závisí na vhodné volbě průtoku všech použitých plynů. Obecně se nejlepší citlivosti a stability dosáhne při průtocích nosného plynu 30-50 ml/min, vodíku asi

30ml/min a vzduchu asi 300 až 500ml/min. Rychlost průtoku plynu je třeba volit podle průměru trysky hořáku a podle konstrukce detektoru. Plamenový ionizační detektor má největší lineární rozsah ze všech užívaných detektorů. To je spolu s jeho vysokou citlivostí činí obzvláště způsobilým pro stopovou analýzu.[3]

Tab. 1 - Sloučeniny, které dávají malou nebo nedávají žádnou odezvu v plamenovém ionizačním detektoru.

H <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	NO	H <sub>2</sub> O
He	N <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> O	SiCl <sub>4</sub>
Ar	CS <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	SiHCl <sub>3</sub>
Kr	COS	NH <sub>3</sub>	SiF <sub>4</sub>
Ne	H <sub>2</sub> S	CO	HCOH
Xe	SO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	HCOOH

Podle techniky provedení lze plynovou chromatografii dělit na frontální, vytěšňovací a eluční. Naprostá většina plynově chromatografických analýz je prováděna eluční technikou. Eluční technika vyžaduje jednorázové vnesení malého množství analyzované směsi na počátek kolony. Její jednotlivé složky opouštějí kolonu odděleně, přičemž se snažíme vést chromatografický proces tak, aby profil koncentrace složek v detektoru, zaznamenávaný jako pík, se co nejvíce blížil Gaussově křivce s nejmenší dosažitelnou šířkou.

Podle toho jakých stacionárních fází se v plynové chromatografii používá, rozlišujeme chromatografické systém plyn-kapalina a plyn-adsorbent. V systému plyn-kapalina je mírou sorpce a tedy i mírou retence (zádrže) složky v koloně rozpouštěcí entalpie; v systému plyn-adsorbent je to adsorpční entalpie. Fázové rovnováhy pro dané systémy popisujeme sorpční (adsorpční nebo rozpouštěcí) izotermou. Pro dosažení účinné separace je nutné zvolit fázový systém tak, aby sorpční izotermy byli lineární. Systémy s nelineárními izotermami vedou k deformaci píků, která se projeví zhoršením separace (snížením účinnosti kolony) a znesnadněním interpretace chromatogramů.[3]

## 3.2 Chemická derivatizace v plynové chromatografii

Plynovou chromatografií, jak již plyne z názvu, lze separovat a analyzovat látky, které vykazují při podmínkách analýzy dostatečnou těkavost. Existuje řada možností jak těkavost za uvedených podmínek řídit. V této souvislosti můžeme jmenovat vysokotepebnou chromatografii, programování teploty, použití vysoce selektivních sorbentů, práci v systémech s nízkým obsahem sorbentu, vysokotlakou a superkritickou chromatografií až přechod ke kapalinové chromatografii a v neposlední řadě chemickou přeměnu samotných chromatografovaných látek na těkavější deriváty. Poslední metoda se od předchozích liší v tom, že zatímco všechny postupy předpokládají řízení těkavosti a chromatografovatelnosti látek na základě změn podmínek a vlastností chromatografického systému, chemická derivatizace mění přímo vlastnosti chromatografovaných látek.

Nízká těkavost může být způsobena tím, že látka je sice nepolární, ale má velkou molekulu, nebo tím že molekuly látky jsou vzájemně asociovány prostřednictvím polárních skupin. Chemická derivatizace blokuje možnost mezimolekulárních asociací a omezuje reaktivitu látky. Kromě toho lze vhodně volenou derivatizací udělit molekule některé výhodné vlastnosti z hlediska možnosti selektivní separace a případně selektivní detekce.

### 3.2.1 Používání derivátů při chromatografické analýze a obecné zásady jejich přípravy

Obvyklými důvody jsou zvýšení těkavosti látek s vysokým bodem varu, snížení adsorbce na koloně a zlepšení separace jednotlivých složek.

Látky s vysokou molekulovou hmotností a několika funkčními skupinami v molekule nejsou obvykle přístupné přímé chromatografické analýze. Polární skupiny přispívají k polaritě látek a snižují jejich těkavost, takže se tyto látky eluují z kolony s velmi dlouhými retenčními časy, popřípadě se neeluují vůbec. Vhodným blokováním polárních funkčních skupin nebo jejich nahrazením se dá polarita látek snížit, jejich těkavost je vyšší a tyto látky je pak možno chromatografovat.

Chromatografické analýze řady látek brání jejich teplotní nestálost. V nástřikovém prostoru se takové látky pyrolyzují a v chromatogramu se objevují násobné píky.

Převedením na teplotně stabilní deriváty se tyto obtíže obejdou a látky lze stanovit bez rozkladu. Velmi polární látky s nízkou těkavostí mají zpravidla silné sklony k adsorbci, případně rozkladu na nosiči. Kvantitativní vyhodnocení chromatogramů je pak velmi obtížné, ne-li vůbec nemožné.

Chvostování píků může způsobovat i vysoká koncentrace analyzované látky. Při vyšších koncentracích obvykle dochází k odchýlkám od linearit sorpční izotermy. I zde lze často použít derivát, který uvedené nevhodné vlastnosti nemá.

Adsorpce v koloně vede zpravidla k nelinearitě kalibrační křivky. Použitím vhodného derivátu tak lze dosáhnout lineární závislosti výšky píku na velikosti vzorku i pro velmi nízké koncentrace látek.

Adsorbci na nosiči a chvostování může obecně způsobovat karboxylová a hydroxylová skupina, hlavně u polyfunkčních sloučenin s vyšší molekulovou hmotností.

Řada derivátů se při delším uchovávání rozkládá působením zvýšené teploty, vlhkosti, světla apod..[4]



### 3.3 Derivatizace hydroxysloučenin pro GC analýzu

Hydroxylová skupina vedle karboxylové je jednou z nejrozšířenějších funkčních skupin v organických sloučeninách. Důležité biogenní látky (sacharidy, flavonoidy, fenolické kyseliny, atd.) patří do skupiny hydroxysloučenin. Problematika derivatizace karboxylové skupiny viz diplomová práce.[5]

Jedna z hlavních metabolických cest různých xenobiotik a léčiv v těle spočívá v jejich hydroxylaci a následné tvorbě konjugátů se sacharidy nebo aminokyselinami. Například, oxidace rozšířeného polutantu životního prostředí – polychlorovaných bifenyly (PCB) – cytochromem P450 vede ke vzniku hydroxypolychlorovaných bifenyly. Stanovení hydroxysloučenin byl jeden z důležitých problémů GC analýzy po dobu téměř půl století existence této metody.

Jednoduché pravidlo pro určení možnosti GC analýzy organické sloučeniny je založeno na referenčních údajích o jejich bodu varu. Jestliže nějaká sloučenina může být destilována bez rozkladu v rozmezí tlaků od atmosférického po 0.01- 0.1 torrů, pak může být podrobena GC analýze, přinejmenším na standardní nepolární polydimethylsiloxanové stacionární fázi. V souladu s tímto pravidlem, většina jednosytných hydroxylových sloučenin (alkoholy, fenoly) a jejich sírné analogy (thioly, thiofenoly atd.) mohou být přímo analyzovány. Potvrzení chromatografických vlastností analytu nemůže být pouze slovní (na úrovni „ano/ne“), ale také založeno na jejich GC retenčních indexech podle Kovatse, jakožto nejobektivnějších kritériích.[6]

#### Kovatsův retenční index

Tento univerzální přístup řeší problémy vztahující se k použití, srovnávání a charakterizaci chromatografických retenčních dat. Udávání retenčních dat jako absolutní retenční čas  $t_R$  není vhodné, protože retenční čas může být ovlivněn řadou chromatografických parametrů.[7]

Retenční index RI je vypočten z retence analyzované látky  $i$  vzhledem ke dvěma nerozvětveným parafinům se  $z$  resp.  $(z + n)$  uhlíky volenými tak, aby čistý retenční objem byl  $V_{N(z)} \leq V_{N(i)} \leq V_{N(z+n)}$ . Nejvýhodnější je volit  $n = 1$ . [6]

Retenční index se vypočítá podle vztahu

$$RI = 100 \left[ z + n \frac{\log V_{N(i)} - \log V_{N(z)}}{\log V_{N(z+n)} - \log V_{N(z)}} \right]$$

Tab. 2 - Teplota varu a RI vybraných sloučenin

Sloučenina	T <sub>v</sub> (°C)	RI (nepolární)
tetradekanol	290,8	1664 ± 12
dekanthiol	239.2	1320 ± 7
2,6-di- <i>terc</i> -butyl-4-methylfenol	265	1491 ± 10
2-methylbenzenthioi	194	1061 ± 11

Chemické vlastnosti hydroxysloučenin závisí na přítomnosti aktivních vodíkových atomů v molekule. Hodnoty pK<sub>a</sub> pro alifatické alkoholy jsou srovnatelné s vodou (≈ 16), ale fenoly jsou slabými kyselinami (pK<sub>a</sub> ≈ 9-10). Zvýšení počtu polárních funkčních skupin v molekule vede k zesílení intermolekulárních interakcí. To se projevuje zvýšením bodu tání a bodu varu, což může zvýšit limity teplotní stability sloučenin. Například některé alifatické dioly a trioly vřou za atmosferického tlaku a z toho důvodu jsou dostatečně těkavé pro GC analýzu. Obdobné sloučeniny se čtyřmi nebo více hydroxylovými skupinami nejsou schopné varu za atmosférického tlaku, to znamená nemožnost jejich GC analýzy. Stejná omezení platí v řadě vícesytných fenolů:

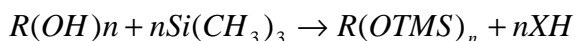
Tab. 3 - Teplota varu a RI vybraných vícesytných sloučenin

Sloučenina	T <sub>v</sub> (°C)	RI (nepolární)
glycerol (3 OH skupiny)	290,5	1196 ± 28
hydrochinon	287	1338 ± 14
<i>meso</i> -erythritol (4 OH skupiny)	329-331	1319
pyrogallol	309	1548
xylitol (5 OH skupin)	-	-
1,2,4-benzentriol	-	-

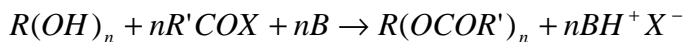
I když byly analyzovány nejjednodušší dvojsytné sloučeniny z těchto skupin na nepolární fázi, tak jevíly široké nesymetrické píky na chromatogramu. To vedlo ke špatným detekčním limitům a reprodukovatelnosti retenčních indexů ve srovnání s nepolárními sloučeninami. Hlavní způsob, jak se vyhnout tomuto problému, je založen na přeměně hydroxysloučenin na termostabilní těkavé deriváty. Vyřešení tohoto problému je hlavním úkolem derivatizace. Tato chemická úprava může být použita nejen pro netěkavé sloučeniny, ale také pro látky těkavé. Méně polární látky typicky poskytují úzké chromatografické píky, což zajišťuje nižší poměr signálu k šumu a tím nižší detekční limity. Nepolární deriváty mají mnohem lepší reprodukovatelnost retenčních indexů mezi laboratořemi, ve srovnání s parametry získanými s prvotní polární sloučeninou.

Základní metody derivatizace hydroxysloučenin mohou být klasifikovány podle typu chemické reakce:

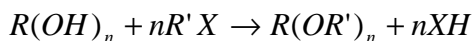
Silylace:



Acylace:



Alkylace:



### 3.3.1 Silylace

Velká skupina silylačních reakcí (nejvíce rozšířené jsou trimethylsilyl deriváty) naznačuje náhradu aktivního vodíkového atomu v molekule analytu silylovou skupinou poskytnutou z různých O-, N-, nebo C- silylačních činidel. Relativní pořadí reaktivity hydroxysloučenin je n-OH > sek.-OH > terc.-OH > Ar-OH > R-SH.

Tab. 4 - Fyzikálně-chemické a plynově chromatografické vlastnosti některých silylačních činidel

Činidlo (zkratka)	Mr	Tv (°C) (P)	RI(nepolární)	Vedl.produkt(RI nepolární) <sup>a</sup>
Hexamethyldisilazan (HMDS)	161	126	817±29	NH <sub>3</sub> (ND) <sup>b</sup>
Trimethylchlorosilan (TMCS)	108	57.7	560±8	HCl (ND)
<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -trimethylsilylacetamid (MSA)	145	159- 161	947±14	CH <sub>3</sub> CONHCH <sub>3</sub> (816±22)
<i>N</i> -trimethylsilyl diethylamine (TMSDEA)	145	125- 126	817±11 <sup>c</sup>	(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> NH (548±8)
<i>N</i> -trimethylsilyldimethylamin (TMSDMA)	117	84	660±4 <sup>c</sup>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH (425±16)
<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -trimethylsilyl trifluoracetamid (MSTFA)	199	130- 132	826±3 <sup>c</sup>	CF <sub>3</sub> CONHCH <sub>3</sub> (540)
<i>N,O</i> -bis-trimethylsilylacetamid (BSA)	203	71-73 (35)	1008 <sup>c</sup>	CH <sub>3</sub> CONH <sub>2</sub> (711±19)
<i>N,O</i> -bis-trimethylsilyltrifluoracetamid (BSTFA)	257	145- 147	887 <sup>c</sup>	CF <sub>3</sub> CONH <sub>2</sub> (675±11)
<i>N</i> -trimethylsilylimidazol (TMSI)	140	222- 223	1176±18 <sup>c</sup>	Imidazol (1072±17)
2-(trimethylsilyloxy)propen (I POTMS)	130	-	675±12	Aceton (472±12)
Chlormethyldimethyl chlorsilan (CMDCS)	142	114	755±8 <sup>c</sup>	HCl (ND)
<i>N</i> -trimethylsilylpyrolidin (TMSP)	143	139- 140	862±5 <sup>c</sup>	Pyrolidin (686±10)
Dimethyl- <i>terc</i> -butylchlorsilan (DMTBCS, TBDMS-Cl)	150	125	729±11 <sup>c</sup>	HCl (ND)
Ethyl(trimethylsilyl)acetát (ETSA)	160	156- 159	930±5 <sup>c</sup>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> (602±9)
<i>bis</i> -trimethylsilylmethylamin (BSMA)	175	144-	903±18 <sup>c</sup>	CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> (348±12)

		147		
Trimethylsilyltrifluoracetát (TMSTFA)	186	88-90	674±5 <sup>c</sup>	CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H (744±6)
Bromomethyl-dimethyl-chlorsilan (BMDCS)	186	-	842±14 <sup>c</sup>	HCl (ND)
<i>bis</i> -trimethylsilylformamid (BSFA)	189	158	948±14 <sup>c</sup>	HCONH <sub>2</sub> (637±6)
<i>bis</i> -trimethylsilylmočovina (BSU)	204	-	1237±11	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (ND)
<i>N,O</i> - <i>bis</i> -trimethylsilyl karbámová kyselina	205	77-78 (mp)	-	H <sub>2</sub> NCO <sub>2</sub> H, NH <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub> (ND)
Trimethylsilyltrifluormethan sulfonát	222	77 (80)	-	CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> OH
Dimethyl- <i>terc</i> -butylsilyltrifluoracetamid (MTBSTFA)	241	168-170	996±13 <sup>c</sup>	CF <sub>3</sub> CONH <sub>2</sub> (675±11)
Dimethylpentafluorfenyl chlorsilan (ve směsi s dimethylpentafluorsilylamin, 1:1 v/v)	260	88-90 (10)	-	HCl (DN)
<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -trimethylsilylheptafluorbutanamid (MSHFBA)	299	148	906±11 <sup>c</sup>	C <sub>3</sub> F <sub>7</sub> CONH <sub>2</sub> (750±18)

<sup>a</sup>Běžné vedlejší produkty hydrolyzy pro všechna činidla jsou trimethylsilanol (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiOH (RI = 584±8) nebo dimethyl-*terc*-butylsilanol (RI = 753±18, očekávané hodnoty).

<sup>c</sup>odhadované hodnoty RI mohou být poté stanoveny přesněji

První část tabulky Tab. 4 zahrnuje fyzikálně-chemické a plynově chromatografické konstanty množství činidel, které jsou seřazeny podle stoupající schopnosti poskytovat silylovou skupinu. Druhá část tabulky představuje sloučeniny, které byly uvedeny do analytické praxe nedávno a zatím u nich nebyla odhadnuta jejich relativní silylační aktivita, a některá jiná než trimethylsilyl činidla. Mimo jednotlivé chemikálie, uvažujeme také o jejich různých kombinacích, také nazývané jako silylační směsi (např. HMDS+TMCS nebo HMDS+DMFA). Směs tří látek BSA+TMSI+TMCS (1:1:1 v/v/v) je v současné době považována za nejsilnější známé silylační činidlo. Může být použito pro

derivatizaci všech typů sloučenin s aktivním vodíkovým atomem, včetně karbonylových sloučenin v enol a oxo formě alifatických nitrosločenin.

Každé činidlo v tabulce Tab. 4 je charakterizováno nejen jeho vlastním retenčním indexem, ale i hodnotami retenčního indexu nejdůležitějšího vedlejšího produktu reakce. To nám dovoluje předpovědět možnost překrývání jejich chromatografických píků se signály derivátů cílových sloučenin.

Seznam doporučených silylačních sloučenin se neustále mění. Některé starší byly vyřazeny a nahrazeny účinnějšími činidly. Například v jedné učebnici (Knapp, 1979) byl N-trimethylsilyl-N-fenylacetamid  $C_6H_5N(COCH_3)SiMe_3$  uveden jako silylační činidlo. Avšak žádné nové příklady tohoto použití nebyly v poslední době publikovány. Nejdůležitějším důvodem pro vyloučení z analytické praxe, jsou jeho nevhodné retenční indexy, jak pro činidlo samotné ( $1493 \pm 28$ ) tak pro vedlejší produkt reakce (N-fenylacetamid,  $1362 \pm 11$ ). Tato oblast retenčních indexů může zahrnovat píky cílových derivátů a z toho důvodu se nesmí překrývat s počátečními činidly ani vedlejšími produkty.

Standardní hmotnostní spektrum TMS derivátů alifatických hydroxysločenin nedává žádné píky molekulového iontu  $M^+$ , ale ve všech případech jsou ionty  $[M-CH_3]^+$  spolehlivě registrovány. Stejně deriváty fenolických sloučenin a karbonylových sloučenin ve formě enolů s  $p-\pi$  konjugovaným systémem  $C=C-O$  v molekule dává signál  $M^+$  vysoké intenzity. Některé základní typické píky v hmotnostním spektru O-TMS derivátů jsou  $[Si(CH_3)_3]^+$  ( $m/z$  73) a  $[Si(CH_3)_2OH]^+$  ( $m/z$  75).

Hlavní nevýhodou TMS derivátů je snadná postreakční hydrolyza v přítomnosti vody. Mnoho z těchto sloučenin není schopno existence ve vodném prostředí. Jiné typy derivátů, jmenovitě dimethyl-*terc*-butylsilyl etery, mají přibližně o 3 řády nižší hydrolytickou konstantu vzhledem k sterickému bránění vazby Si-O *terc*-butylovou skupinou. Bohužel jejich hmotnostní spektra nejsou tak informativní pro objasnění struktury neznámého analytu, protože základní píky všech z nich patří necharakteristickému iontu  $[C_4H_9]^+$  s  $m/z$  57 a  $[M-C_4H_9]^+$ .

Některá halogenovaná silylační činidla se používají v syntéze derivátů pro GC analýzu se selektivním detektorem (pro specifické prvky), například  $\text{ClCH}_2\text{SiMe}_2\text{Cl}$ ,  $\text{BrCH}_2\text{SiMe}_2\text{Cl}$  a  $\text{C}_6\text{F}_5\text{SiMe}_2\text{Cl}$ .

### 3.3.2 Acylace

Druhá skupina derivatizačních reakcí zahrnuje acylaci hydroxylové skupiny za tvorby esterů. Nejdůležitější činidla jsou uvedena níže (přehled fyzikálně-chemických a plynově chromatografických konstant acylačních činidel se vztahuje k derivatizačním záznamům aminů, aminokyselin, amidů a imidů pro GC analýzu).

Tab. 5 - Fyzikálně-chemické a plynově chromatografické vlastnosti některých acylačních činidel

Činidlo (zkratka)	Derivát	$\Delta \text{Mr}$
Acetanhydrid/ $(\text{H}^+)$	$\text{R}(\text{Ar})\text{OCOCH}_3$	42
Trifluoroacetanhydrid (TFAA), <i>bis</i> - trifluoroacetylmethylamin (MBTFA), trifluoroacetylimidazol (TFAI)	$\text{R}(\text{Ar})\text{OCOCF}_3$	42
Pentafluorpropionát anhydrid (PFPA)	$\text{R}(\text{Ar})\text{OCOC}_2\text{F}_5$	146
Heptafluorobutyrylát anhydrid (HFBA)	$\text{R}(\text{Ar})\text{OCOC}_3\text{F}_7$	196
Pentafluorobenzoyl chlorid	$\text{R}(\text{Ar})\text{OCOC}_6\text{F}_5$	194
Chloroacetanhydrid	$\text{R}(\text{Ar})\text{OCOCH}_2\text{Cl}$	76
Dichloroacetanhydrid	$\text{R}(\text{Ar})\text{OCOCHCl}_2$	110
Trichloroacetanhydrid nebo trichloroacetyl chlorid	$\text{R}(\text{Ar})\text{OCOCCl}_3$	144
<i>N</i> -trifluoroacetyl- <i>L</i> -propyl chlorid ( <i>N</i> -TFA- <i>L</i> -Pro-Cl) <sup>a</sup>	<i>N</i> -TFA- <i>L</i> -propyl estery	193

Diethylchlorofosfát	$R(Ar)OP(O)(OC_2H_5)_2$	136
2-chloro-1,3,2-dioxafosfolan	2-alkoxy-1,3,2-dioxofosfolany	90
$NaNO_2/(H^+)$ (speciální derivatizace nejjednodušších $C_1-C_5$ alifatických alkoholů na těkavé alkylnitrity pro „headspace“ analýzu)	RONO	29

<sup>a</sup>používán pro syntézu diastereomerických derivátů enantiomerních alkoholů

Je doporučeno provádět tyto reakce v přítomnosti baze bez aktivního vodíkového atomu (pyridin, triethylamin, atd.). Výjimky jsou označeny symbolem „činidlo/( $H^+$ )“. Bazické prostředí je nezbytné pro sloučení kyselých vedlejších produktů do netěkavých solí, aby se analyt ochránil před rozkladem a vyhneme se extra píkům vedlejších produktů na chromatogramu. Fenoly nemohou být převedeny na sodné soli bez předchozí acylace.

### 3.3.3 Alkylace

Třetí skupina derivatizačních reakcí hydroxysloučenin pro GC analýzu zahrnuje tvorbu jejich alkyl nebo substituovaných benzyl etherů.

Tab. 6 - Fyzikálně-chemické a plynově chromatografické vlastnosti některých alkylačních činidel

Činidlo (zkratka)	Derivát	$\Delta Mr$
Diazomethan (v rozpouštědle diethyleteru, v přítomnosti $HBF_4$ )	$R(Ar)OCH_3$	14
Methyljodid/DMFA (dimethylformamid), $K_2CO_3$	$R(Ar)OCH_3$	14
Pentafluorbenzyl bromid (PFB-Br)	$R(Ar)OCH_2C_6F_5$	180
3,5-bis-(trifluormethylbenzyl)-dimethylanilinium fluorid (BTBDMA-F) (jen pro fenoly po GC vstříkávání)	$ArOCH_2C_6H_3-3,5-(CF_3)_2$	226



Methylace diazomethanem je jednoduchá metoda pro derivatizaci relativně kyselých sloučenin [např., fenoly ( $pK_a = 9-10$ ) nebo karboxylových kyselin ( $pK_a = 4,4 \pm 0,2$ )]. Použití těchto činidel pro methylaci alifatických alkoholů vyžaduje přidavek kyselých katalýz. Methyljodid je nejvhodnější činidlo pro syntézu permethylovaných derivátů polyolů (včetně sacharidů) a fenolů. Dimethylsulfát  $[(CH_3O)_2SO_2]$  může být použit v bazickém vodném prostředí pro methylaci fenolů, ale vznik methyletherů, v tomto případě, není dostatečný pro kvantitativní stanovení počáteční sloučeniny pomocí GC.

Pro glykoly (trioly, tetraoly, atd., včetně sacharidů) a aminoalkoholy jsou doporučovány některé zvláštní metody, které vedou ke vzniku cyklických produktů. Pro realizaci je nezbytná vhodná orientace dvou funkčních skupin  $(OH)_2$  nebo  $(OH) + (NH_2)$  v poloze 1,2- (vicinální) nebo (někdy) v poloze 1,3- a více vzdálených polohách.

Tab. 7 - Derivatizace diolů a aminoalkoholů

Počáteční sloučenina	Činidlo (s)	Produkt	$\Delta Mr$
1,2-dioly	Aceton/ $(H^+)$	2,2-dimethyl-1,3-dioxolany	40
	Methan- nebo butan-boronová kyselina $CH_3B(OH)_2$ nebo $C_4H_9B(OH)_2$	2-methyl nebo 2-butyl 1,3,2-dioxaborolany	24(Me) 66(Bu)
2-aminoalkoholy	Methan- nebo butan-boronová kyselina	2-methyl nebo 2-butyl 1,3,2-dioxyborany	24(Me) 66(Bu)

Počet navržených derivatizačních metod pro GC analýzu pro alkoholické a fenolické sirné analogy je podstatně menší než pro alkoholy. Nejobjektivnější důvod je nižší frekvence jejich stanovení v analytické praxi. Experimentální detaily četných derivatizačních reakcí jsou uvedeny ve speciálních příručkách.[6]

## 3.4 Hlavní aspekty plynové chromatografie

### 3.4.1 Využití plynové chromatografie

Plynová chromatografie je jedinečná a univerzální metoda. V počátcích jejího rozvoje byla používána pro analýzu plynů a par velmi těkavých sloučenin. Práce Martina a Synga [8] a poté Jamese a Martina [9] v rámci chromatografie v systému plyn-kapalina otevřela dveře analytické metodě, která způsobila převrat v chemické separaci a analýze. GC jako analytický nástroj může být přímo použita pro separaci a analýzu plynných vzorků, kapalných roztoků a těkavých pevných látek.

Plynová chromatografie může být použita k řešení mnoha problémů v různých oblastech:

1. Léky a léčiva. Plynová chromatografie je používána nejen při kontrole kvality produktů, ale také při analýze nových produktů a také při monitorování metabolitů v biologických systémech.
2. Studie životního prostředí. Zhodnocení současného znečištění vzduchu, analyzovaného plynovou chromatografií, bylo publikováno v prvním svazku *Contemporary topics in analytical and clinical chemistry* [10]. Kniha od Groba a Kaisera [11] hodnotí užití GC a LC pro tento typ analýzy. Mnoho chronických onemocnění dýchacích cest (astma, rakovina plic, emfyzém, bronchitida) může být zapříčiněno nebo přímo ovlivněno znečištěním vzduchu.
3. Ropný průmysl. Ropné společnosti byli mezi prvními, kdo rozšířili použití GC. Metoda byla úspěšně používána pro separaci a určení mnoha složek v ropných produktech.
4. Klinická chemie. Plynová chromatografie je přizpůsobitelná k mnoha vzorkům jako je krev, moč a jiné biologické tekutiny. Složky jako bílkoviny, sacharidy, aminokyseliny, mastné kyseliny, steroidy, triglyceridy, vitamíny, a barbituráty jsou zvládnutelné touto metodou přímo nebo po přípravě vhodných těkavých derivátů.
5. Pesticidy a jejich rezidua. Plynová chromatografie v kombinaci se selektivními detektory, jako je detektor elektronového záchytu a NPD detektor umožňuje detekci těchto sloučenin a jejich měření u stopových analýz.

6. Potraviny. Platnou součástí oboru plynové chromatografie je určení antioxidantů a konzervačních prostředků. Úprava a typy vzorků jsou téměř neomezené a zahrnují analýzu ovocných šťáv, vína, piva, sirupů, sýrů, nápojů, potravních arómat, olejů, mléčných produktů, rozkladných produktů, nečistot a příměsí.

### 3.4.2 Výhody a limitace

U plynové chromatografie jako metody univerzální můžeme najít jak výhody tak i některá omezení. Je nutno však zdůraznit, že to co jedni považují za nevýhodu, může být výhodou pro někoho jiného. Navíc současná nevýhoda se může za několik let stát výhodou.

Zde je několik všeobecných komentářů týkajících se GC a zahrnuje následující obecná využití:

1. Analytická metoda. GC není užívána jen pro kvalitativní identifikaci složek ve vzorku, ale také pro kvantitativní stanovení.
2. Fyzikálně-výzkumná metoda. Metoda může být použita pro zkoumání různých parametrů systému, jako je určení rozdělovacího koeficientu a termodynamických funkcí a adsorpční izotermy.
3. On-line monitorovací sonda. Plynová chromatografie může být začleněna do procesní linie a tak procesní chod může být sledován 24 hodin.
4. Automatický systém. Plynová chromatografie může být propojena s počítačem s automatickým vzorkovačem, a proto rutinní analýzy mohou běžet přes noc.

Následují některé souhrnné výhody plynové chromatografie, které by měly být zdůrazněny:

1. Rozlišení. Metoda je použitelná pro systémy obsahující složky s velmi podobnými body varu. Výběrem selektivní kapalné fáze nebo vhodného adsorbentu, mohou být separovány molekuly s velmi podobnými fyzikálními nebo chemickými vlastnostmi. Složky tvořící azeotropní směs při běžné destilaci, mohou být rovněž rozděleny pomocí GC.
2. Citlivost. Tato vlastnost plynové chromatografie přispívá velkou měrou k jejímu širokému použití. Nejjednodušší tepelně vodivostní detektor může detekovat

několik částic v miliónu, s detektorem elektronového záchytu nebo NP detektorem mohou být měřeny biliontiny nebo pikogramy rozpuštěné látky. Tato úroveň citlivosti je mnohem působivější, když uvážíme, že běžně používané množství vzorku je 1 mikrolitr nebo i méně.

3. Čas analýzy. Separace všech složek ve vzorku může trvat několik sekund až desítky minut. Analýzy, které běžně trvají hodinu nebo více, mohou být zkráceny na záležitost minut díky vysokému difúznímu poměru v plynné fázi a rychlému ustavování rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází.
4. Vhodnost. Průběh plynové chromatografie je relativně jasná procedura. Není obtížné naučit netechnický personál provádět rutinní separace.
5. Náklady. Ve srovnání s mnoha dnes dosažitelnými analytickými přístroji, má plynový chromatograf vynikající cenu.
6. Univerzálnost. Plynová chromatografie se snadno přizpůsobuje pro analýzu vzorků stálých plynů, stejně tak pro vysokovroucí kapaliny a těkavé pevné látky.
7. Vysoká separační účinnost. Vzhledem k nízké viskozitě mobilní fáze, mohou být použity dlouhé kolony s vynikající separační účinností.
8. Výběr citlivosti detekčního systému. Detektory pro plynovou chromatografii jsou relativně jednoduché a vysoce citlivé a mají rychlý stupeň odpovědi.
9. Snadnost zapsání dat. Výstup z detektoru plynového chromatografu může být pohodlně propojen se zapisovacím potenciometrem, integračním systémem, počítačem a se širokou škálou modulů automaticky ukládající data.
10. Automatizace. Plynový chromatograf může být použit pro automatické monitorování různých chemických procesů, ze kterých mohou být vzorky periodicky odebírány a nastříkovány na kolonu pro separaci a detekci.[7]

### 3.5 Teorie plynové chromatografie

Chromatografická separace může být hodnocena na základě řady parametrů. Jedním z těchto parametrů je tvar píků v daných systémech. Tvar píku závisí na izotermách, které popisují vztah mezi koncentrací rozpuštěné látky ve stacionární fázi a koncentrací rozpuštěné látky v mobilní fázi. Jestliže je izoterma lineární, pík má tvar Gausovy křivky a separace postupuje s malými problémy nebo bez nich. Jestliže izoterma není lineární, píky jsou asymetrické. Některé izotermy jsou lineární, ale pouze v určitém rozsahu, a problémy se pak vyskytují po celou dobu, po kterou pracujeme mimo tento rozsah. Jestliže je izoterma konkávní k plynné fázi koncentrační osy (takže distribuční poměr klesá se stoupající koncentrací rozpuštěné látky v mobilní fázi), zóna látky bude mít ostrou přední část a dlouhý chvost chromatografického píku. Jestliže naopak je izoterma konvexní k plynné fázi koncentrační osy (takže distribuční poměr stoupá se stoupající koncentrací rozpuštěné látky v mobilní fázi), zóna bude mít rozmytý začátek a ostrý zadní okraj chromatografického píku.

Jestliže je chromatografická teorie vysvětlována na základě diskontinuálního modelu, zde je pro něj několik předpokladů:

1. rovnovážná koncentrace rozpuštěné látky mezi dvěma fázemi je dosahována okamžitě
2. difúze rozpuštěné látky v mobilní fázi kolem kolonové (sloupcové) osy je minimální
3. kolona je plněna nebo potažena rovnoměrně

Všechny tyto podmínky nejsou vždy splněny u všech chromatografických separací. Jestliže je poměr konstant pro sorpci a desorpci malý, rovnováha mezi fázemi nemusí být dosažena okamžitě. Tento efekt je často nazýván odpor proti převodu hmoty, a tudíž transport rozpuštěné látky z jedné fáze do druhé má charakter difúzní. Jak rozpuštěná látka migruje kolonou, je sorbována z mobilní fáze do stacionární. Tok je skrz prázdný objem tuhých částic, molekuly rozpuštěné látky difundují skrz mezery aby dosáhly povrchu stacionární fáze. Podobně musí rozpuštěná látka difundovat z vnitřního prostoru stacionární fáze zpět do mobilní fáze.

Při chromatografickém procesu dochází k rozšiřování zón chromatografovaných látek vlivem třech hlavních faktorů: turbulentní difúzi, molekulové difúzi a odporu proti převodu hmoty na fázovém rozhraní.

### 3.5.1 Difúzní (dynamická) teorie

Ačkoli teoretická patra jsou užitečným pojetím, jedná se o empirický faktor. Protože metoda teoretických pater nevysvětluje mechanismus, který určuje tyto faktory, musíme používat mnohem sofistikovanější postup, difúzní teorii, která vysvětluje chromatografické chování. Tato teorie je založena na takových parametrech jako je poměr rozdělení látky mezi stacionární a mobilní fází, difúzní poměr rozpuštěné látky v koloně, rychlosti toku nosného plynu a hydrodynamice mobilní fáze.

Uvažujeme-li o třech faktorech výše zmíněných, které mohou zapříčinit rozšiřování zóny: molekulová difúze, turbulentní difúze a odpor proti převodu. V následujícím textu je tato problematika přiblížena z hlediska tzv. "random-walk teorie".

1. Molekulová difúze. Tento proces vzniká, jestliže existují místa s vysokou koncentrací a místa s nízkou koncentrací. Pohyb je z míst s vyšší koncentrací do míst s nižší koncentrací v podélném směru kolony. Difúze nastává na molekulární úrovni, vzniká z pohybu molekul po srážce. Jakmile vložíme vzorek na vrchol kolony (s minimálním počtem teoretických pater), vznikají tyto gradientové oblasti.
2. Turbulentní difúze. Představme si kolonu naplněnou kuličkami stejného průměru. Prázdný prostor podél kolony je v podstatě jednotný (74% objemu kolony je tvořeno kuličkami a 26% je otevřený nebo prázdný objem). Se zmenšováním objemu kuliček (částic), je stále více obtížné dohlížet na jednotnou velikost a předcházet drcení a rozbíjení částic. To platí hlavně pro kolony plněné materiály, které se snadno drtí působením nadměrných vibrací nebo otřesů, které mohou vznikat při procesu plnění. Je obtížné získat částice stejného průměru s ohledem na velikost částic používaných v kolonách pro plynovou chromatografii, (0.25-0.17mm). Celkový efekt je takový, že prostor podél kolony není jednotný. Když

vzorek putuje skrz kolonou, z tohoto důvodu, každá molekula „vidí“ jinou cestu a každá cesta je jinak dlouhá. Některé molekuly jdou delší cestou a jiné kratší. Jsou zde také rozdíly v průtokové rychlosti mobilní fáze v rámci těchto cestiček. Celkový výsledek je takový, že některé molekuly se zpožďují za středem zóny, zatímco jiné se pohybují před zónou. Proto tedy proces vířivé difúze vyplývá z toku v prostoru kolem částic různé velikosti v koloně.

3. Odpor proti převodu hmoty na fázovém rozhraní. Jak zóna rozpuštěné látky migruje kolonou (přibližně Gausova křivka), existují různé koncentrační profily od počátečního okraje, přes střed ke zadnímu okraji. Jak zóna pokračuje v pohybu dolů kolonou, přináší to neustále se měnící koncentrační profil při kontaktu s další částí kolony. Tento efekt způsobuje různé rovnovážné poměry podél kolony. Tudíž každá část (teoretické patro) kolony se neustále pokouší uvést do rovnováhy s různou koncentrací zóny v mobilní fázi. V jednu chvíli dosáhne zóna rovnováhy s nízkou koncentrací v mobilní fázi a pak, v jiném čase s vysokou koncentrací. Jestliže není žádný průtok, rovnovážný stav bude přetrvávat; avšak jsme v dynamickém systému a je zde vždy přítomen průtok. Celkově vedou tyto procesy k nerovnováze na každém teoretickém patře. Celkový průběh je určen kinetickým poměrem procesů, které jsou zodpovědné za pohyb molekul rozpuštěné látky mezi dvěma fázemi v koloně, totiž poměr přesunu hmoty z mobilní fáze do stacionární je odlišný od poměru ze stacionární fáze do mobilní.

Vezmeme-li v úvahu všechny efekty diskutované výše, dostaneme výraz :

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_g}{u} + \frac{8}{\pi^2} \cdot \frac{k}{(1+k)^2} \cdot \left( \frac{d_f^2}{D_l} \right) \cdot u$$

Rovnice říká, že pro maximální účinnost kolony, musíme minimalizovat příspěvek každého členu při zachování konstantního lineárního průtoku. První člen zahrnuje geometrii náplně kolony, druhý člen je molekulová difúze v plynné fázi a třetí pro odpor proti převodu hmoty.

Obecný tvar pro tuto tzv. van Deemterovu rovnici je:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

kde  $A = 2\lambda d_p$  = příspěvek turbulentní difúze

$B = 2\gamma D_g$  = příspěvek molekulové difúze

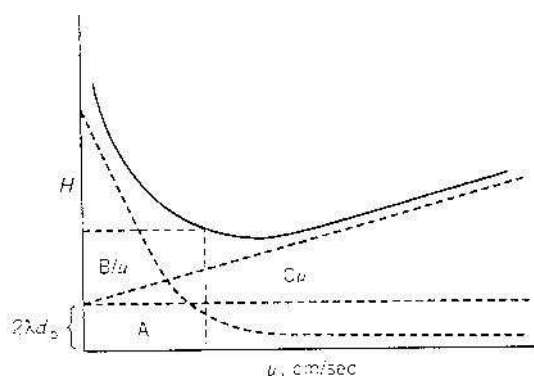
$C = (8/\pi^2)[k/(1+k)^2](d_f^2/D_l)$  = příspěvek odporu proti převodu hmoty

Znázornění této rovnice je na obrázku Obr. 2, který ukazuje vliv průtokové rychlosti plynu na účinnost kolony. Van Deemterova rovnice, představuje hyperbolu, která má minimum při průtokové rychlosti  $u = (B/C)^{1/2}$  a minimální hodnotu  $H$  při  $A+2(BC)^{1/2}$ . Konstanty mohou být graficky vypočteny z experimentálního grafu závislosti  $H$  na lineární průtokové rychlosti.

Graf závislosti  $H$  na  $1/u$  je také užitečný Obr. 3. V obou případech se úsek v lineární části rovná  $2\lambda d_p$ . Takže pokud je známa hodnota  $d_p$ ,  $\lambda$  může být vypočtena a získána míra stejnoměrnosti plnění. Ze sklonu lineární části křivky  $H$ - $u$  můžeme také odhadnout tloušťku filmu (vrstvy)  $d_f$ , jestliže známe hodnotu  $D_l$  a  $k$  (odpor proti převodu hmoty v kapalně fázi).

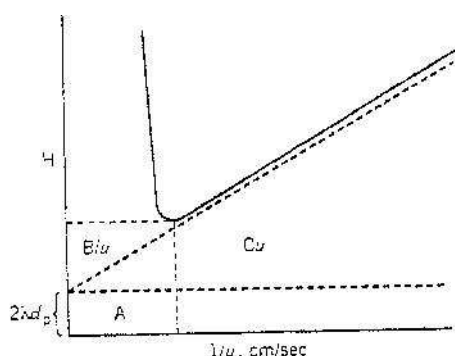
Konstanty  $A$ ,  $B$ ,  $C$  mohou být také určeny metodou nejmenších čtverců. Přibližný odhad parametru  $B$  může být vypočteno ze závislosti  $H$ - $Cu$  nebo proti  $1/u$ , a  $C$  může být odhadnuto ze závislosti  $H$ - $Bu$  nebo na  $u$ .

Obr. 2 – Znázornění van Deemterovy rovnice





Obr. 3 – Rovnice difúzní teorie, závislost H na 1/u



Podíváme-li se z jiného úhlu pohledu na členy van Deemterovy rovnice, na jejich efekt na počet teoretických pater. Příspěvek člena  $2\lambda d_p$  může být snížen zmenšením velikosti částic. Nicméně se zmenšováním částic se zvyšuje tlak na koloně. Hodnota  $\lambda$  obvykle stoupá se snižujícím se  $d_p$ . Ze tří členů z rovnice pouze ten první je nezávislý na lineárním průtoku.

Druhý člen,  $2\gamma D_g/u$ , je příspěvkem molekulární difúze na rozšiřování zóny. Tento člen může být snížen zmenšením difúzního koeficientu  $D_g$ . Z kinetické teorie plynů je známo, že hodnota  $D_g$  závisí na povaze par a teplotě a tlaku systému. Difúze v plynech s nízkou molekulovou hmotností ( $H_2$  a He) je vyšší ve srovnání s plyny s vyšší molekulovou hmotností ( $N_2$  nebo  $CO_2$ ). Jestliže by toto bylo jediné kritérium pro volbu nosného plynu, volili bychom  $N_2$  nebo  $CO_2$  raději než He. Toto dokazuje fakt, že optimální průtoková rychlost plynu je  $(B/C)^{1/2}$ . Hodnotu  $(B/C)^{1/2}$  lze získat z rovnice s ohledem na  $u$  a dosažení  $dH/du = 0$ ;  $u_{opt}(H_{min})$  je potom rovno  $(B/C)^{1/2}$ . Avšak jiné faktory ovlivňují volbu nosného plynu, jako je efekt citlivosti použitého detektoru. Jestliže v jednotlivém systému je člen C malý a je povolen vysoký průtok nosného plynu (to snižuje člen  $2\gamma D_g/u$ ), pak povaha nosného plynu není tak důležitá. Pro kolony s nízkou permeabilitou, je nejlepší volbou plyn s nízkou molekulovou hmotností (nízkou viskozitou), např. He. Jestliže člen C je velký a jsou použity nízké průtokové rychlosti, pak člen  $2\gamma D_g/u$  se stává důležitý a může se projevit vliv nosného plynu na výškový ekvivalent teoretického patra (HETP). V tomto případě, plyny s vyšší molekulovou hmotností, např.  $N_2$  nebo  $CO_2$  budou preferovány, protože koeficient difúze rozpuštěné látky bude malý.

Třetí člen v rovnici odpovídá odporu proti převodu hmoty v kapalně fázi. Obvyklý způsob ke snížení tohoto členu, je zmenšení tloušťky kapalného filmu  $d_f$ . To způsobuje snížení  $k$  (retenční faktor) a vzrůst ve členu  $k/(1+k)^2$ . Nicméně s používáním kolon s tenkou vrstvou filmu zvyšuje pravděpodobnost adsorbce molekul rozpuštěné látky na povrch nosného materiálu, což se může projevit ve výsledném chvostování chromatografických píků..

Člen  $k$  je závislý na teplotě, takže se snižováním teploty  $k$  roste a  $k/(1+k)^2$  klesá. Snižování teploty zvyšuje viskozitu a tím dochází k poklesu koeficientu  $D_1$ . Proto se efekty těchto faktorů  $k/(1+k)^2$  a  $1/D_1$  vzájemně ruší.

Na základě těchto informací vidíme, že hodnota HETP je nejen otázkou plnění kolony, ale závisí také na podmínkách a vlastnostech rozpuštěné látky. To je důvod proč jsou získány různé hodnoty HETP (nebo různý počet teoretických pater vztažený k jednotce délky kolony) pro různé kolony.

### 3.5.2 Efektivní počet teoretických pater

Pro účinnost chromatografického systému je stále využíván termín z teorie ideální chromatografie a to tzv. teoretické patro. Termín skutečný počet teoretických pater  $N_{eff}$  se začal používat k charakterizaci kapilárních kolon. V této souvislosti se k určení počtu teoretických pater používá upravený (skutečný) retenční objem  $V_R'$  místo celkového retenčního objemu.

$$N_{eff} = 16 \cdot \left( \frac{V_R'}{\omega_b} \right)^2 = 16 \cdot \left( \frac{t_R'}{\omega_b} \right)^2$$

Hodnota  $N_{eff}$  je užitečná pro srovnání náplňových a kapilárních kolon, nebo dvou podobných kolon, které jsou obě používány pro stejnou separaci. Kapilární kolony obvykle mají vyšší počet teoretických pater. Můžeme si přepočítat běžný počet pater  $N$  na efektivní počet pater  $N_{eff}$  pomocí výrazu

$$N_{eff} = N \cdot \left( \frac{k}{1+k} \right)^2$$

a stejně tak výšku patra na efektivní výšku patra:

$$H_{eff} = H \cdot \left( \frac{1+k}{k} \right)^2$$

Stejně tak můžeme vyjádřit počet teoretických pater za jednotku času:

$$\frac{N}{t_R} = \frac{\bar{u}(k)^2}{t_R(1+k)^2}$$

kde  $\bar{u}$  je průměrná lineární průtoková rychlost plynu. Tento vztah ukazuje na charakteristické parametry kolony, což nabízí možnost srovnávat různé typy kolon.

### 3.5.3 Rozlišení

Často používaný výraz pro rozlišení je:

$$R_s = \frac{1}{4}(N)^{1/2} \left( \frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \cdot \left( \frac{k}{1+k} \right)$$

kde  $N$  a  $k$  odpovídají později se elující složce z páru. Protože  $\alpha$  a  $k$  jsou konstanty pro danou kolonu (za izotermických podmínek), rozlišení závisí na počtu teoretických pater  $N$ . Člen  $k$  obvykle vzrůstá s poklesem teploty stejně tak  $\alpha$ , ale v menším rozsahu. Výsledek je ten, že za nízkých teplot je pro stejnou separaci vyžadováno méně teoretických pater nebo kratší kolona.[7]

## 3.6 Chromatografická účinnost kapilárních kolon

### 3.6.1 Golayova rovnice versus van Deemterův výraz

Základní rovnice výchozí pro provedení chromatografických kolon je van Deemterův výraz, který můžeme vyjádřit jako

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

kde  $H$  = výškový ekvivalent k teoretickému patru

$A$  = příspěvek turbulentní difúze

$B$  = příspěvek molekulové difúze

$C$  = odpor proti převodu hmoty

$u$  = průměrná lineární průtoková rychlost nosného plynu

V případě kapilární kolony je člen  $A$  roven nule, protože zde není žádný plnicí (packing) materiál. Proto se rovnice zjednodušuje na

$$H = \frac{B}{u} + Cu$$

Tento zkrácený výraz je často uváděný jako Golayova rovnice. Člen  $B$  může být vyjádřen jako  $2D_g/u$ , kde  $D_g$  je koeficient binární difúze rozpuštěné látky v nosném plynu. Rozšiřování píku způsobené molekulovou difúzí je následek doby pobytu rozpuštěné látky uvnitř kolony a povahou nosného plynu. Tento efekt je přiměřený jen při nízké lineární průtokové rychlosti a je méně zřetelný při vysoké průtokové rychlosti.

Nicméně, hlavní přispívající faktor k rozšiřování zón je člen  $C$ , ve kterém odpor proti převodu hmoty může být reprezentován jako složka odporu proti převodu hmoty v mobilní fázi  $C_g$  a v stacionární fázi  $C_l$ :

$$C = C_g + C_l$$

kde

$$C_g = \frac{r^2(1 + 6k + 11k^2)}{D_g 24(1 + k)^2}$$

$$C_l = \frac{2kd_f^2 \bar{u}}{3(1+k)^2 D_l}$$

kde  $D_l$  je difúzní koeficient rozpuštěné látky ve stacionární fázi,  $k$  je retenční faktor rozpuštěné látky,  $d_f$  je tloušťka filmu stacionární fáze a  $r$  je poloměr kapilární kolony. U kapilárních kolon je  $C_l$  malé a stává se významné jen u kapilárních kolon, které mají silný film stacionární fáze. Golayova rovnice může být potom přepsána jako

$$H = \frac{B}{u} + C_g \bar{u} = \frac{2D_g}{u} + \frac{r^2(1+6k+11k^2) \cdot \bar{u}}{D_g 24(1+k)^2}$$

Optimální lineární průtoková rychlost koresponduje s minimem závislosti  $H$  versus  $u$  a může být získána dosazením  $dH/du = 0$  a řešením pro  $\bar{u}$

$$\frac{dH}{du} = 0 = \frac{B}{u^2} + C_g$$

Tudíž  $u_{opt} = (B/C_g)^{1/2}$  a hodnota  $H$  korespondující s optimální lineární průtokovou rychlostí  $H_{min}$  je

$$H_{min} = r \sqrt{\frac{1+6k+11k^2}{3(1+k)^2}}$$

Následkem toho se zmenšujícím se průměrem kapiláry vzrůstá maximum účinnosti kolony  $N$  a maximum efektivní účinnosti  $N_{eff}$ , obě maxima jsou také závislá na zadrži jednotlivých rozpuštěných látek  $k$ . Retence v kapiláře pro GC je obvykle vyjádřena jako retenční faktor  $k$ , kde

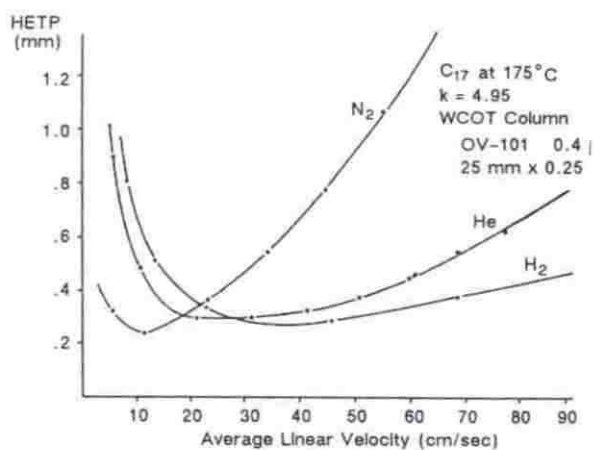
$$k = (t_R - t_M) / t_M$$

Pro separace vyžadující vysoké rozlišení, jsou doporučovány kolony s malým vnitřním průměrem. Vyjadřování účinnosti v termínech jako počet pater na metr dovoluje srovnávat účinnost kolon různých délek.

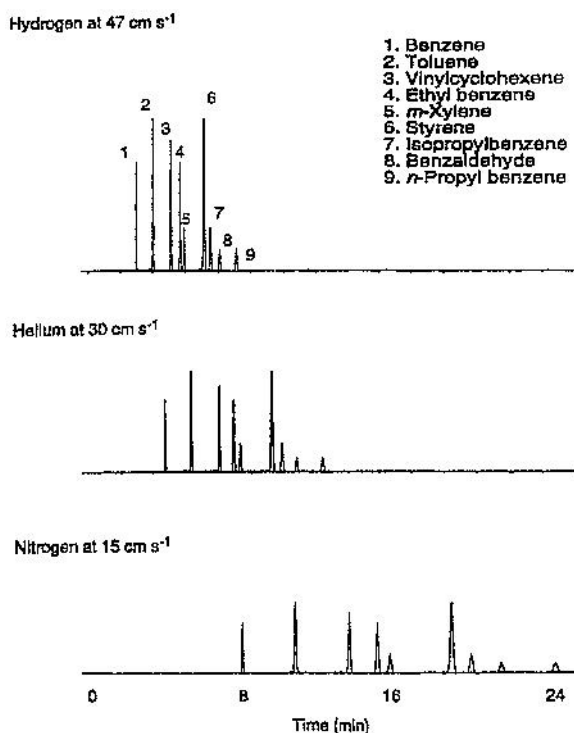
### 3.6.2 Volba nosného plynu

Účinnost kapilární kolony závisí na použitém nosném plynu, na délce a vnitřním průměru kolony, retenčním faktoru jednotlivé rozpuštěné látky vybrané pro výpočet počtu teoretických pater a na tloušťce filmu stacionární fáze. Závislost účinnosti na lineárním průtoku, pro tři různé nosné plyny na kapilární koloně s tenkou vrstvou filmu, je na obrázku Obr. 4. Ačkoli nejnižší minimum a tím největší účinnost byla dosažena s dusíkem, rychlost analýzy je nejmenší. Zvyšující se hodnota  $H$  při růstu průtokové rychlosti je významnější u dusíku, což vyžaduje pracovat blízko  $u_{opt}$ ; a tudíž ztráta účinnosti (a rozlišení) z tohoto závěru rychle vyplývá. Na druhé straně, jestliže akceptujeme nepatrnou ztrátu v počtu teoretických pater, mnohem přijatelnější čas analýzy dosáhneme s vodíkem a heliem jako nosným plynem, protože  $u_{opt}$  se vyskytuje při vyšší lineární průtokové rychlosti. Navíc příspěvek odporu proti převodu hmoty při použití helia nebo vodíku dovoluje pracovat kolem většího rozsahu lineární průtokové rychlosti bez podstatného zhoršení výsledků.

Obr. 4 – Závislost účinnosti na lineární průtokové rychlosti nosných plynů



Obr. 5 – Efekt nosného plynu na separaci při optimální lineární průtokové rychlosti



Při srovnávání těchto nosných plynů je zjevná ještě jedna výhoda při lineární průtokové rychlosti korespondující se stejnými hodnotami výšky teoretického patra.

U lehčích nosných plynů může být rozpuštěná látka eluována při nižších teplotách kolony během programované teploty s užším skupinovým profilem, zatímco můžeme použít vyšší lineární průtokovou rychlost. A proto je doporučováno buď helium nebo vodík před dusíkem a skutečně jsou tyto plyny dnes používány jako nosné plyny pro kapilární plynovou chromatografii. Výhodou při použití vodíku je, že se méně mění počet pater se vzrůstem lineární průtokové rychlosti narozdíl od helia. Použití vodíku v laboratoři pro jakýkoliv účel vždy vyžaduje bezpečnostní opatření pro případ netěsnosti.

### 3.6.3 Měření lineární průtokové rychlosti

Měření průtoku v kapilární koloně, jejíž vnitřní poloměr je menší než 0,53 mm, je obtížné přesně a reprodukovatelně stanovit běžnými dříve používanými přístroji. Místo toho se průtok nosného plynu kapilární kolonou obvykle vyjadřuje raději jako lineární průtoková rychlost než objemový průtok. Lineární průtoková rychlost může být vypočítána

nastříknutím těkavé, nezadržované rozpuštěné látky, a zaznamenáním jejího retenčního času  $t_M$  (sekundy). Pro kapilární kolonu o délce  $L$  v centimetrech, získáme

$$u(\text{cm/s}) = \frac{L}{t_M}$$

Například lineární průtoková rychlost nosného plynu ve 30-ti metrové koloně, kde je retenční čas methanu 2 min. je 3000 cm/120s neboli 25 cm/s. Jestliže je to žádoucí, objemový průtok  $F$  (ml/min) může být vypočítán ze vztahu,

$$F(\text{ml/min}) = 60\pi \cdot r^2 u$$

kde  $r$  je poloměr kolony v centimetrech. Nástřik methanu je vhodný pro FID k určení  $t_M$  a/nebo může být pro ECD a NPD použit „headspace“ nástřik methylenchloridu a acetonitrilu. Dusík a kyslík (vzduch) mohou být použity s MS, zatímco ethylenové a acetylenové páry mohou být nastříknuty s PID. Doporučované lineární průtokové rychlosti helia a vodíku pro kapilární kolony různých průměrů jsou v tabulce Tab. 8.

Tab. 8 - Doporučované lineární průtokové rychlosti a průtoky pro helium a pro vodík

Vnitřní průměr kolony (mm)	Lineární průtoková rychlost (cm/s)		Průtok (ml/min)	
	Helium	Vodík	Helium	Vodík
0,18	20-45	40-60	0,3-0,7	0,6-0,9
0,25	20-45	40-60	0,7-1,3	1,2-2,0
0,32	20-45	40-60	1,2-2,2	2,2-3,0
0,53	20-45	40-60	4,0-8,0	6,0-9,0

### 3.6.4 Distribuční poměr v GC

Povaha nosného plynu, účinnost kolony a hlavně rozlišení a kapacita vzorku kapilární kolony jsou ovlivněny fyzikální povahou kolony, jmenovitě vnitřním průměrem a tloušťkou filmu stacionární fáze. Ověření distribučního koeficientu  $K_D$ , jako funkci chromatografických parametrů je zde užitečné.  $K_D$  je konstantou pro daný pár rozpuštěná látka-stacionární fáze a je závislá pouze na teplotě kolony.



$K_D$  můžeme definovat jako

$K_D$  = koncentrace rozpuštěné látky ve stacionární fázi/ koncentrace rozpuštěné látky  
v nosném plynu nebo

$K_D$  = množství rozpuštěné látky ve stacionární fázi/ množství rozpuštěné látky  
v mobilní fázi · objem nosného plynu/ objem stacionární fáze v koloně

$K_D$  může být také vyjádřeno jako

$$K_D = k\beta = k \frac{r}{2d_f}$$

kde  $\beta$  je distribuční poměr a je roven  $r/2d_f$ ,  $r$  je poloměr kolony a  $d_f$  je tloušťka filmu stacionární fáze. Při dané teplotě kolony vzrůstá zádrž se snižujícím se distribučním poměrem, což může být manipulovatelné buď snížením průměru kolony nebo zvýšením tloušťky filmu stacionární fáze; podobně snížení zádrže je pozorováno se vzestupem  $\beta$ . Zatímco  $K_D$  je konstantou při dané teplotě kolony, tloušťka filmu a průměr kolony hrají klíčovou roli v určování separační síly a kapacity vzorku. Při výběru kapilární kolony se zvažuje distribuční poměr.

Se snižující se tloušťkou filmu se při konstantní teplotě, délce kolony, vnitřním průměru snižuje i  $k$  nebo retenční faktor. Naopak se zvyšující se tloušťkou filmu v sérii kolon, které mají stejné rozměry, zádrž se za stejných teplotních podmínek zvyšuje. Průměr kolony limituje maximální množství stacionární fáze, kterou může být pokryta vnitřní stěna. Kolony s malým průměrem obvykle obsahují tenčí film stacionární fáze, zatímco silnější film může pokrývat širší kolony. Distribuční poměr dovoluje srovnávat kolony stejné délky z hlediska kapacity vzorku a rozlišení.

Účinnost kolony vzrůstá se zmenšujícím se průměrem kolony. Ostřejší píky přináší zlepšení detekčních limitů. Avšak se snižujícím se průměrem kolony se snižuje i kapacita vzorku. Teplotní podmínky na koloně a lineární průtoková rychlost nosného plynu mohou být obvykle přizpůsobeny, abychom dosáhli příznivého času analýzy.

### 3.6.5 Průměr kolony

1. Kapacita vzorku roste se zvyšujícím se průměrem kolony. Vzorky obsahující složky ve stejném rozsahu koncentrace mohou být analyzovány na koloně každého průměru. Volba závisí na požadovaném rozlišení. Obecně je kapacita vzorku každé kapilární kolony úměrná čtverci nad poloměrem kolony.
2. Pro komplexní vzorky vybíráme kolony s menším průměrem a kapacitou vzorku adekvátní ke koncentraci složek ve vzorku.
3. Vzorky, jejichž složky se široce liší v koncentraci mohou být analyzovány na koloně o větším vnitřním průměru ( $>0,25\text{mm}$ ), abychom se vyhnuli přetížení rozpuštěnou látkou s vyšší koncentrací.
4. Výběr vnitřního průměru kolony může být založen na typu systému přívodu vzorku. Obecně kolony o vnitřním průměru 0,25 nebo 0,32mm mohou být použity pro techniku nástřiku split a splitless, 0,32mm pro splitless a tzv. „on-column“ nástřik a 0,53mm pro přímý nástřik.
5. Kapilární kolony o vnitřním průměru 0,18 a 0,25mm mohou být použity pro GC/MS systém, protože nižší průtok touto kolonou nebude přesahovat omezení pro vakuový systém.
6. Kapilární kolony o vnitřním průměru 0,1mm se používají pro rychlé analýzy, protože stejného rozlišení může být dosaženo v kratším čase.
7. Druhá odmocnina rozlišení je úměrná vnitřnímu průměru kolony. Čím je menší průměr kolony, tím větší je účinnost kolony, a tím kratší je čas analýzy pro daný stupeň rozlišení.

### 3.6.6 Tloušťka filmu stacionární fáze

1. Retence a kapacita vzorku roste s rostoucí tloušťkou filmu se současným snížením účinnosti kolony.
2. Tloušťka filmu je nepřímo úměrná počtu pater a v podstatě přímo úměrná času analýzy.

3. Kolony s tenkým filmem poskytují vyšší rozlišení vysokovroucích rozpuštěných látek, ale nižší rozlišení pro více těkavé složky za jakýchkoli teplotních podmínek na koloně.
4. Kapacita vzorku u kolon s tenkým filmem může být nepřiměřená a vyžaduje teplotní kontrolu na termostatu kolony.
5. Tloušťka filmu menší než 0,2  $\mu\text{m}$  dovoluje použití delších kolon pro složité vzorky.
6. Rozpuštěná látka se bude eluovat při nižší eluční teplotě se snižující se tloušťkou filmu, a proto jsou kolony s tenkým filmem vhodné pro vysokovroucí petrolejové frakce, triglyceridy a jiné sloučeniny.
7. Kolony se silným filmem (které jsou neodmyslitelně více inertní) mohou být použity pro vzorky mající řadu koncentrací rozpuštěné látky. Silnější film stacionární fáze ( $>1\mu\text{m}$ ) může být použit pro analýzu více těkavých rozpuštěných látek. Velmi silný film ( $>5\mu\text{m}$ ) může být zvolen pro analýzu provedenou za pokojové teploty.
8. Kolony se silnějším filmem vyžadují vyšší eluční teploty, ale následkem může být nekompletní eluce všech složek vzorku.
9. Vyšší eluční teploty v dlouhotrvajících časových periodách způsobují sníženou životnost kolony a větší poškozování kolony.
10. Kapilární kolony dlouhé 30 m nebo více s tenkým filmem stacionární fáze nabízí alternativu k teplotní kontrole pro účely zakoncentrování rozpuštěné látky, která je zvláště důležitá u vzorků spojených s čištěním a frakcionací či termální desorpcí.

### 3.6.7 Délka kolony

Rozlišení je funkcí druhé odmocniny počtu teoretických pater nebo délky kolony. Musíme zvážit kompromis v růstu celkového rozlišení v separaci s rozšiřující se délkou kolony a se současným růstem času analýzy za izotermických podmínek. Opatrnost se vyžaduje při použití kratších kolon, které dávají nezbytné rozlišení. Kapacita vzorku kapilárních kolon roste s délkou kolony. Zvětšením délky kapilární kolony z 15 na 30m, například, se projeví ve zlepšení rozlišení na 1,4 (druhá odmocnina za dvou), ale čas analýzy se také zdvojnásobil, což může limitovat výkonnost vzorkování v laboratoři. Ke zdvojnásobení rozlišení mezi dvěma sousedními píky, potřebujeme čtyřnásobnou délku

kolony. Jestliže používáme kolonu o délce 30m, zvětšení kolony na 120m je absurdní. Tady kolona stejné počáteční délky (někdy kratší), mající jinou stacionární fázi bude mít jinou selektivitu a vyřeší daný problém. Situace je trochu odlišná za programovaných teplotních podmínek, kde zlepšení rozlišení můžeme někdy dosáhnout pouze mírným prodloužením času analýzy.

Nejlepší přístup je volba 25 až 30m dlouhé kolony pro obecné analytické separace a pro identifikaci využít chromatogramů vytvořených za stejných chromatografických podmínek pro srovnání vzorků. Kratší kolony mohou být použity pro rychlé prověřování nebo jednoduché směsi, nebo 60m dlouhé kolony pro velmi komplikované vzorky. Programovaná teplota na koloně může být přizpůsobena k optimalizaci rozlišení.[7]

## 3.7 Statiny

### 3.7.1 Charakteristika

Jedná se o skupinu léků snižujících množství cholesterolu v krvi (hypolipidemika). Inhibicí syntézy cholesterolu (blokáda HMG-CoA-reduktázy) se zvyšuje počet LDL receptorů (LDL je lipoprotein s nízkou hustotou, přenáší v krvi tuky, a je vychytáván LDL receptory), což vede ke zvýšené clearance sérového cholesterolu. Snižují rovněž koncentraci triacylglycerolů. Kromě přímého účinku na lipidový metabolismus se uplatňuje zřejmě i účinek na endotel, účinek antiagregační a antiproliferační. Indikovány jsou zejména u hypercholesterolémii. Mohou se kombinovat s pryskyřicemi. K nežádoucím účinkům patří myopatie (je třeba opatrně kombinovat s fibráty), změny jaterních enzymů. Patří k nim např. lovastatin, simvastatin, fluvastatin, k druhé generaci patří atorvastatin.

[řec. *statizo* stát, zastavit] [12]

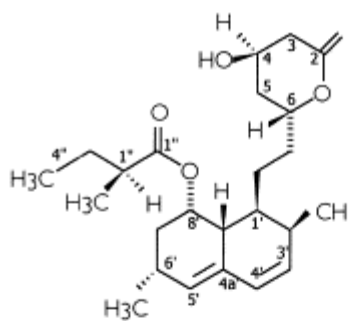
Inhibicí 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzymA reduktázy (HMG-CoA reduktázy) je výrazně redukována až blokována syntéza cholesterolu na počátku metabolického řetězce. Deficit cholesterolu v játrech vede ke vzestupu počtu receptorů pro LDL na povrchu buněk s následným zvýšeným nitrobuněčným průnikem LDL-cholesterolu. Snižuje se hladina proaterogenního LDL-cholesterolu a zvyšuje se hladina ochranného HDL-cholesterolu. Zvýšené vychytávání VLDL vede ke snížení triacylglycerolémie.

Léčiva této skupiny výrazně snižují hladinu cholesterolu vázaného v LDL, zvyšují hladinu cholesterolu v HDL a v menší míře snižují i hladinu triacylglycerolů.

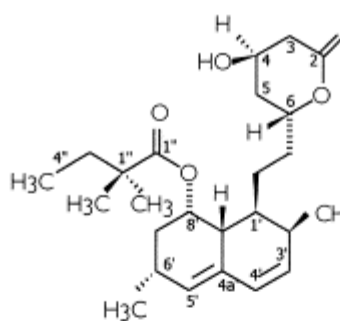
Dokumentován je příznivý efekt statinů na regresi aterosklerózy, na výskyt překonaných i smrtících kardiovaskulárních příhod a na pokles celkové mortality nejen u nemocných se středně závažnou hypercholesterolémií, ale i u nemocných s jen mírnou hypercholesterolémií. Dokumentován byl rovněž vysoce významný pokles morbidity a mortality, který je vysvětlován stabilizací aterosklerotického plátu. Při nižším obsahu lipidů v plátu se totiž výrazně snižuje riziko jeho ruptury a nasedající trombózy.[13]

### 3.7.2 Vzorci

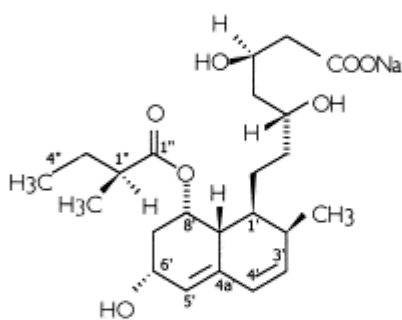
Obr. 6 – Strukturální vzorce vybraných statinů



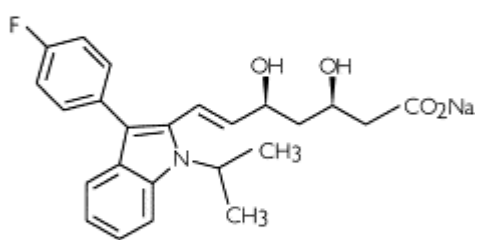
Lovastatin



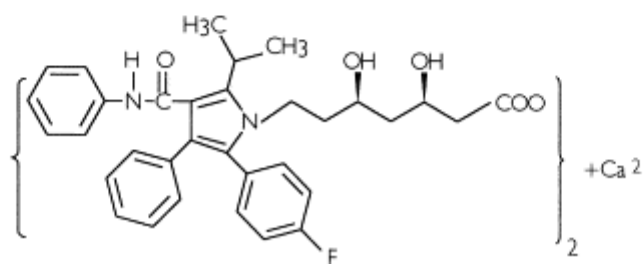
Simvastatin



Pravastatin



Fluvastatin



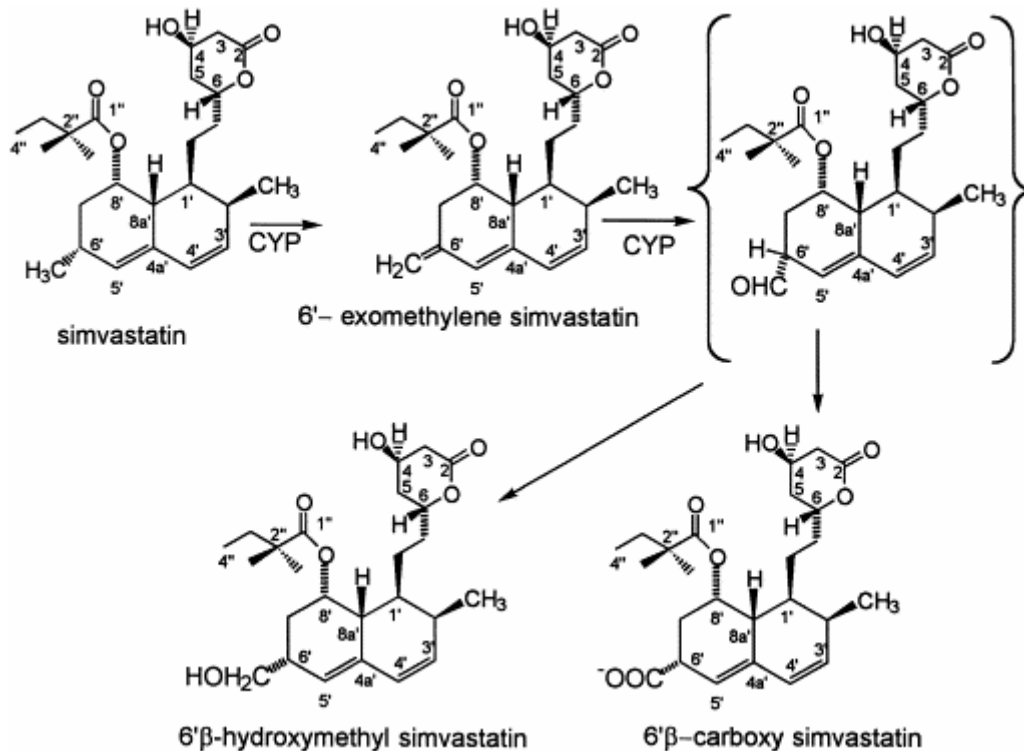
Atorvastatin

### 3.7.3 Metabolismus

#### Simvastatin

Simvastatin podléhá extensivnímu metabolismu vedoucímu k více jak 10 metabolitům. Simvastatin podléhá hydroxylaci na 6' uhlíku. Léčivo tvoří metabolit 6'-exomethylen a methylová skupina na 6' uhlíku je oxidována na hydroxymethylovou skupinu nebo na karboxylovou kyselinu. V lidské žluči jsou hlavní metabolity 6'β-karboxy a 6'β-hydroxy simvastatin, zahrnují 30% celkové radioaktivity ve žluči po podání dávky <sup>14</sup>C simvastatinu. 6'β-karboxy a 6'β-hydroxy simvastatin tvoří 27% a 52% aktivity simvastatinu. V lidské žluči byli kromě těchto dvou metabolitů nalezeny i čtyři hlavní a několik vedlejších neaktivních metabolitů. Hlavní metabolická cesta je na obrázku. Simvastatin je metabolizován na 6'-exomethylen simvastatin. Enzymy cytochromu CYP přemění 6'-exomethylen na hypotetický meziprodukt aldehyd, který se dále metabolizuje na 6'β-karboxy simvastatin nebo je redukován reduktázou na 6'β-hydroxymethyl simvastatin. Enzymy CYP, které jsou zapojené do metabolismu simvastatinu ještě nebyly přesně identifikovány. Standardní metody vyžadované pro identifikaci CYP enzymů v metabolismu určitého léčiva byly navrženy Wrightonem a spol..[14] Ve studii in vitro, Transon a kolektiv [15] našli interakci simvastatinu s CYP2C9, CYP2D6, a CYP3A. Tyto studie ukazují, že simvastatin inhibuje metabolismus příslušných specifických substrátů, diklofenaku, dextromethorfanu a midazolamu.[16]

Obr. 7 – Metabolické cesty simvastatinu, které vedou k hlavnímu aktivnímu metabolitu ve žluči, 6 $\beta$ -karboxysimvastatinu. Ve žluči jsou tyto metabolity detekovány v jejich kyselé otevřené formě.



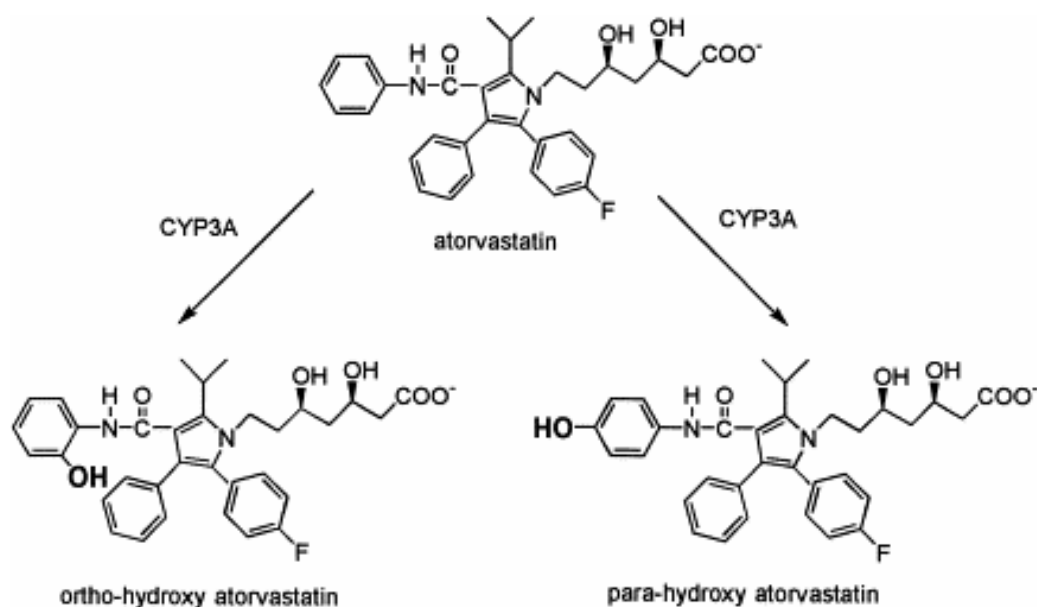
### Atorvastatin

Po podání 20 mg <sup>14</sup>C atorvastatinu bylo detekováno několik metabolitů v plazmě, moči a stolici. Plazmatický poločas atorvastatinu byl 12,6 hodin, plazmatický poločas ekvivalentů atorvastatinu byl 30 hodin a jejich radioaktivita byla 62,5 hodin, což nasvědčuje přítomnosti dlouhodobých neaktivních metabolitů. Po inkubaci v krysích, psích a lidských mikrozomech se tvoří *ortho* a *para*-hydroxy atorvastatin. Během studií *in vitro* na jaterních mikrozomech nebyly nalezeny žádné další metabolity. Oba metabolity mají srovnatelný efekt na inhibici HMG-CoA reductázy jako atorvastatin. Při inkubaci s lidskými jaterními buňkami se vytvořil další vedlejší β-oxidovaný neaktivní metabolit. Žádný z izolovaných primárních metabolitů nebyl později metabolizován enzymy CYP. Z enzymů CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2E1 a 3A4, pouze CYP3A4 metabolizuje atorvastatin na dva hlavní metabolity *ortho* a *para*-hydroxy atorvastatin. Ortho-hydroxy atorvastatin



byl tvořen desetkrát rychleji než para-hydroxy atorvastatin. Specifické chemické CYP inhibitory furafylin (CYP1A2), sulfafenazol (CYP2C9), chinidin (2D6), a diethyldithiokarbamát (CYP2E1) selhali v inhibici metabolismu atorvastatinu. Progestagen a ethinylestradiol, oba specifické inhibitory CYP3A4, snížili tvorbu metabolitů o 90 a 60% procent, z tohoto důvodu považujeme CYP3A4 za hlavní metabolickou cestu atorvastatinu. Tyto dva hlavní metabolity se také tvořily při inkubaci s intestinálními mikrozomy, proto předpokládáme roli CYP3A4 závislého intestinálního metabolismu a lékových interakcí v souvislosti s biologickou dostupností po perorálním podání. Data o atorvastatinu jako substrátu pro ABC transportéry a role zpětného transportu v jeho nízké biologické dostupnosti po perorálním podání nejsou zatím dostupná.[16]

Obr. 8 – Metabolické cesty atorvastatinu



## **4 Praktická část**

## 4.1 Použité chemikálie

Acetonitril HPLC gradient grade (Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika)

Uhličitan draselný bezvodý p.a. (Balex, Pardubice-Rosice n. L., Česká Republika)

BSA (*N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid) (Supelco, Bellefonte, USA)

BSTFA (*bis*(trimethylsilyl)trifluoroacetamid) (Supelco, Bellefonte, USA)

BSTFA+TMCS, 99:1 (Sylon BFT, (BSTFA+trimethylchlorsilan) (Supelco, Bellefonte, USA)

BSA+TMCS+TMSI, 3:2:3 (Sylon BTZ) (BSA+TMCS+ *n*-trimethylsilylimidazol) (Supelco, Bellefonte, USA)

*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamid, derivatization grade (Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika)

*N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid, p.a. pro GC (Fluka, Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika)

Kyselina mefenamová 98 % (Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika)

Kyselina flufenamová 98 % (Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika)

Simvacard ®, Simvastatinum 20mg v 1 potahované tabletě (Zentiva, Dolní Měcholupy, Česká Republika)

Torvacard ®, Atorvastatinum calcicum 20 mg v 1 potahované tabletě (Zentiva, Dolní Měcholupy, Česká Republika)

## 4.2 Použité roztoky

### 4.2.1 Příprava roztoků léčiv

#### Příprava roztoku simvastatinu

Do 20,0 ml odměrné baňky byla vložena jedna tableta Simvacardu® obsahující 20mg simvastatinu a byla rozpuštěna v acetonitrilu za pomoci ultrazvukové lázně a poté byla baňka doplněna acetonitrilem po značku. Suspenze byla přefiltrována přes filtr k odstranění nerozpustných podílů tablety.

#### Příprava roztoku atorvastatinu

Do 20,0 ml odměrné baňky byla vložena jedna tableta Torvacardu® obsahující 20mg atorvastatinu a byla rozpuštěna v acetonitrilu za pomoci ultrazvukové lázně a poté byla baňka doplněna acetonitrilem po značku. Suspenze byla přefiltrována přes filtr k odstranění nerozpustných podílů tablety.

#### Příprava vnitřního standardu

Jako vnitřní standard byl použit 0,1% roztok kyseliny mefenamové, který byl připraven rozpuštěním 1mg kyseliny mefenamové v 1 ml acetonitrilu.

Poté bylo pipetováno 250 $\mu$ l tohoto roztoku do vialky a přidáno stejné množství derivatizačního činidla a několik zrněk uhličitanu draselného. Použité derivatizační činidlo je shodné s činidlem použitým při derivatizaci léčiva. Derivatizace probíhala při 60 °C po dobu 60 minut.

50 $\mu$ l tohoto roztoku derivatizované kyseliny mefenamové bylo přidáváno ke 400 $\mu$ l roztoku derivatizovaného léčiva.

## 4.2.2 Příprava vzorků

### Derivatizace vzorků pro GC

Do vialky o objemu 3,5 ml bylo napipetováno 300  $\mu$ l roztoku léčiva. K tomuto roztoku byla postupně přidávána různá derivatizační činidla v různém poměru. Do vialky bylo přidáno několik zrněk bezvodého uhličitanu draselného k podpoře průběhu derivatizační reakce. Derivatizace probíhala při teplotách 60, 90, 120 °C a po dobu 30, 60, 90 a 120 minut. Snahou bylo zjistit optimální podmínky pro derivatizaci.

400  $\mu$ l derivatizovaného roztoku léčiva bylo napipetováno do vialky a k tomu bylo připipetováno 50  $\mu$ l vnitřního standardu.

200  $\mu$ l této směsi bylo napipetováno do vialky pro plynovou chromatografii a použito k nástřiku na GC.

### 4.3 Použité přístroje

GC systém: Shimadzu GC-17A (Japonsko), detektor FID, injector AOC-20i, kolona Equity-5 poly (5% bifenyl / 95% dimethylpolysiloxan; 0,32mm ID × 30m; 1,0mm d<sub>f</sub>) software CSW, verze 1.7 for Windows (Data Apex, Praha, ČR)

Analytické váhy SARTORIUS 2004 MP

Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonore Digitex, Berlin

Sušárna Memmert, model 200, Schwabach, Německo

## **5 Výsledky a diskuse**

## 5.1 Analýza statinů plynovou chromatografií

Vzhledem k tomu, že statiny jsou látky obsahující ve své molekule polární skupiny a mající vysokou molekulovou hmotnost, je možné analýzu metodou GC provádět až po převedení na těkavé deriváty. V této práci bylo vyzkoušeno několik derivatizačních činidel, se snahou nalézt optimální činidlo pro dané léčivo. Dále byl hodnocen vliv teploty a času, při kterém derivatizace probíhala, a také množství derivatizačního činidla potřebného pro průběh reakce. Dále byla práce zaměřena na optimalizaci chromatografických podmínek jako je teplota a tlak na koloně, doba analýzy, množství nastříkovaného vzorku, testování nástřikových technik split-splitless.

Jako mobilní fáze bylo použito helium. Analyty byly detekovány plamen-ionizačním detektorem termostatovaným na 320°C.

### 5.1.1 Výběr derivatizačního činidla

Při výběru vhodného derivatizačního činidla bylo vycházeno ze zkušeností analýzy látek podobných vlastností výše uvedených – látek obsahujících ve své molekule polární funkční skupiny, netěkavé o vyšší molekulové hmotnosti.

V práci Quintana a kol.[17], která se zabývala stanovení estrogenů ve vodě pomocí plynové chromatografie, bylo mimo jiné jako derivatizační činidlo použito BSTFA a BSTFA+TMCS, který slouží jako katalyzátor, a také MTBSTFA. Podobně i v práci Shareefa a kol.[18], která se zabývala vhodností některých derivatizačních činidel pro stanovení estrogenů plynovou chromatografií, bylo s výhodou použito BSTFA a také MTBSTFA. Obdobné informace byly také nalezeny v pracích Zhanga a kol.[19] a Hanse a kol.[20], zabývajících se rovněž problematikou analýzy estrogenů. Z práce Morrise a kol.[21] vyplývá, že pro lepší průběh derivatizační reakce je vhodné přidat několik zrněk bezvodého uhličitanu draselného jako katalyzátoru. Z výše jmenovaných článků vycházela také volba počáteční reakční teploty a času pro derivatizaci.

V první řadě bylo tedy nutné zjistit zda léčivo s derivatizačním činidlem reaguje či nikoli. Pro derivatizaci byla zvolena teplota 60°C a derivatizace probíhala po dobu 1 hodiny. Na začátku byla teplota na koloně 50°C a ta se lineárně zvyšovala o 10°C



za minutu na 260°C a tato teplota byla držena 15 minut. Protože za těchto podmínek nebylo dosaženo výsledků, byl použit přídatek bezvodého uhličitanu draselného jako katalyzátor a teplota na koloně byla nastavena na počátku na 250°C po dobu 1 minuty a poté se lineárním teplotním gradientem 10°C/min zvyšovala až na 300°C. Detektor a injektor byl termostatován na 320°C. Množství nastříkovaného vzorku bylo 1 µl a mód splitless nastaven na dobu 0,5 min. Za těchto podmínek již byly získány první produkty.

Schopnost jednotlivých činidel reagovat s léčivem je shrnuta v tabulce Tab. 9

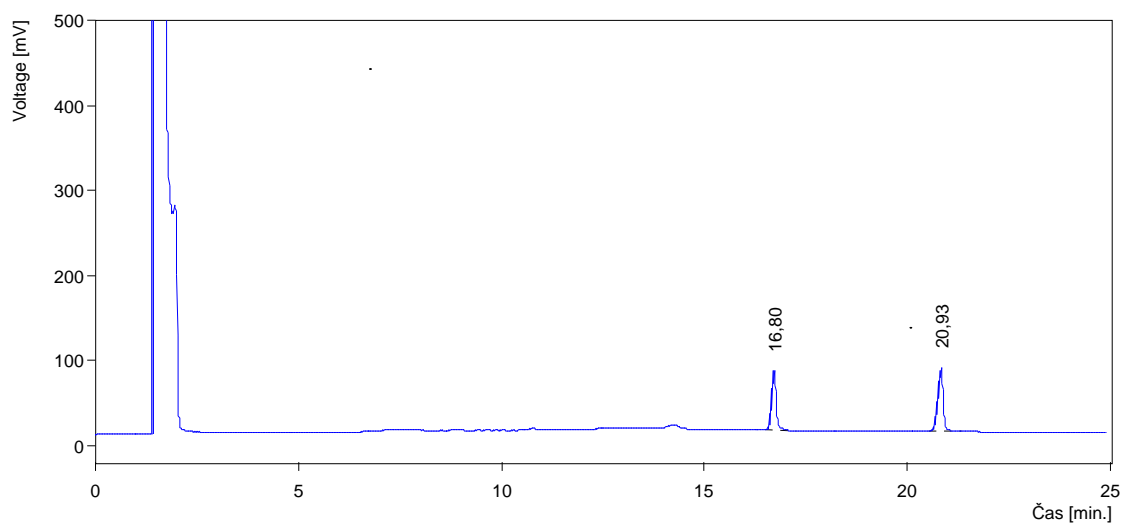
Tab. 9 - Reaktivita činidel s léčivem

léčivo	derivatizační činidlo / t <sub>R</sub> (min.)				
	BSTFA	BSTFA+TMCS	BSA+TMCS+TMSI	MSTFA	MTBSTFA
simvastatin	16,85	16,80	17,10	nereaguje	nereaguje
	20,95	20,93	21,57		
atorvastatin	nereaguje	22,90	nereaguje	nereaguje	19,39
					22,89

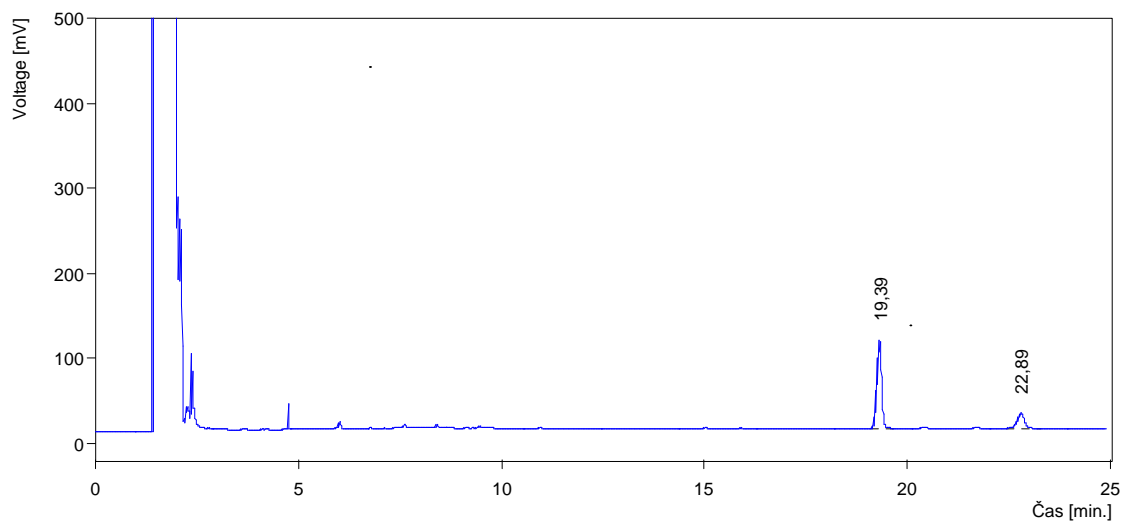
Pro simvastatin bylo vybráno derivatizační činidlo BSTFA+TMCS, a MTBSTFA pro atorvastatin. Při použití těchto derivatizačních činidel bylo dosaženo dobré odezvy a píky na chromatografických záznamech jsou ostré a symetrické.

Jak v případě derivatizace simvastatinu, tak atorvastatinu, v porovnání se slepým pokusem (blank), se na chromatogramu vyskytovala dvojice píků. V případě simvastatinu reaguje karboxylová skupina vznikající při hydrolýze laktonového kruhu v prostředí uhličitanu draselného a pravděpodobně druhé reaktivní místo zřejmě představuje hydroxylová skupina na C4. U atorvastatinu je druhý pík velmi malý, zřejmě se jedná o vedlejší reakční produkt jedné z hydroxylových skupin nebo rozkladný produkt. (strukturní vzorce viz. Obr. 6)

Obr. 9 – Chromatografický záznam simvastatinu při použití BSTFA+TMCS jako derivatizačního činidla



Obr. 10 – Chromatografický záznam atorvastatinu při použití MTBSTFA jako derivatizačního činidla

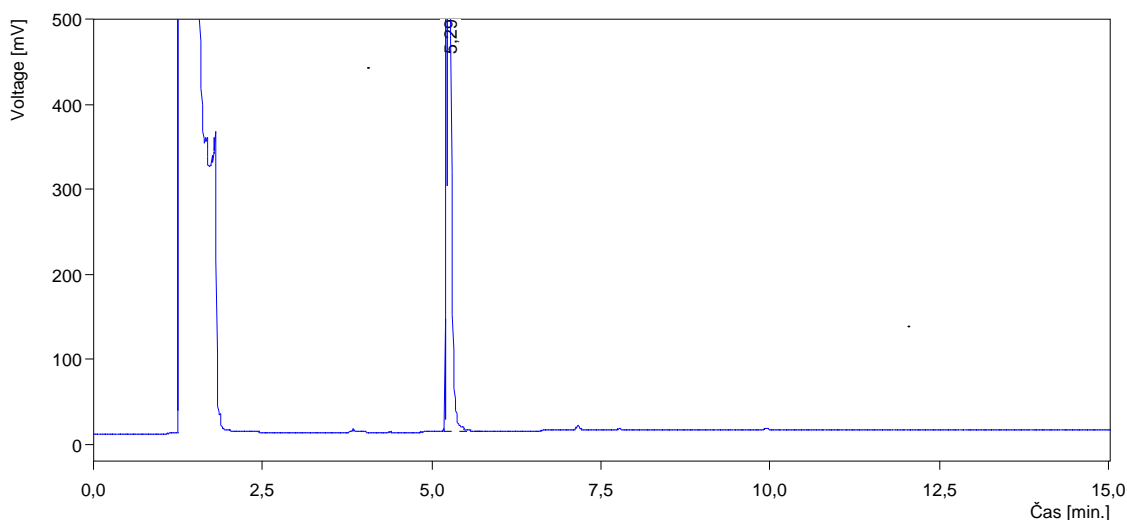


### 5.1.2 Výběr vhodného vnitřního standardu

Aby bylo možné kvantitativně posoudit průběh derivatizace a analýzy léčiva za daných podmínek, bylo nutné nalézt látku použitelnou jako vnitřní standard. Byly zkoušeny látky podobného charakteru, tedy látky středně polární, kyselého charakteru, konkrétně kyselina mefenamová, flufenamová. Kyselina flufenamová se však eluovala v těsné blízkosti píků derivatizačního činidla. Vhodnou látkou se ukázala kyselina mefenamová, která má dostatečnou teplotu varu a její retenční čas leží mimo píky léčiva i derivatizačního činidla.

Kyselina mefenamová byla také derivatizována, a to vždy stejným derivatizačním činidlem jako léčivo, po dobu 60 minut při 60°C.

Obr. 11 – Chromatografický záznam kyseliny mefenamové



### 5.1.3 Výběr optimální teploty pro derivatizaci

Další postup byl zaměřen na nalezení optimální teploty pro derivatizaci, přičemž je žádoucí aby derivatizace proběhla kvantitativně v největší možné výtěžnosti vzniklého produktu. Byl posuzován průběh derivatizace při 60, 90, 120°C po dobu 60 minut. Pro zjištění kvantitativního průběhu derivatizace bylo použita plocha píku léčiva v poměru k ploše píku IS.

Tab. 10 - Poměr plochy píků simvastatinu k ploše píku IS při dané teplotě

plocha píků A	reakční teplota		
	60°C	90°C	120°C
A <sub>IS</sub>	522,62	612,52	793,01
A <sub>1.pík</sub>	601,01	634,50	718,65
A <sub>2.pík</sub>	540,13	1223,68	1367,57
poměr plochy píku léčiva a vnitřního standardu			
A <sub>1.pík</sub> / A <sub>IS</sub>	1,15	1,04	0,91
A <sub>2.pík</sub> /A <sub>IS</sub>	1,03	1,99	1,74

Z vyjádřených poměrů plochy píku léčiva a IS vyplývá, že při 90°C vzniká největší množství produktu a byla pro další práci využívána tato reakční teplota.

Tab. 11 - Poměr plochy píků atorvastatinu k ploše píku IS při dané teplotě

plocha píků A	reakční teplota		
	60°C	90°C	120°C
A <sub>IS</sub>	731,34	868,24	773,30
A <sub>1.pík</sub>	630,16	794,22	164,19
A <sub>2.pík</sub>	82,16	86,04	22,39
poměr plochy píku léčiva a vnitřního standardu			
A <sub>1.pík</sub> / A <sub>IS</sub>	0,86	0,91	0,21
A <sub>2.pík</sub> /A <sub>IS</sub>	0,11	0,10	0,03

Pro atorvastatin je také vhodná reakční teplota 90°C, při vyšších teplotách už ale zřejmě dochází k rozkladu léčiva, protože plocha píku se zmenšila.

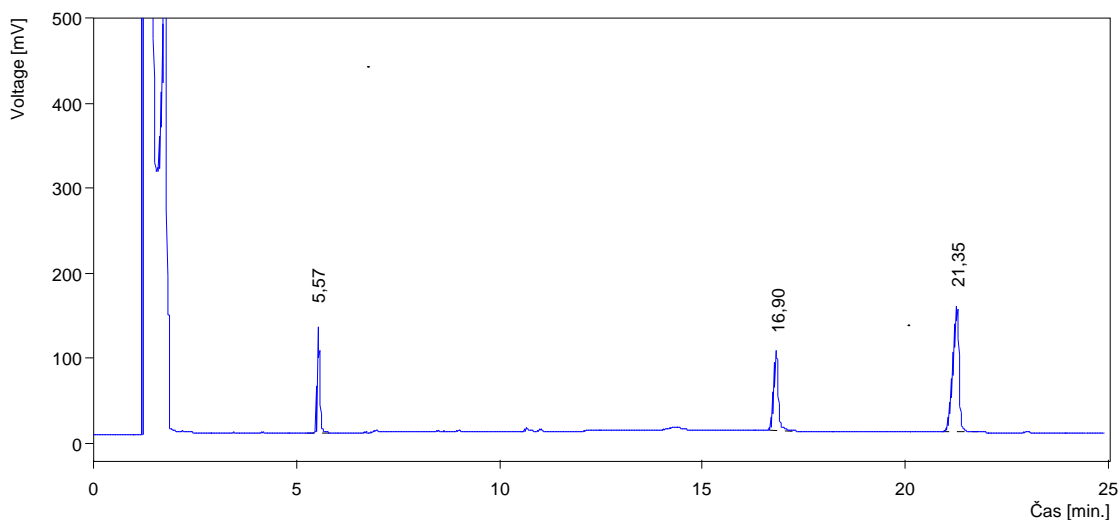
#### 5.1.4 Volba času nutného pro derivatizaci

Pro obě léčiva byla tedy zvolena reakční teplota 90°C a dále byla práce zaměřena na nalezení vhodného času derivatizace za dané teploty tak, aby se analýza zbytečně neprodložovala, ale reakce proběhla s dostatečnou výtěžností. Byl posuzován průběh derivatizace při optimální teplotě po dobu 30, 60, 90, 120 minut.

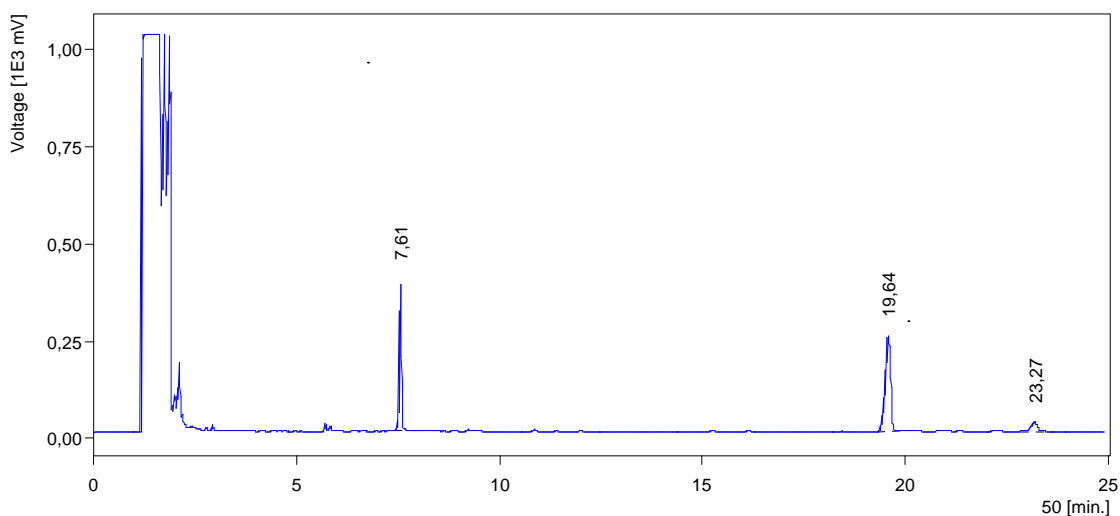
V případě simvastatinu byla plató fáze dosažena po 60 minutách, u atorvastatinu proběhla reakce dostatečně po 30 minutách.

Protože atorvastatin poskytoval malou odezvu, byl nástřik vzorku zvýšen na 8  $\mu$ l.

Obr. 12 – Chromatografický záznam simvastatinu, teplota derivatizace 90°C, čas derivatizace 60 min., nástřik 1  $\mu$ l



Obr. 13 - Chromatografický záznam atorvastatinu, teplota derivatizace 90°C, čas derivatizace 30 min., nástřik 8  $\mu$ l



### 5.1.5 Množství derivatizačního činidla

Všechna měření až doposud byla prováděna v poměru 1:1, léčivo : derivatizační činidlo. Další práce byla zaměřena na zjištění, zda větší přídavek derivatizačního činidla nevede k větší odpovědi nebo naopak není dostačující již menší přídavek derivatizačního činidla. Měření bylo prováděno se vzorky, kde poměr léčiva ku derivatizačnímu činidlu byl 2:1, 1:1, 1:2 a 1:3. Z hodnot ploch píků uvedených v tabulce Tab. 12, vyplývá, že je zcela dostačující poměr léčiva a derivatizačního činidla 2:1. Při použití poměru 1:1 jsou výsledky velmi obdobné, a proto je i z ekonomických důvodů vhodné použít menší množství derivatizačního činidla.

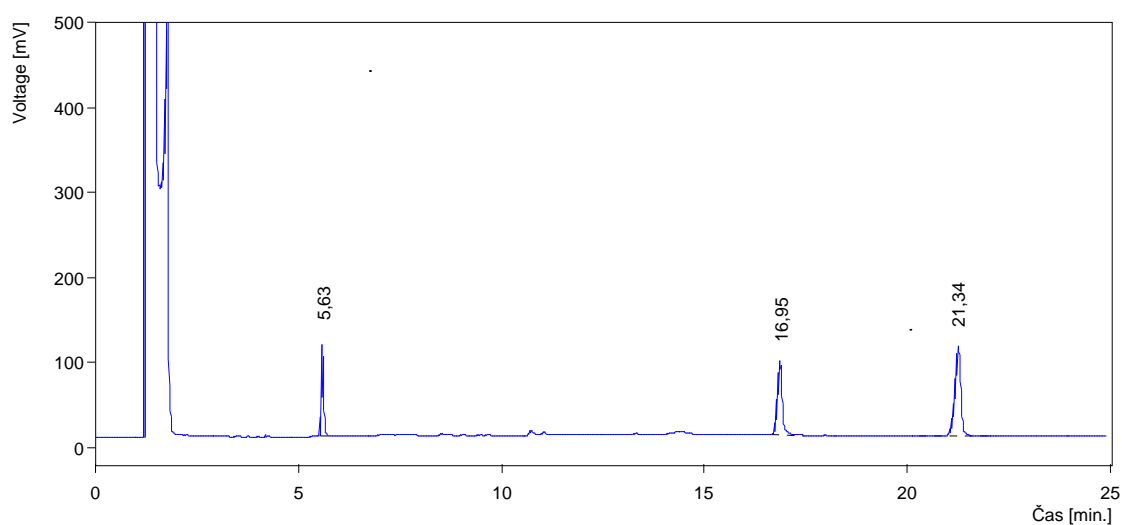
Tab. 12 - Poměr plochy píků simvastatinu a IS, při různých poměrech léčiva a derivatizačního činidla, nástřik 1  $\mu$ l

plocha píků A	poměr simvastatinu a derivatizačního činidla			
	2:1	1:1	1:2	1:3
$A_{IS}$	405,56	437,12	696,75	497,88
$A_{1,pík}$	705,45	544,35	534,32	260,69
$A_{2,pík}$	1073,63	1233,07	942,17	563,66
poměr plochy píku léčiva a vnitřního standardu				
$A_{1,pík} / A_{IS}$	1,74	1,25	0,77	0,52
$A_{2,pík} / A_{IS}$	2,65	2,82	1,35	1,13

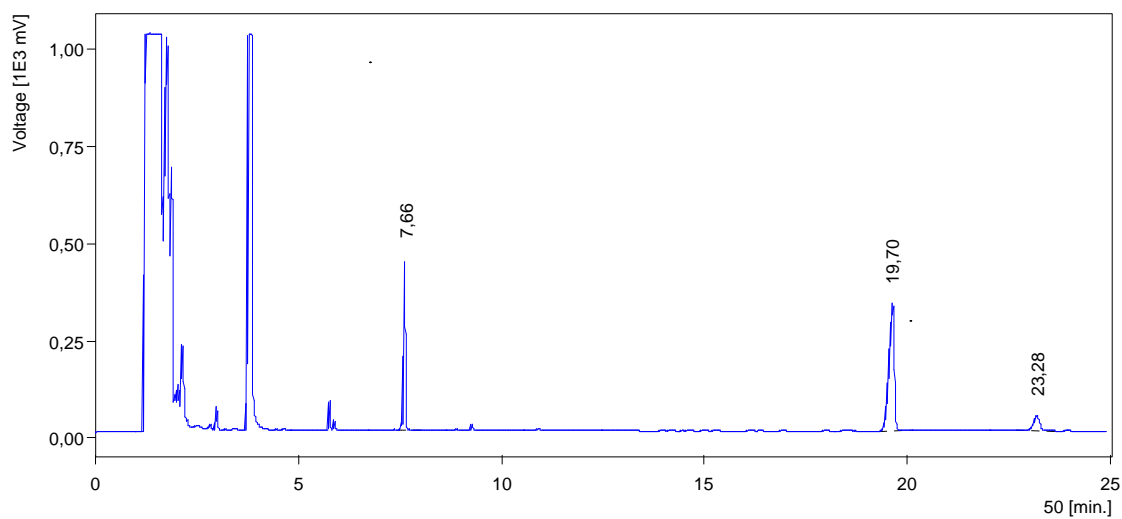
Tab. 13 - Poměr plochy píků atorvastatinu a IS, při různých poměrech léčiva a derivatizačního činidla, nástřik 8  $\mu$ l

plocha píků A	poměr atorvastatinu a derivatizačního činidla			
	2:1	1:1	1:2	1:3
$A_{IS}$	1371,91	1457,36	1500,61	1400,46
$A_{1,pík}$	2696,60	2937,52	1051,02	808,46
poměr plochy píku léčiva a vnitřního standardu				
$A_{1,pík} / A_{IS}$	1,97	2,02	0,70	0,58

Obr. 14 – Chromatografický záznam simvastatinu při použití derivatizačního činidla v poměru 2:1 (léčivo:derivatizační činidlo), nástřik 1  $\mu$ l



Obr. 15 - Chromatografický záznam atorvastatinu při použití derivatizačního činidla v poměru 2:1 (léčivo:derivatizační činidlo), nástřik 8  $\mu$ l



### 5.1.6 Optimalizace citlivosti metody

Dále byl sledován vliv množství vzorku, které se dostane na kolonu, k velikosti píku.

Množství vzorku nastříkovaného na kolonu. Aby bylo dosaženo větší citlivosti bylo množství vzorku simvastatinu nastříkovaného na kolonu zvýšeno z 1 $\mu$ l na 8 $\mu$ l. U atorvastatinu byl nástřik zvýšen na 8  $\mu$ l již dříve, protože menší nástřik neposkytoval dostatečnou odezvu.

Doba splitlessu. Spolu s větším nástřikem byla i zvyšována doba splitlessu, tedy doba po kterou je uzavřena větev pro odchod nadbytečného vzorku, a tudíž se více vzorku dostává na kolonu. Za optimální byla zvolena doba splitlessu 1,5.

Poměr splitu. Dalším faktorem, který ovlivňuje citlivost metody, je poměr splitu, tedy poměr toku nosného plynu ventilem splitu ku toku kolonou. Čím je poměr splitu menší, tím více vzorku se dostává na kolonu. Tento poměr byl snížen z původních 22 na 10.

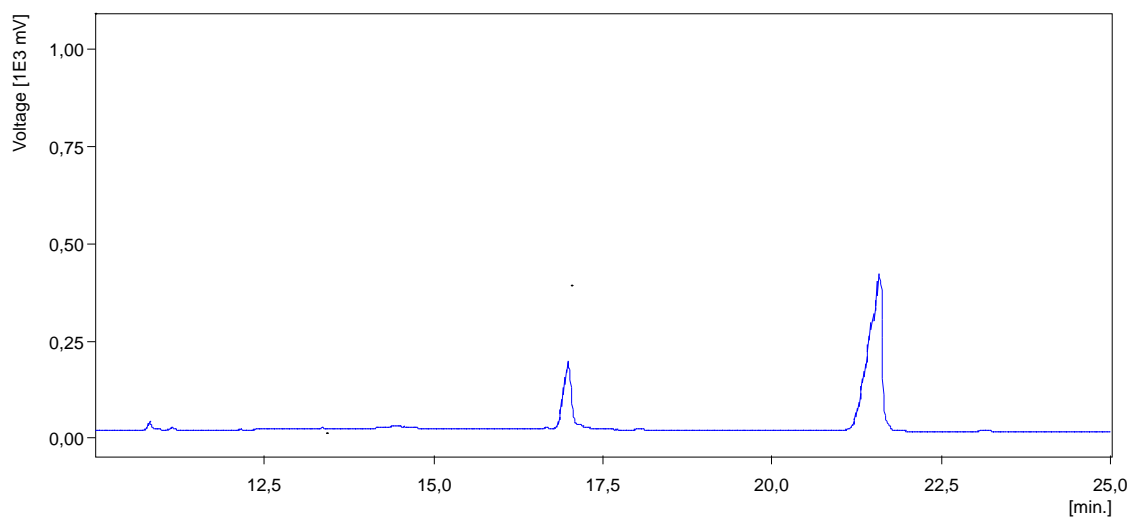
Vysokotlaký mód. Nastříknutí většího množství vzorku lze dosáhnout i použitím vysokotlakého módu, kdy je tlak po dobu nástřiku větší než v průběhu analýzy. Při nástřiku byl použit tlak 150 kPa po dobu jedné minuty. Použitím tohoto modu byla u obou léčiv získána dostatečná odezva.

Tab. 14 - Shrnutí optimálních podmínek

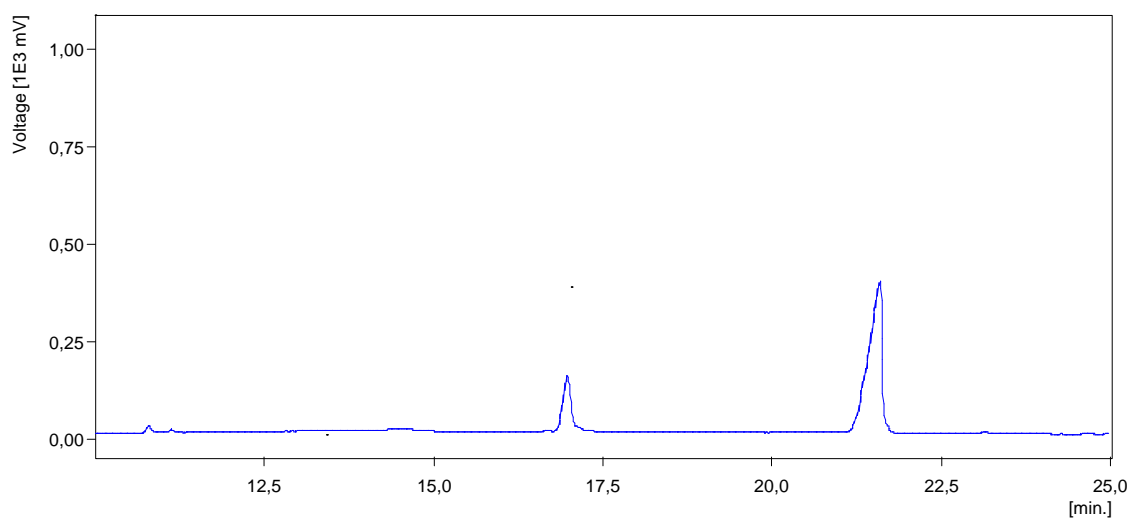
parametr	simvastatin	atorvastatin
derivatizační činidlo	BSTFA+TMCS	<i>N-tert.</i> butyldimethylsilyl- <i>N</i> -methyltrifluoracetamid
teplota derivatizace	90°C	90°C
čas derivatizace	60 min.	30 min.
katalýza	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
kvantifikace, IS	kys. mefenamová, derivatizovaná stejným DČ	kys. mefenamová, derivatizovaná stejným DČ
nástřik	8 $\mu$ l	8 $\mu$ l
doba splitlessu	1,5	1,5
nástřikový mód	vysokotlaký mód, spl-r 10	vysokotlaký mód, spl-r 10



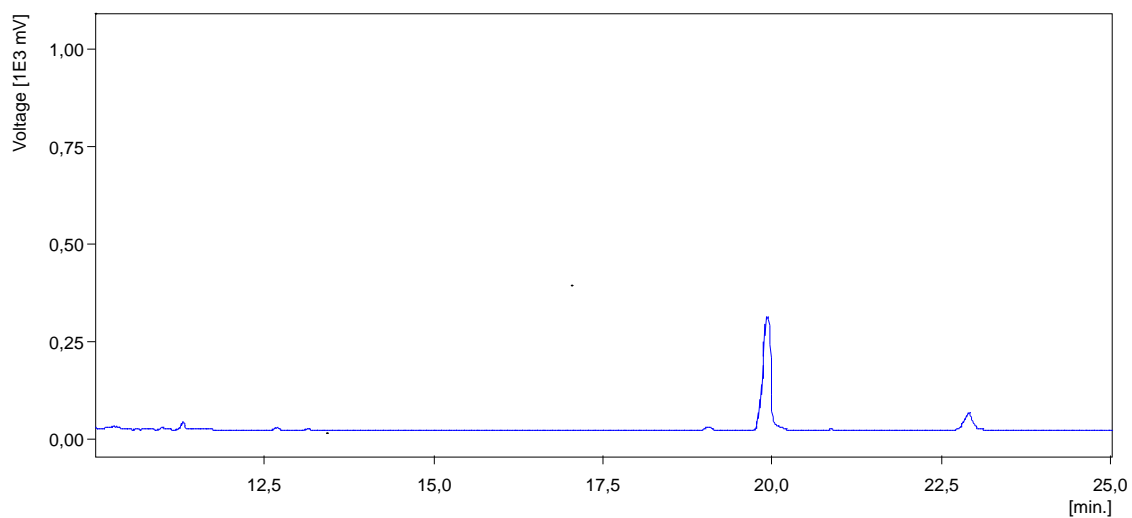
Obr. 16 – Chromatografický záznam simvastatinu za optimálních podmínek, spl-r 10



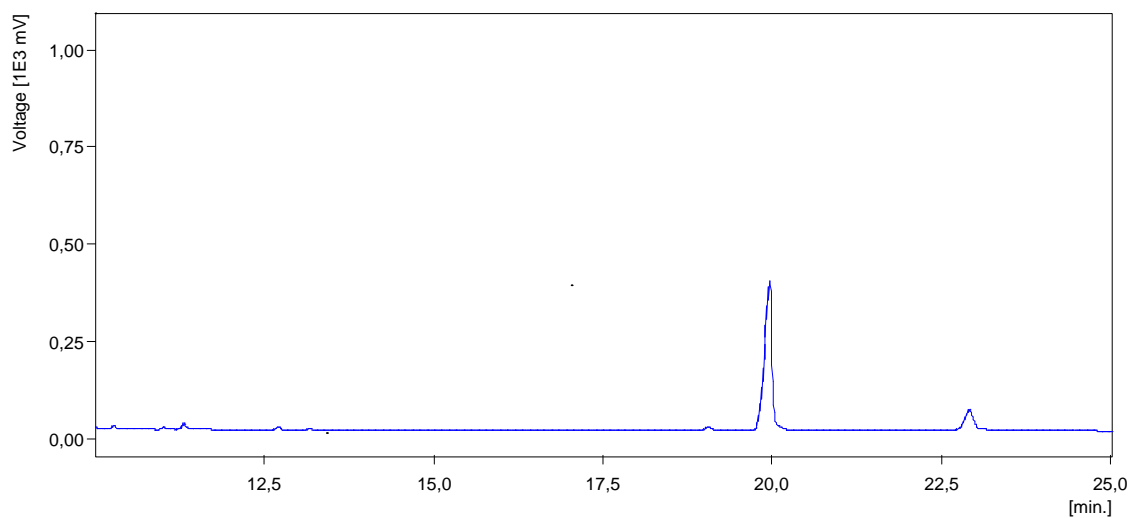
Obr. 17 – Chromatografický záznam simvastatinu za optimálních podmínek, vysokotlaký mód nástřiku



Obr. 18 – Chromatografický záznam atorvastatinu za optimálních podmínek, spl-r 10



Obr. 19 – Chromatografický záznam atorvastatinu za optimálních podmínek, vysokotlaký mód nástřiku



### 5.1.7 Limit detekce a kvantifikace píku

Mez detekce a stanovitelnosti píku se určuje z výpočtu poměru signálu k šumu.

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

H – výška píku

h – rozpětí šumu pozadí[22]

Mez detekce píku odpovídá poměru signálu k šumu = 3.

Mez stanovitelnosti píku odpovídá poměru signálu k šumu = 10.

Tab. 15 - Limity detekce a kvantifikace

	h (mV)	H (mV)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
simvastatin - 1.pík	0,6	146,743	6,4644	21,5479
simvastatin - 2.pík	0,6	303,539	3,1251	10,4171
atorvastatin	0,6	389,152	2,4376	8,1254

Koncentrace léčiva ve vzorku je 527µg/ml.

Výpočet limitu detekce (LOD):

$$LOD = \frac{(3 \times h) \times 527}{H}$$

Výpočet limitu kvantifikace (LOQ):

$$LOQ = \frac{(10 \times h) \times 527}{H}$$

Z vypočtených limitů vyplývá, že citlivost této metody je srovnatelná s citlivostí HPLC-UV (citlivost spektrofotometrických detektorů je  $10^{-9}$  až  $10^{-10}$  g/ml [1]). Větší odezvy bychom dosáhli při použití ECD detektoru, protože použitá derivatizační činidla obsahují ve své molekule halogeny. Jinou možnou volbou by mohlo být využití MS detekce z důvodu vysoké citlivosti a selektivnosti, a to jak ve spojení s GC tak i HPLC.

## 6 Závěr

V této práci byly získány následující výsledky:

- Optimálních výsledků při analýze statinů bylo dosaženo při následujícím teplotním gradientu:
    - první minutu při teplotě 250°C
    - dále se teplota zvyšovala rychlostí 10°C/min. do výsledné teploty 320°C s další izotermickou částí
- Plamenově-ionizační detektor byl termostatován na teplotu 320°C.
- Jako optimální derivatizační činidlo bylo zvoleno BSTFA+TMCS pro simvastatin, a N-tert-butyl(dimethylsilyl)trifluoracetamid pro atorvastatin.
  - Přídavkem bezvodého uhličitánu draselného bylo získáno alkalické prostředí, které umožnilo derivatizaci.
  - Nejvhodnější teplota pro derivatizaci je u obou léčiv 90°C.
  - Čas po který je nezbytné nechat proběhnout derivatizaci je 60 minut u simvastatinu a 30 minut u atorvastatinu.
  - Kvantifikace byla v obou případech provedena pomocí kyseliny mefenamové jako vnitřního standardu, která byla rovněž derivatizována, a to stejným derivatizačním činidlem jako dané léčivo. Derivatizace IS probíhala při teplotě 60°C po dobu 60 minut.
  - Největší výtěžnosti reakce bylo dosaženo při použití polovičního množství derivatizačního činidla než je množství léčiva.
  - Z důvodu lepší odezvy byl použit nástřík vzorku o objemu 8 $\mu$ l a také vysokotlaký mód nástříku, kdy tlak na počátku kolony byl 150 kPa po dobu jedné minuty.
  - Po derivatizaci se analyty eluovaly v podobě dvou píků.
  - Limit detekce je 6,4644  $\mu$ g/ml pro 1. pík simvastatinu; 3,1251  $\mu$ g/ml pro 2. pík simvastatinu a 4,6250  $\mu$ g/ml pro atorvastatin.
  - Limit kvantifikace je 21,5479  $\mu$ g/ml pro 1. pík simvastatinu; 10,4171  $\mu$ g/ml pro 2. pík simvastatinu a 8,1254  $\mu$ g/ml pro atorvastatin.

## 7 Literatura

- [1] Klimeš, J.: Kontrola chemických léčiv I., Karolinum, Praha (2002), str.: 31, 37-40.
- [2] Klee, M.,S.: GC – Inlets – An Introduction, Hewlett-Packard Company, USA (1990), str.34.
- [3] Mikeš, O.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha (1980), str.: 482-483.
- [4] Drozd, J.: Chemické listy, svazek 70, Chemická derivatizace v plynové chromatografii, Brno (1976), str.: 268-272.
- [5] Žižková, O.: Diplomová práce (2005)
- [6] Cazes, J.: Encyclopedia of Chromatography, Marcel Dekker, Inc. New York (2001), str. 237-240.
- [7] Grob, R.L.: Modern Practice of Gas Chromatography, Wiley Interscience (2004), str: 37-44, 48-50, 54-57, 87-88, 97-99, 130-144.
- [8] Martin, A. J. P., Synge, R. L. M.: Biochemical Journal, London (1941), str. 35.
- [9] James, A. T., Martin, A. J. P.: Biochemical Journal, London (1952), str. 50.
- [10] Grob, R. L.: „Analysis of the Enviroment“ in Contemporary Topics in Analytical and Clinical Chemistry, Vol 1, New York (1977).
- [11] Grob, R. L., Kaiser, M. A.: Enviromental Problem Solving Using Gas and Liquid Chromatography, Elsevier, Amsterdam (1982).
- [12] Vokurka, M.: Velký lékařský slovník, Maxdorf, Praha (2003), str. 824.
- [13] Remedia compendium, Panax, Praha (1997), str.98.
- [14] Wrighton, S.A., VandenBranden, M., Steven, J.C., Shipley, L.A. and Ring, B.J.: In vitro methods for assessing human hepatic drug metabolism: their use in drug development. Drug Metabolism Review 25 (1993), str. 453–484.
- [15] Transon, C., Leemann, T. and Dayer, P.: In vitro comparative inhibition profiles of major human drug metabolising cytochrome P450 isozymes (CYP 2C9, CYP 2D6, and CYP 3A4) by HMG-CoA reductase inhibitors. Eur. J. Clin. Pharmacol. 50 (1996), str. 209–215.
- [16] Christians, Pharmacology and Therapeutics, Volume 80, Issue 1 (1998), Pages 1-34: Metabolism and Drug Interactions of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors in Transplant Patients.

- [17] Quintana, J.B.: Journal of Chromatography A, 1024 (2004) 177-185, Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection.
- [18] Shareef, A.: Journal of Chromatography A, 1026 (2004) 295-300, Suitability of *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and *N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide as derivatization reagents for the determination of the estrogens estrone and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry.
- [19] Zhang, K.: Analytical Chimica Acta (2005), Pitfalls and solutions for simultaneous determination of estrone and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid.
- [20] Hans, G.J.: Journal of Chromatography A, 879 (2000) 97-112, Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with *N*-methyl-*N*-(*tert*-butyldimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection.
- [21] Morris, M.J.: Biological Mass Spectrometry, vol.22, 1-8 (1993), Determination of the HMG-CoA Reductase Inhibitors Simvastatin, Lovastatin, and Pravastatin in Plasma by Gas Chromatography/Chemical Ionization Mass Spectrometry.
- [22] Český lékopis 2005, Grada Publishing a. s., Praha 2005, str. 182



## Seznam tabulek

Tab. 1 - Sloučeniny, které dávají malou nebo nedávají žádnou odezvu v plamenovém ionizačním detektoru. ....	14
Tab. 2 - Teplota varu a RI vybraných sloučenin .....	18
Tab. 3 - Teplota varu a RI vybraných vícesytných sloučenin .....	18
Tab. 4 - Fyzikálně-chemické a plynově chromatografické vlastnosti některých silylačních činidel .....	20
Tab. 5 - Fyzikálně-chemické a plynově chromatografické vlastnosti některých acylačních činidel .....	23
Tab. 6 - Fyzikálně-chemické a plynově chromatografické vlastnosti některých alkylačních činidel .....	24
Tab. 7 - Derivatizace diolů a aminoalkoholů .....	25
Tab. 8 - Doporučované lineární průtokové rychlosti a průtoky pro helium a pro vodík.....	40
Tab. 9 - Reaktivita činidel s léčivý .....	57
Tab. 10 - Poměr plochy píků simvastatinu k ploše píku IS při dané teplotě.....	60
Tab. 11 - Poměr plochy píků atorvastatinu k ploše píku IS při dané teplotě.....	60
Tab. 12 - Poměr plochy píků simvastatinu a IS, při různých poměrech léčiva a derivatizačního činidla, nástřik 1 $\mu$ l .....	62
Tab. 13 - Poměr plochy píků atorvastatinu a IS, při různých poměrech léčiva a derivatizačního činidla, nástřik 8 $\mu$ l .....	62
Tab. 14 - Shrnutí optimálních podmínek.....	64
Tab. 15 - Limity detekce a kvantifikace .....	67