

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Chemie životního prostředí



Jaroslav Smitka

Optimalizace separace a kvantifikace předpokládaných produktů velkého třesku
Optimization of separation and quantification of prospective products
of big bang

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Praha, 2011

Tato práce byla vypracována ve spolupráci s Akademií věd České republiky za finanční podpory grantu GA AV č. IAA X00100903.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 31.05.2011

Jaroslav Smitka

Velmi bych chtěl poděkovat své školitelce prof. Evě Tesařové za její odborné vedení, rady a připomínky. Dále bych chtěl poděkovat svému konzultantovi Radomíru Čabalovi Ph.D. za čas, který mi věnoval při práci na plynové chromatografii a za rady, které mi poskytoval v průběhu celé práce.

Klíčová slova: velký třesk
laserové jiskry
formamid
2-amino-1-butanol
3-methoxy-1-propanol
2-methyl-1-butanol
plynová chromatografie
vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Key words: big bang
laser sparks
formamide
2-amino-1-butanol
3-methoxy-1-propanol
2-methyl-1-butanol
gas chromatography
high performance liquid chromatography

Abstrakt

Bakalářská práce je příspěvkem k výzkumu zaměřenému na modelování podmínek velkého třesku a sledování případných reakčních produktů. Jako výchozí sloučeniny byly vybrány 2-amino-1-butanol, 3-methoxy-1-propanol, 2-methyl-1-butanol a formamid, z nichž některé byly následně ostřelovány PALSem na Fyzikálním ústavu Jaroslava Heyrovského AV ČR. Pro analýzu byly testovány metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí a kapalinová chromatografie s UV detekcí. V systému GC-MS byly proměřeny kalibrační závislosti 3-methoxy-1-propanolu a 2-methyl-1-butanolu a vypočteny hodnoty LOD resp. LOQ. Srovnání analýzy neostřelovaného a ostřelovaného 3-methoxy-1-propanolu neukázalo vznik nových reakčních produktů, neboť výchozí 3-methoxy-1-propanol byl v přílišném nadbytku. Zjištěné sloučeniny lze spíše identifikovat jako nečistoty přítomné v rozpouštědle či ve vlastním standardu. V optimalizovaném systému HPLC se podařilo vzájemně rozdělit tři standardy. Formamid, který je nevhodný k analýze plynovou chromatografií, vzhledem k jeho vysoké polaritě, však eluoval ve všech testovaných separačních systémech HPLC v oblasti systémových píků (s mrtvým časem). Přesto byl pro srovnání analyzován vzorek ostřelovaný PALSem i původní standard. Srovnání však neukázalo žádné produkty reakce v ostřelovaném vzorku.

Abstract

The thesis is a contribution to research aimed at modeling the conditions of the Big Bang and monitoring possible reaction products. As the starting compounds were selected 2-amino-1-butanol, 3-methoxy-1-propanol, 2-methyl-1-butanol, formamide, some of which were subsequently bombarded by PALS at J. Heyrovsky Institute of Physics, Academy of Sciences. Gas chromatography hyphenated with mass spectrometry and liquid chromatography with UV detection were used for

analysis. In GC-MS, calibration of 3-methoxy-1-propanol and 2-methyl-1-butanol was carried out and LOD and LOQ were calculated. Comparison of 3-methoxy-1-propanol and bombarded 3-methoxy-1-propanol did not show the emergence of new products since 3-methoxy-1-propanol was in excess. The found compounds can be more likely identified as impurities present in a solvent or in the individual standards. The optimized HPLC system has managed to separate the three standards. Formamide, which is unsuitable for analysis by gas chromatography, due to its high polarity, however, eluted in all tested systems with system peak (the dead time marker). Nevertheless, the bombarded sample was analyzed for comparison with the original standard. Comparison, however, showed no reaction products in the bombarded sample.

Seznam zkratek

ACN	acetonitril
a.u.	arbitrární jednotka
AV ČR	Akademie věd České republiky
BSTF	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CI	chemická ionizace
ECD	detektor elektronového záchytu
EI	elektronová ionizace
eV	elektronvolt
FID	plamenově ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
GCMS	plynový chromatograf s hmotnostně spektrometrickým detektorem
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
k	retenční faktor
LIDB	dielektrický průraz plynu
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
m/z	poměr hmotnosti ku náboji
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v normálním uspořádání
PALS	obří laserový systém v Praze
pH	záporný logaritmus aktivity vodíkových iontů
PID	fotoionizační detektor
R	rozlišení
RF	odezvoový faktor
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v reverzním uspořádání

S/N	poměr signálu ku šumu
SCAN	mód hmotnostní spektrometrie pro vyhledání iontů v určitém hmotovém rozmezí
SDRF	směrodatná odchylka odezvového faktoru
SIM	mód hmotnostní spektrometrie
TMCS	trimethylchlorsilan
t_M	mrtvý čas
t_R	retenční čas
UV	ultrafialová oblast spektra
v/v	objemový poměr
VIS	viditelná oblast spektra
VUV	vakuové ultrafialové záření
XUV	rentgenové ultrafialové záření
Y	šířka píku při základně

Obsah

Klíčová slova, Key words	4
Abstrakt, Abstract	5
Seznam zkratk	7
Obsah	9
1 Úvod	11
2 Teoretická část	12
2.1 Vývoj rané atmosféry	12
2.2 Velký třesk	12
2.2.1 Atmosféra titanu	15
2.3 Laserové jiskry a vznik plazmatu	15
2.3.1 Možnosti vyvolání chemických reakcí laserovým plazmatem.....	15
2.4 PALS	16
2.5 Analyty studované v této práci	16
2.5.1 Formamid	16
2.5.2 2-amino-1-butanol, 3-methoxy-1-propanol, 2-methyl-1-butanol.....	17
2.6 Metody analýzy	17
2.7 Chromatografické metody	17
2.7.1 Plynová chromatografie	18
2.7.1.1 Proces separace v GC	18
2.7.1.2 Detektory v plynové chromatografii	18
2.7.1.2.1 Plamenově ionizační detektor	19
2.7.1.2.2 Plynový chromatograf ve spojení s hmotnostním spektrometrem .	19
2.7.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	20
2.7.2.1 Detektory ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.....	21
2.7.2.1.1 Spektrofotometrický detektor	21
2.8 Vyhodnocení chromatogramu	21
3 Experimentální část	23
3.1 Použité chemikálie	23
3.2 Použité přístroje.....	23
3.3 Příprava roztoků	24
3.4 Ozařování studovaných látek systémem PALS.....	25
3.5 Podmínky měření	25
3.5.1 GC-MS	25
3.5.2 HPLC.....	26
4 Výsledky a diskuze	28
4.1 Analýza vzorků na plynovém chromatografu	28

4.1.1	Analýza 2-amino-1-butanolu.....	28
4.1.2	Analýza 3-methoxy-1-propanolu	29
4.1.3	Analýza 2-methyl-1-butanolu.....	30
4.1.4	Kalibrační závislost 3-methoxy-1-propanolu a 2-methyl-1-butanolu ..	31
4.1.7	Stanovení mezí detekce a stanovitelnosti.....	34
4.1.8	Analýza ostřelovaného 3-methoxy-1-propanolu	35
4.2	Separace a analýza vzorků vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ...	38
4.2.1	Optimalizace separace standardů	38
4.2.2	Analýza ozařovaného a neozařovaného formamidu	39
5	Závěr.....	43
	Literatura.....	44
	Příloha 1	46
	Příloha 2	50

1 Úvod

Vznik života a způsob, jak lidé byli stvořeni, zajímá lidstvo po dlouhá století. Dohady o stvoření jsou často spojovány buď s náboženstvím, či s vědou. Ve středověku například převládal názor, že z hnijící neživé hmoty vzniká hmota živá (červi), čímž vznikla teorie samoplození. Teorií vzniku života se zabývali i slavní vědci jako Louis Pasteur či Charles Darwin. Ještě v 19. a 20. století se objevovala panspermická teorie. Tato myšlenka popisuje vznik života tak, že mikroskopický život byl přenesen vesmírem až na Zem.

V současné době existuje teorie velkého třesku. Po velké explozi došlo ke shluku částic, které daly vzniknout jednoduchým prvkům. Postupem času takto vznikly stavební kameny nutné pro život – aminokyseliny, sacharidy a nukleové kyseliny.

Aminokyseliny stejně jako sacharidy se ve volné přírodě vyskytují jako enantiomery (optické izomery) buď v L- či D- formě. Aby byla vysvětlena homochiralita v přírodě se vyskytujících aminokyselin, využívá se na Ústavu fyzikální chemie AV ČR generování plazmatu v látkách, které si jsou s aminokyselinami chemicky podobné, a které by mohly sloužit jako jejich prekurzory.

Mezi takto vybranými látkami jsou formamid, 2-amino-1-butanol, 3-methoxy-1-propanol a 2-methyl-1-butanol.

Např. formamid obsahuje veškeré prvky (kromě helia), které existovaly již při rané chemické evoluci. Je proto v současné době hojně studován, neboť by mohl poskytnout přesnější odpověď na to, co se po velkém třesku stalo.

Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na hledání vhodných separačních metod pro identifikaci a stanovení výše uvedených prekurzorů i produktů velkého třesku realizovaného v laboratorních podmínkách.

2 Teoretická část

2.1 Vývoj rané atmosféry

Sedimentární horniny, které byly nalezeny v západním Grónsku v oblasti Isua, jsou doposud nejstarším důkazem života. Ačkoliv planeta Země je dle odhadů stará 4,5 miliardy let, sedimentární horniny jsou pouze 3,8 miliardy let staré. Byť bylo při analýze zjištěno, že složení izotopů zaujímaloby obdobné poměrové zastoupení uhlíku jako dnes, zůstávají podmínky na planetě Zemi prvních 700 milionů let téměř neznámé [1,2].

Současná atmosféra, která je převážně tvořena dusíkem a kyslíkem, vznikla pravděpodobně z atmosféry primární (původní, pravděpodobně redukční), která obsahovala pouze plyny ze sluneční mlhoviny. Uvolnění těchto plynů a následné zachycení v zemském jádře dalo vzniknout atmosféře současné (sekundární, oxidační) [3]. Na počátku života byla atmosféra ovšem pravděpodobně tvořena převážně oxidem uhličitým, dusíkem a vodní parou popř. dalšími plyny jako jsou oxid uhelnatý, vodík či methan [4,5]. Podle provedených studií je pravděpodobné, že primární atmosféra existovala jen velmi krátkou dobu, jelikož ve vodě velmi dobře rozpustný amoniak by byl v deštích rozpouštěn, a tak by se jeho množství v atmosféře velmi rychle vytrácelo. Navíc by byl oxid uhelnatý a methan následkem fotolýzy vody oxidován hydroxylovými radikály [6,7].

2.2 Velký třesk

Teorie velkého třesku je kosmologická teorie o raném vývoji vesmíru. Velký třesk je samotným začátkem rozpínání vesmíru, což se přihodilo asi před 13,7 miliardami let. Rozpínáním označujeme zmenšování průměrné hustoty s časem. Průměrná hustota vesmíru v podstatě vyjadřuje hustotu ve velkém objemu (například v krychli o hraně sto milionů světelných let). V každém okamžiku musí být všude ve vesmíru průměrná hustota stejná. Přírodním následkem velkého třesku je fakt, že v minulosti byla teplota i hustota vesmíru mnohem vyšší než je tomu dnes.

V současné době není známo, k jakým dějům při velkém třesku vlastně došlo, jelikož bezprostředně po explozi (až do 10^{-35} s) se vesmír nacházel ve stavu, ve kterém se neuplatňovaly fyzikální zákony nám známé. Mnohem lepší představu mají vědci o tom, co se stalo mezi 10^{-35} s a 1 s, což je popsáno modelem „inflačního vesmíru“. V zásadě se jedná o teorii, která popisuje jak z velmi malého zárodku mohl vzniknout vesmír o průměru asi 100 000 miliard kilometrů a jak základní stavební částice hmoty získaly svou hmotnost a podobu. Nejznámějším úsekem je období od 1 s až po přítomnost. Zde se uplatňují fyzikální zákony nám známé. Toto období, které popisuje vývoj vesmíru, je označováno jako kosmologický model.

Nikdy po velkém třesku nedošlo k tak rychlému vývoji vesmíru jako právě při velké explozi. V počátcích rozpínajícího se vesmíru docházelo prakticky pouze k reakcím mezi elementárními částicemi (přeměně, vzniku, rozpadu či anihilaci). Na počátku představovala veškerá látka hustou směs všech částic, antičástic a vysokoenergetických fotonů gama. Velmi pravděpodobně bylo o něco méně antibaryonů než baryonů resp. každému miliardtému baryonu chyběla jeho antičástice. Pokud by každý baryon našel svého partnera, současný vesmír, tak jak ho známe, by nikdy neexistoval a docházelo by pouze k reliktnímu záření. Většina částic s antičásticemi anihilovala, nicméně vzniklé fotony se ihned měnily zpět na částici a antičástici. K anihilaci může docházet za jakékoliv teploty, kdežto přeměna fotonů zpět na částici a antičástici je podmíněna vysokými teplotami, a proto s klesající teplotou docházelo k přerušení materializace. Následkem přerušení materializace fotonů lze vesmír vývojově rozdělit na hadronové a leptonové období a na éru záření (fotonové období) a látky (hvězdné období).

V hadronovém období se veškeré druhy částic a antičástic vyskytovaly ve stejném množství a látka dosahovala termodynamické rovnováhy. Jelikož existuje mnohem více druhů hadronů (kladně nabitě protony, neutrony, středně těžké piony a částice o enormně velkých hmotnostech – haperony) než leptonů, byly hlavní složkou rozpínajícího se vesmíru právě hadrony. Tyto částice se vyznačují silnými interakcemi, které se v období od 10^{-44} do 10^{-4} s nejvíce uplatnily. Kdyby počet částic a antičástic byl v hadronovém období stejný, docházelo by pouze k reliktnímu záření a hmota by existovala pouze v podobě zářivé energie. Anihilace převážné

většiny protonů s antiprotony a neutronů s antineutrony a rozpad nestabilních pionů na leptony způsobily konec hadronové éry.

S rozpadem posledních hadronů (10^{-4} s) začala éra leptonů (lehčí elementární částice – elektrony a jejich antičástice pozitrony, miony, neutrina a antineutrina). Po několika dalších minutách došlo k anihilaci elektronů a pozitronů (při teplotě 10^{10} K) a došlo tak ke konci leptonového období. Neutrina navíc v této době přestávají interagovat s ostatními částicemi a začínají se vyskytovat jako samostatné, nezávislé částice. Jelikož se neutrony při vysokých hustotách rozpadají velmi rychle, protonů neustále přibývalo. Některé z neutronů se však nerozpadly a v interakci s protony vytvořily stálá jádra deuteria. Většina protonů se ovšem nezkombinovala a zůstala v podobě vodíkových jader. Takovýto proces vytvoření jádra je kosmology označován jako primordiální nukleosyntéza. Z počátku se nejprve srážkou protonu s neutronem vytvořilo opět deuterium, nicméně pokud došlo ke srážce dvou atomů deuteria, tak vznikl buď další izotop vodíku, tritium, nebo izotop helia ^3He či ^4He . Jestliže pak došlo ke srážce jader deuteria buď s jádrem tritia, nebo s izotopy helia, vzniklo helium. Nakonec došlo při sloučení jader tritia a helia ke vzniku izotopu lithia ^7Li . Vesmír byl však ještě velmi rozpálený, a proto nemohlo dojít k vazbě jader s odpovídajícím počtem elektronů (spárování zabraňovaly fotony vzniklé vzájemným ničením částic a antičástic v leptonové éře). Již při teplotě 150 000 K měly fotony velmi málo energie na to, aby zabránily spárování vodíkových jader s elektrony. Protože ale byla obrovská nadmíra fotonů, stále se našly ty, které měly dostatek energie na opětovné rozdělení elektronů od atomových jader. Až když vesmír dosáhl teploty 3000 K, což se stalo asi 400 tisíc let po velkém třesku, mohlo dojít k spárování elektronů s atomovými jádry.

V hvězdném období docházelo ke vzniku systémů (vznik supergalaxií, hnízd galaxií aj.) z elementárních částic. Při velké explozi hmota ve vesmíru pravděpodobně nebyla rovnoměrně rozložena. Vnikly tak shluky hmoty, které se uvnitř rozpínaly pomaleji než okolní vesmír a měly větší hustotu. Tímto způsobem zřejmě vznikly supergalaxie a hnízda galaxií, ze kterých posléze vznikly složitým procesem galaxie [8,9,10].

2.2.1 Atmosféra titanu

Titan je Zemi podobný měsíc, který obíhá kolem planety Saturn. Atmosféra titanu je velmi podobná té, která byla na planetě Zemi před 4 miliardami let, tj. složená z N_2 , O_2 , CO_2 a CO – z těchto prekurzorů vznikly první organické molekuly, které vedly ke vzniku života. Atmosféra Titanu je, kromě atmosféry Země, jako jediná ve Sluneční soustavě tvořená převážně dusíkem (a asi 10% methanu), a je silně redukční. Atmosféra se vytvořila v průběhu evoluce měsíce odplyněním ledu (tvořeného uhlovodíky), který pokrývá celý povrch Titanu. Jelikož raná atmosféra byla složená z methanu a amoniaku, jejich rozklad pravděpodobně způsobený UV zářením uvolnil dusík a vodík. Vodík poté díky velmi nízké hmotnosti unikl do meziplanetárního prostoru a na oběžné dráze lze nalézt jeho stopy [11,12].

2.3 Laserové jiskry a vznik plazmatu

V souvislosti se snahou o pochopení vývoje zemské atmosféry a vzniku života je mnoho pokusů směřováno k laboratorní simulaci podmínek velkého třesku.

Následkem fokusování laserového záření v plynném prostředí dochází v místě, kde se svazek zužuje, k dielektrickému průrazu plynu (laser-induced dielectric breakdown - LIDB). Takto je v soustavě vytvořen oblak dobře definovaného, relativně horkého a hustého plazmatu, který je v čase a prostoru ostře ohraničen. Aby došlo k dielektrickému průrazu je nutné, aby v okolí fokusu byl počáteční volný elektron. Tyto volné elektrony jsou v silném elektromagnetickém poli laserového svazku urychlovány, čímž získají energii, která je vyšší než ionizační energie plynu. Přitom vznikají další elektrony, které jsou dále takto urychlovány. Několikrát opakováním celého procesu, dochází ke kaskádové ionizaci plynu, která vytváří plazma. Tento jev je nazýván laserovými jiskrami.

2.3.1 Možnosti vyvolání chemických reakcí laserovým plazmatem

V centrální části laserové jiskry, v plazmatu, jež je indukován přímo laserem, lze z hlediska změn chemického složení soustavy uvažovat jen dekompoziční

procesy. Uvnitř tohoto plazmatu dosahují hustota energie a hustota toku energie enormně vysokých hodnot, a proto jsou molekuly snadno rozkládány na atomární ionty. Energie laserového svazku je do svého okolí vyzařována třemi různými způsoby:

- 1) krátkovlnným zářením (UV-VUV/XUV) či energetickými částicemi, které jsou emitovány plazmatem
- 2) rázovou vlnou, jež je v určitém momentu oddělena od expandujícího plazmatu
- 3) směřováním a interakcí okolního plynu s expandujícím plazmatem, pro který je charakteristická vysoká teplota a obsah reaktivních částic (ionty, volné radikály) v základních i excitovaných stavech

Rozdílná účinnost při vyvolání chemických reakcí v molekulární soustavě se podílí na chemických změnách [13].

2.4 PALS

Pro generování záření o vysoké energii je v Praze na Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR k dispozici Prague Asterix Laser System (PALS), což je obrovský laserový systém, kde základní jednotkou je laser Asterix IV. Laser generuje záření o vlnové délce 1315 nm za využití atomů jódu. Při této vlnové délce je laser schopen dosáhnout energie až 1 kJ. Výstupní svazek laseru je prostorově homogenní a stabilní (energie zůstává každý výstřel prakticky stejná) [14,15].

2.5 Analyty studované v této práci

2.5.1 Formamid

Při analýze molekulového složení komet a mezihvězdných mračen bylo zjištěno, že formamid je ve vesmíru v nadbytku. Navíc jeho složení z vodíku, kyslíku, dusíku a uhlíku, tedy prvků, které tvoří základ biomolekul, vede k předpokladu, že formamid mohl hrát důležitou úlohu při vzniku molekul, které jsou stavebními kameny živé hmoty. Jediněná schopnost formamidu kondenzovat při

teplotě 110–160°C a za katalýzy kovů vytvářet purinové a pyrimidinové báze tento předpoklad potvrzuje [16].

2.5.2 2-amino-1-butanol, 3-methoxy-1-propanol, 2-methyl-1-butanol

Obecně je známo, že aminokyseliny a sacharidy se vyskytují v živých organismech buď v L- či D- formě. Otázkou zůstává, zda tyto enantiomery vznikly již v raných či až v pozdějších fázích chemické evoluce [17]. Existuje teorie, že kombinace elektrických a magnetických polí v laserové jiskře může způsobovat preferenční rozklad (nebo v jiných soustavách naopak vznik) jednoho z enantiomerů. Hlavním důvodem generování plazmatu ve výše uvedených látkách je, že jsou to těkavé chirální látky, které mají jisté společné rysy s významnými biomolekulami (aminoskupinu, OH skupinu, počet uhlíků). Na Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR je cílem deracemizovat tyto látky laserovým plazmatem, což je opak klasické tepelné racemizace [18].

2.6 Metody analýzy

K analýze produktů simulovaného velkého třesku lze použít řadu metod od spektroskopických (spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti, infračervená spektrofotometrie) [19] po separační.

Pro účely této práce byla využita plynová a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Proto bude pozornost i v teoretické části práce zaměřena pouze na tyto vybrané metody analýzy.

2.7 Chromatografické metody

Chromatografie je fyzikálně-chemická separační metoda, při níž dochází k rozdělení látek mezi dvě fáze. Podstatou dělení analytů je repetitivní ustavování rozdělovacích rovnováh vzorku mezi mobilní a stacionární fází [20].

2.7.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC – gas chromatography) je metoda, které se výhradně využívá pro analýzu těkavých látek [20]. Podstatou metody je rozdělení analyzovaných látek mezi dvě fáze – mobilní a stacionární. V plynové chromatografii je jako mobilní fáze využíván tzv. nosný plyn. Fáze stacionární se nachází v chromatografické koloně. V závislosti na typu kolony se hovoří o náplňových a kapilárních kolonách. Stacionární fáze se může vyskytovat v podobě silikagelu či aktivního uhlí (náplňové kolony) nebo se na inertní nosič nanáší vysokovroucí kapalina a v případě kolon kapilárních se na vnitřní stranu křemenné kapiláry nanese stacionární fáze. Používání kapilárních kolon v současné GC analýze výrazně převažuje [21].

2.7.1.1 Proces separace v GC

Vzorek je nastříknut přes septum do nástřikové komory, ve které musí být teplota alespoň o 50 °C vyšší než je teplota varu analyzované látky, čímž se zabrání kondenzaci [20]. Vzorek se při vyšší teplotě odpaří a je nosným plynem přesunut do kolony, kde dochází k separaci analytů ve vzorku. Sloučeniny eluují z kolony podle vzestupných hodnot distribučních konstant a vstupují do detektoru [21].

2.7.1.2 Detektory v plynové chromatografii

V současné době existuje mnoho detektorů, které je možno použít ve spojení s plynovým chromatografem. Mezi běžně využívané patří plamenově ionizační detektor (FID – Flame Ionisation Detector), detektor elektronového záchytu (ECD – Electron Capture Detector), fotoionizační detektor (PID - Photoionization Detector) či detektor hmotnostně spektrometrický (MS – Mass Spectrometry Detector). Účelem detektorů je sledování nosného plynu s analyty vycházejícími z kolony, kdy se v důsledku eluce sloučenin generuje signál.

2.7.1.2.1 Plamenově ionizační detektor

V dnešní době se nejhojněji využívá plamenově ionizační detektor. Obsahuje malý hořák, v němž se spaluje směs vodíku se vzduchem. Jestliže je v plameni spalován pouze nosný plyn, počet iontů, které vznikají při spalování, je velmi nízký. Naopak pokud analyt, který vystoupí z chromatografické kolony shoří, množství elektricky nabitých částic se v oblasti detektoru zvýší a tím vzroste i velikost procházejícího proudu [20]. Výhodami FID jsou vysoká citlivost k prakticky všem organickým sloučeninám, malá odezva na vodu a oxid uhličitý, a proto neposkytuje signál v nepřítomnosti analytu [22].

2.7.1.2.2 Plynový chromatograf ve spojení s hmotnostním spektrometrem

Spojení plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) je instrumentální technika v současné době rozšířená do všech moderních analytických laboratoří. Tato instrumentace umožňuje účinnou separaci a následnou identifikaci a stanovení analytů. Metodu lze použít i pro analýzu sloučenin o nízké polaritě. K tomu aby sloučenina mohla být analyzována pomocí GC-MS (či jen samotným plynovým chromatografem), musí být dostatečně těkavá a tepelně stabilní. U některých sloučenin může být pro zvýšení těkavosti před analýzou vyžadována chemická modifikace (derivatizace), aby byly odstraněny nežádoucí účinky adsorpce, které by jinak ovlivňovaly kvalitu získaných dat.

Hmotnostní spektrometr je složen z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a samotného detektoru. Iontový zdroj převádí analyzované látky na kladné či záporné částice. Směs iontů vytvořených v iontovém zdroji může být hmotnostním analyzátozem rozdělena v prostoru nebo čase podle poměrů hmotnosti ku náboji (m/z).

Existují dvě potenciální metody pro tvorbu iontů. Nejčastěji používanou metodou je elektronová ionizace (EI – Electron Impact). Méně využívanou alternativou je ionizace chemická (CI – Chemical Impact). Při EI ionizaci molekuly

vzorku dochází ke ztrátě jednoho elektronu. Molekula, které elektron chybí, se nazývá molekulární ion a představuje M^+ (radikálový kation). Pokud je výsledný pík z tohoto iontu vidět v hmotnostní spektru, lze získat molekulovou hmotnost sloučeniny [23,24].

2.7.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je stejně jako plynová chromatografie metodou, kdy dochází k separaci látek ze směsi v závislosti na jejich distribuci mezi fáze stacionární a mobilní. V nejbližších přiblížení můžeme rozlišit dva módy vysokoúčinné kapalinové chromatografie:

- 1) reverzní separační mód (RP-HPLC), kdy k rozdělování složek směsi dochází na nepolárních stacionárních fázích (silikagel, který je modifikován nepolárními skupinami – nejhojněji je využívána oktadecylová fáze), a polárnější kapaliny (acetonitril, methanol či jejich směsi s pufrů) jsou využity jako mobilní fáze
- 2) normální separační mód (NP-HPLC), kdy mobilní fáze představuje nepolární kapalinu (uhlovodík) a silikagel či alumina nebo jiná polární fáze jsou využity jako stacionární fáze

V současnosti je převážně využívána reverzní kapalinová chromatografie, jelikož ji lze uplatnit na mnohem větší škálu analytů. HPLC má oproti GC řadu výhod. Pomocí HPLC je možno analyzovat jak látky nepolární, tak polární, a dokonce i látky, které nejsou termostabilní. Separaci lze navíc ovlivnit nejen volbou stacionární fáze, ale i pomocí různého složení mobilní fáze, která není na rozdíl od mobilní fáze v GC inertní. Složení mobilní fáze je možné pozměnit typem, koncentrací a pH použitého pufru či různým složením rozpouštědel.

Selektivitu je možné ovlivnit jak volbou stacionární fáze, např. délkou alkylového řetězce vázaného na silikagelovém nosiči (v případě RP-HPLC), tak modifikací mobilní fáze. Při použití delšího alkylového řetězce dochází k vyšší retenci nepolárních látek. Se zvyšujícím se množstvím vody v mobilní fázi roste i selektivita [23,25].

2.7.2.1 Detektory ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii

Detektory vyhodnocují rozdíl mezi signálem čisté mobilní fáze a mobilní fáze, která obsahuje eluovanou složku. Ideální HPLC detektor by měl splňovat určité charakteristiky jako je vysoká citlivost a nízká úroveň šumu, dobrá stabilita a reprodukovatelnost, odezva by měla být okamžitá a mít široký lineárně dynamický rozsah a měl by být necitlivý ke změnám teploty a tlaku. Aby bylo možné poskytnout, co nejcitlivější signál jednotlivých složek, je nutné aby mobilní fáze poskytovala co nejnižší signál. Mezi běžně využívané detektory patří spektrofotometrický detektor, fluorescenční detektor, elektrochemický detektor či hmotnostně spektrometrický detektor.

2.7.2.1.1 Spektrofotometrický detektor

Tento detektor je v HPLC nejpoužívanější. Aby mohlo dojít k detekci je nutné, aby detekované látky pohlcovaly záření vlnové délky, která byla využita k detekci. Rozsah vlnových délek, ve kterých většina detektorů pracuje, pokrývá oblast UV a viditelného spektra. Na základě využití dané vlnové délky mohou být spektrofotometrické detektory rozděleny na [26]:

- 1) detektory pracující s jednou pevně danou vlnovou délkou
- 2) detektory, kdy je možné vybírat z několika vlnových délek (nejběžněji ze dvou)
- 3) detektory, které umožňují vlnovou délku libovolně měnit v určitém rozmezí (většinou od 190 do 400 nm) – poskytují celé spektrum, které lze následně využít i k částečné identifikaci analytů

2.8 Vyhodnocení chromatogramu

Pomocí plynové i kapalinové chromatografie lze látky kvalitativně charakterizovat následujícími charakteristikami:

t_M – mrtvý čas odpovídá době, za kterou projde neretenující analyt kolonou

t_R - retenční čas je doba, za kterou projde analyt kolonou

k – retenční faktor odpovídá poměru času, který molekuly analytu setrvají ve stacionární fázi ku času, který setrvají ve fázi mobilní a lze jej vyjádřit vztahem [23]:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

kde t_R značí retenční čas a t_M odpovídá mrtvému času.

Rozdělení dvou sousedních píků může být dokonalé nebo se píky mohou překrývat. Rozlišení charakterizuje míru vzájemného překrývání dvou sousedních píků a je definováno vztahem:

$$R_{ij} = \frac{2(t_{R,j} - t_{R,i})}{Y_j + Y_i} \quad (2)$$

kde R_{ij} je rozlišení, t_R vyjadřuje retenční čas složek j a i , Y_j a Y_i jsou šířky píků na úrovni nulové linie. Platí, že složka j eluuje později než složka i [26].

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Tab.1 Seznam použitých chemikálií

Název látky	Výrobce	Čistota
aceton	Lachner	p.a.
acetonitril	Fluka	puriss > 99,5 %
methanol	Lachner	p.a.
n-hexan	Fluka	purum > 95,0%
pyridin	Sigma-Aldrich	99+ %
<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA)	Supelco	99,3 %
+ trimethylchlorosilan (TMCS)		
methanol pro HPLC (Chromasolv IV)	Sigma-Aldrich	99,9 %
acetonitril R pro LC (Chromasolv)	Riedel-de-Haën	99,8%

Standardy a vzorky: 2-amino-1-butanol, 3-methoxy-1-propanol čistý, neostřelovaný, 3-methoxy-1-propanol ostřelovaný systémem PALS, 2-methyl-1-butanol, formamid čistý, neostřelovaný a formamid ostřelovaný systémem PALS byly dodány z Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR Ing. Liborem Juhou, CSc. Původ a čistota nám proto není známa.

3.2 Použité přístroje

Měření bylo prováděno na plynovém chromatografu GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko), který byl vybaven autosamplerem AOC – 20i (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) se stříkačkou o objemu 10 µl (Hamilton, Reno, USA) a MS detektorem QP2010Plus (Shimadzu, Kyoto, Japonsko).

Sběr dat a vyhodnocení výsledků bylo provedeno programem LabSolutions - GCMS verze 2.53 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko).

Středně polární kolona Rtx-200MS (trifluoropropyl polysiloxan, Restek, USA) o délce 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μm byla použita k separaci. Helium bylo využito jako nosný plyn (99,999%, Linde Technoplyn).

K pipetování vzorků byly využity pipety o objemu 0,5 – 10 μl , 10 – 100 μl , 100 – 1000 μl a 1 – 5 ml (všechny od Biohit, Helsinky, Finsko).

V laboratoři byly dále používány následující pomůcky: ultrazvuková lázeň Sonorex RK 100 (Bandelin, Německo), analytické váhy APX – 100 (Denver Instrument) a váhy 2004 MP (Sartorius).

Měření bylo dále prováděno na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu složeném z pumpy Delta Chrom SDS 030 (Watrex, Praha, Česká republika), dávkovacího ventilu s 20 μl smyčkou, dvoukanalového detektoru UV/VIS Spectra 100. K separaci byly použity dvě kolony: XTerra MS C18 s reverzní oktadecylovou fází o velikosti částic 3,5 μm , průměru 4,6 mm, délce 10 cm, a kolona Supelcosil LC-18-DB s reverzní oktadecylovou fází o velikosti částic 5 μm , průměru 4,6 mm, délce 25 cm.

Sběr dat a vyhodnocení výsledků bylo provedeno programem Clarity verze 2.1.0.15 (DataApex, Praha, Česká republika).

K pipetování vzorků byly využity pipety o objemu 0,5 – 10 μl , 10 – 100 μl , 100 – 1000 μl a 1 – 5 ml (všechny od Biohit, Helsinky, Finsko).

K odvzdušnění mobilních fází byla dále využita ultrazvuková lázeň LC 30 (P-Lab, Německo).

3.3 Příprava roztoků

Zásobní roztok 2-amino-1-butanolu byl připraven tak, že do 4 ml vialky bylo napipetováno 10 μl 2-amino-1-butanolu a přidány 2 ml acetonitrilu. Dále bylo do 4 ml vialky obdobným způsobem napipetováno 10 μl 2-amino-1-butanolu a přidány

2 ml pyridinu. Tímto způsobem byly získány dva zásobní roztoky 2-amino-1-butanolu oba o koncentraci 5 µg/ml.

Pro měření kalibrace byl připraven směsný roztok 3-methoxy-1-propanolu a 2-methyl-1-butanolu tak, že na analytických vahách bylo do 10 ml odměrné baňky naváženo 4,4 mg 3-methoxy-1-propanolu a 6,2 mg 2-methyl-1-butanolu a následně doplněno methanolem na celkový objem 10 ml. Tímto způsobem byl získán zásobní roztok směsi o koncentracích 440 µg/ml 3-methoxy-1-propanolu a 620 µg/ml 2-methyl-1-butanolu. Dále byly z tohoto zásobního roztoku připraveny postupným ředěním roztoky o koncentracích 100 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml a 0,1 µg/ml.

3.4 Ozařování studovaných látek systémem PALS

Ve formamidu a 3-methoxy-1-propanolu bylo pracovníky fyzikálního ústavu Jaroslava Heyrovského AV ČR generováno plazma obřím laserovým systémem PALS a následně byly analyty předány na Katedru fyzikální a makromolekulární chemie Univerzity Karlovy v Praze za účelem analýzy.

3.5 Podmínky měření

3.5.1 GC-MS

Na plynovém chromatografu GCMS-QP2010 Plus s hmotnostním detektorem bylo prováděno měření standardů 2-amino-1-butanolu, 3-methoxy-1-propanolu a 2-methyl-1-butanolu za podmínek: teplota kolony 40 °C, teplota dávkovače 250 °C, lineární průtoková rychlost nosného plynu 35 cm/s. Dělicí poměr (split) byl nastaven na hodnotu 1:50. Dávkovaný objem byl 1 µl. Teplota iontového zdroje byla nastavena na 200 °C. Počáteční teplota kolony byla 40°C (po dobu 5 minut) a následně byla zvyšována rychlostí 5°C/min až na teplotu 160 °C, která byla udržována 1 min. Měření bylo prováděno ve SCAN módu pro hodnoty m/z v rozmezí od 40 do 450. Při měření byla uplatněna elektronová ionizace s energií elektronů 70 eV.

Za výše uvedených podmínek byla na plynovém chromatografu GCMS-QP2010 Plus s hmotnostním detektorem provedena kalibrace. Detekce byla prováděna v SIM (Single Ion Monitoring) módu. Sledované hodnoty m/z u hledaných iontů byly následující: 41, 56, 70 pro 2-methyl-1-butanol a 43, 45, 47 pro 1-methoxy-2-propanol.

Na plynovém chromatografu GCMS-QP2010 Plus s hmotnostním detektorem bylo dále provedeno měření ostřelovaného a neostřelovaného 3-methoxy-1-propanolu za těchto podmínek: teplota kolony 35 °C, teplota injektoru 250 °C, lineární průtoková rychlost nosného plynu 35 cm/s. Split byl nastaven na hodnotu 1:10. Dávkovaný objem byl 2 µl. Teplota iontového zdroje byla nastavena na 200 °C. Počáteční teplota kolony byla 35°C (po dobu 5 minut) a následně byla zvyšována rychlostí 15°C/min až na teplotu 150 °C, která byla udržována 2 min. Měření bylo prováděno ve SCAN módu pro hodnoty m/z v rozmezí od 35 do 450. Při měření byla uplatněna elektronová ionizace s energií elektronů 70 eV.

3.5.2 HPLC

Na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu bylo prováděno měření čistých látek 2-amino-1-butanolu, 3-methoxy-1-propanolu a formamidu za podmínek: laboratorní teplota, tlak se pohyboval v rozmezí 50 – 185 bar (v závislosti na použité koloně a mobilní fázi). Pro separaci čistých látek byly mobilní fáze methanol/voda použity v následujících poměrech (v/v): 80/20, 60/40, 40/60, 30/70 a 20/80. Průtoková rychlost byla nastavena na 0,5 ml/min (pro kolonu XTerra) a 1 ml/min (pro kolonu Supelcosil). Na spektrofotometru byla nastavena vlnová délka na 220 nm.

Na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu bylo dále provedeno měření ostřelovaného a neostřelovaného formamidu za podmínek: laboratorní teplota, tlak se pohyboval v rozmezí 140 – 175 bar (podle použité kolony a mobilní fáze). Pro separaci standardu i vzorku formamidu byly mobilní fáze methanol/voda resp. acetonitril/voda použity v následujících poměrech (v/v): 40/60, 30/70, 20/80 resp.

30/70, 70/30 a 90/10. Průtoková rychlost byla nastavena na 0,5 ml/min. Pro detekci byla vlnová délka na spektrofotometru nastavena na 210 a 220 nm.

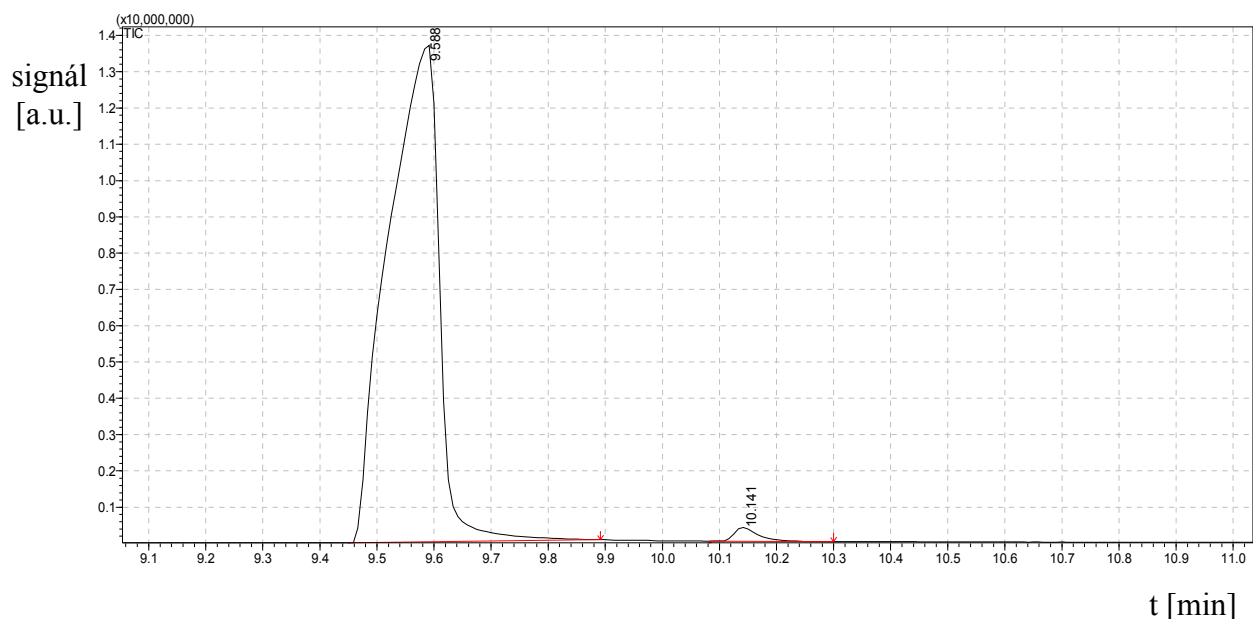
Všechny mobilní fáze byly připraveny smísením příslušných objemů používaných rozpouštědel a jejich složení je tudíž uváděno v objemových procentech (% v/v) .

4 Výsledky a diskuze

4.1 Analýza vzorků na plynovém chromatografu

4.1.1 Analýza 2-amino-1-butanolu

Nadávkováný roztok 2-amino-1-butanolu (1 μl) poskytoval odezvu v 9,46 minutách; bylo dosaženo velmi přetíženého píku (jak na detektoru MS, tak na plamenově ionizačním detektoru) (Obr. 1). Po následné silylaci, kdy bylo použito 200 μl silylačního činidla BSTFA + TMCS, 100 μl zásobního roztoku 2-amino-1-butanolu a 100 μl pyridinu jako katalyzátoru, a zředění na 100 $\mu\text{g/ml}$, nebyl v hmotnostním spektrometru detekován žádný pík 2-amino-1-butanolu ani jeho případného silylderivátu. Malá množství 2-amino-1-butanolu v jeho zředěných roztocích nelze pravděpodobně ani po derivatizaci vzhledem k jeho vysoké polaritě a malé reaktivitě se silylačním činidlem plynovou chromatografií analyzovat, což je pro aminy v GC typické.



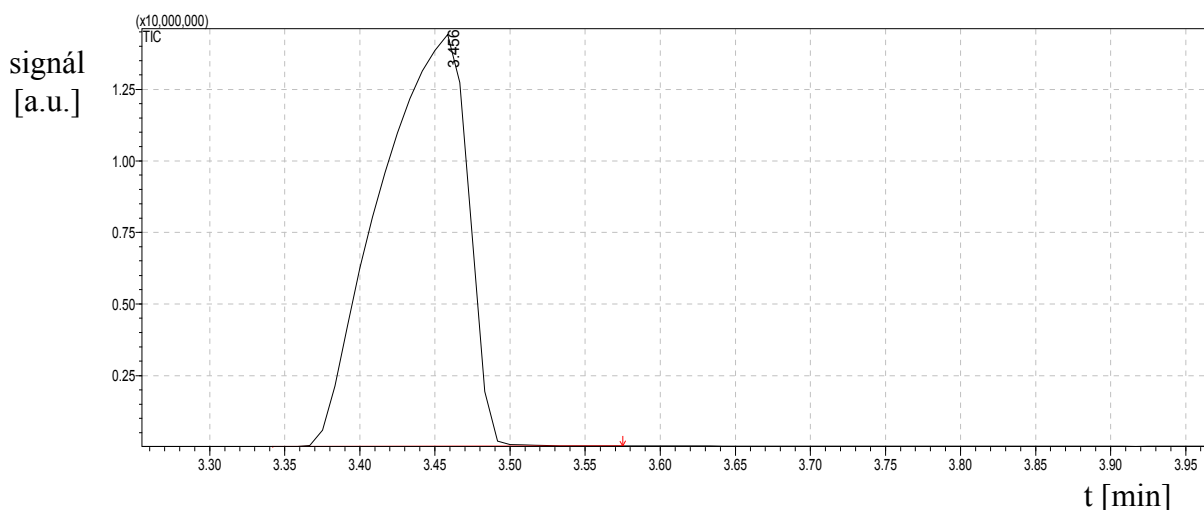
Obr. 1: Chromatogram 2-amino-1-butanolu (detekce hmotnostním spektrometrem).

Podmínky: teplota kolony 40 °C, teplota injektoru 250 °C, lineární průtoková rychlost nosného plynu 35 cm/s, split 1:50, nástřik 1 μl , teplota iontového zdroje 200 °C, počáteční teplota byla 40°C (5 min), 5°C/min do 160 °C (1 min), SCAN mód pro hodnoty m/z v rozmezí od 40 do 450, elektronová ionizace.

Protože při nástřiku nižších objemů nebyl zaznamenán žádný pík 2-amino-1-butanolu, bylo nutné zůstat u původního nástřiku 1 μl , čímž byl získán přetížený pík – viz obrázek 2.

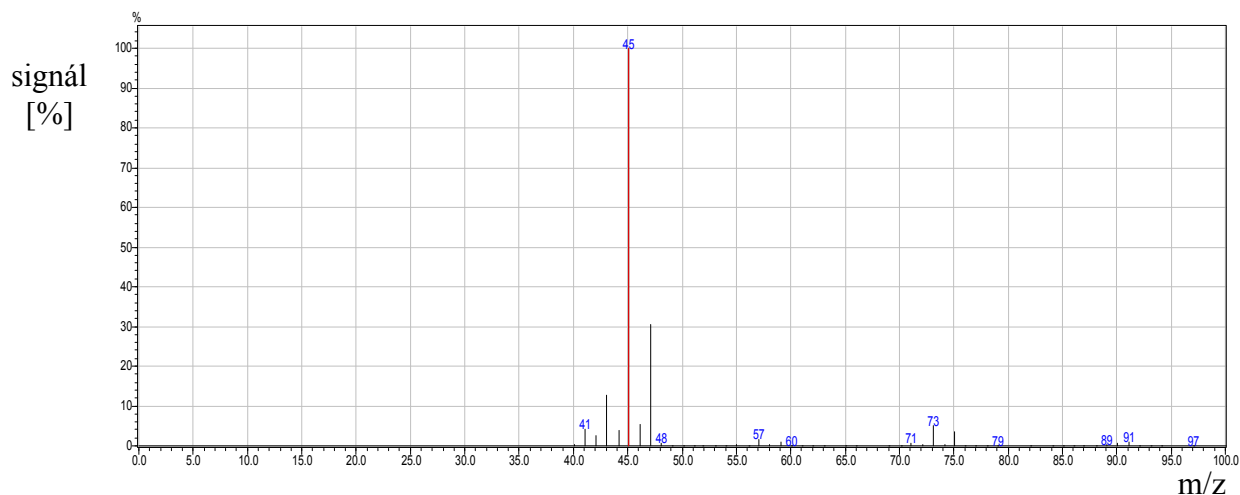
4.1.2 Analýza 3-methoxy-1-propanolu

Ke zjištění retenčního času roztoku 3-methoxy-1-propanolu byl dávkován 1 μl této látky na GC a ten poskytl výsledek, který jeví známky překročení kapacity kolony (asymetrický pík) (obr. 2). Hmotové spektrum v maximu píku je na obr. 3. Pík s maximem v retenčním čase 3,46 min byl jednoznačně identifikován jako 3-methoxy-1-propanol. Hmotové spektrum bylo porovnáno s databází a shoda našeho a databázového spektra byla 97 %.



Obr. 2: Chromatogram 3-methoxy-1-propanolu na MS detektoru. Experimentální podmínky stejné jako u obrázku 1.

Ačkoliv byl získán pík, který jeví známky překročení kapacity kolony, eluoval v čase, kdy mohl být jednoznačně identifikován jako 3-methoxy-1-propanol (žádné nečistoty neluovaly ve stejném čase), a proto jej bylo možné využít pro následnou kalibraci a pro zjištění meze detekce a stanovitelnosti.

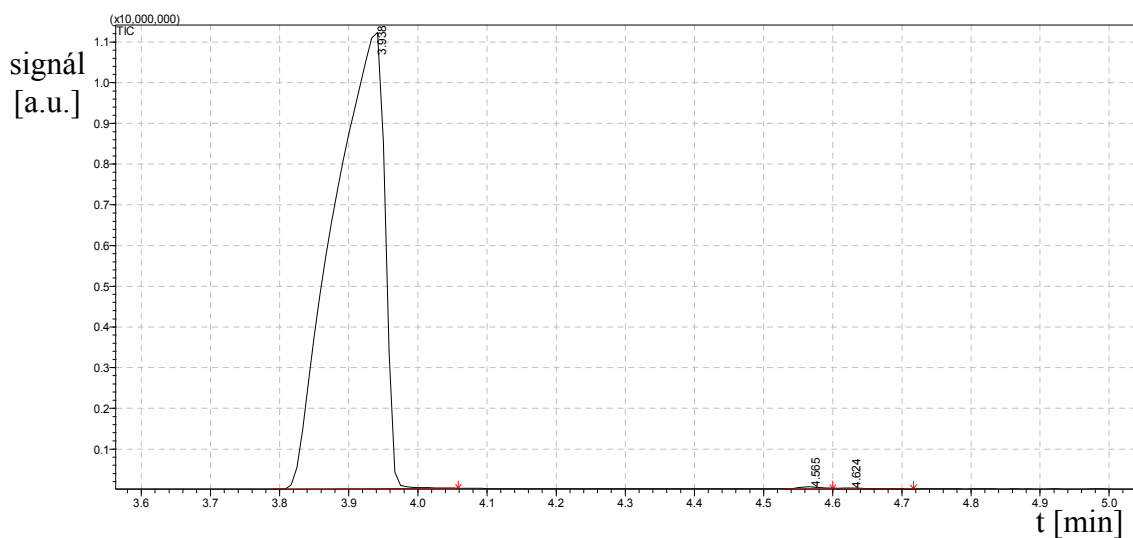


Obr. 3: Hmotové spektrum čistého 3-methoxy-1- propanolu na MS detektoru.

Experimentální podmínky stejné jako u obrázku 1.

4.1.3 Analýza 2-methyl-1-butanolu

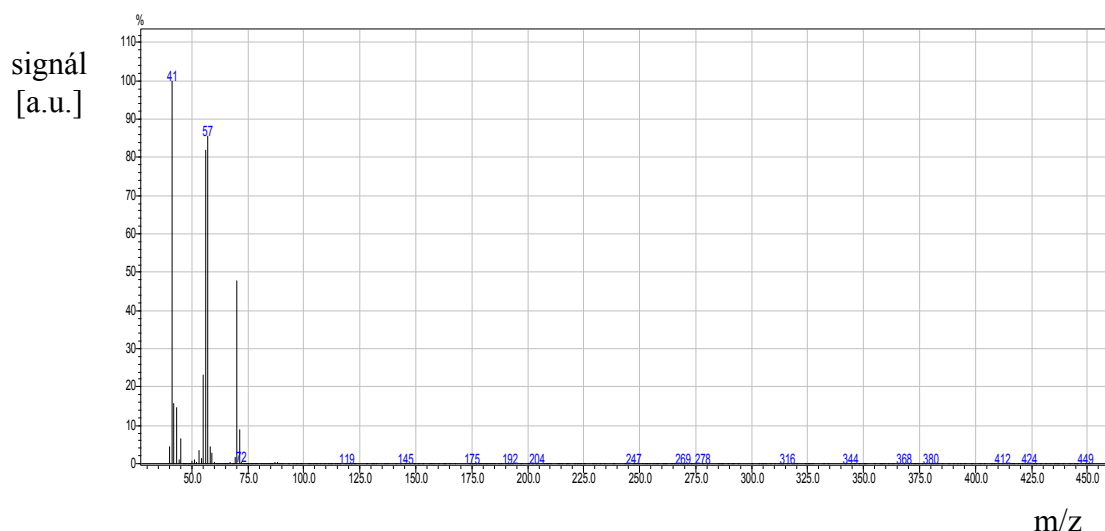
Ke zjištění retenčního času čistého 2-methyl-1-butanolu byl dávkován 1 μ l připraveného roztoku 2-methyl-1-butanolu na GC a ten poskytl výsledek, který jeví známky překročení kapacity kolony (asymetrický pík) (obr. 4). Hmotové spektrum v maximu píku je na obr. 5. Pík s maximem v retenčním čase 3,94 min byl jednoznačně identifikován jako 2-methyl-1-butanol.



Obr. 4: Chromatogram 2-methyl-1-butanolu na MS detektoru. Experimentální podmínky stejné jako u obrázku 1.

Ačkoliv byl získán pík, který jeví známky překročení kapacity kolony, eluoval v čase, kdy mohl být jednoznačně identifikován jako 2-methyl-1-butanol

(žádné nečistoty neluovaly ve stejném čase), a proto jej bylo možné využít pro následnou kalibraci a pro zjištění meze detekce a stanovitelnosti.



Obr. 5: Hmotové spektrum čistého 2-methyl-1-butanolu na MS detektoru. Experimentální podmínky stejné jako u obrázku 1.

Hmotové spektrum bylo porovnáno s databází a shoda našeho a databázového spektra byla 96 %.

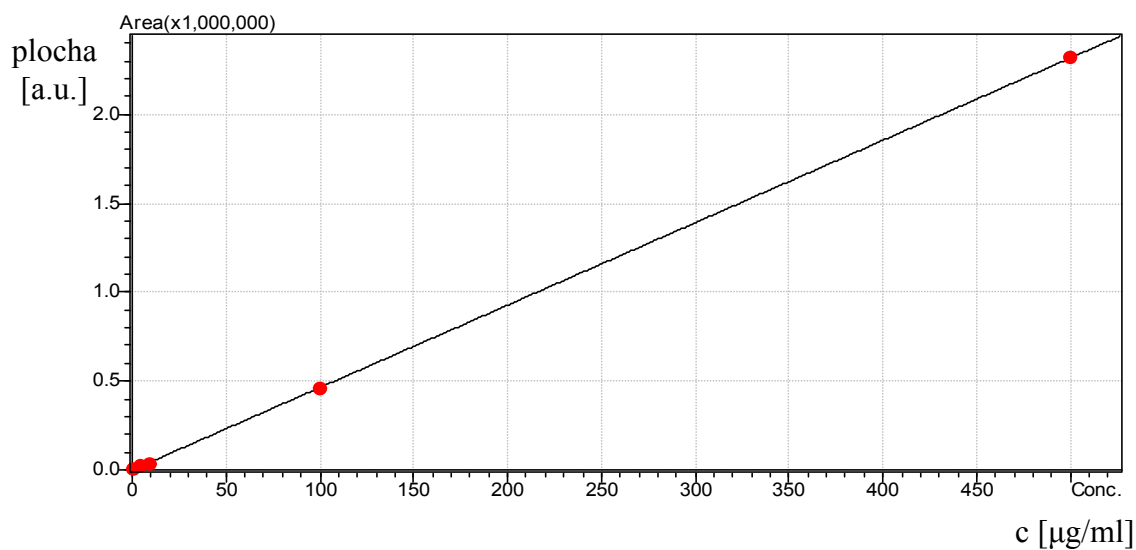
4.1.4 Kalibrační závislost 3-methoxy-1-propanolu a 2-methyl-1-butanolu

Pro účely kvantitativní analýzy byl GC-MS kalibrován na dvě látky. Kalibrace byla provedena dávkováním 1 μl připravených roztoků o koncentracích 0,1 $\mu\text{g/ml}$; 1 $\mu\text{g/ml}$; 5 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$; 500 $\mu\text{g/ml}$, přičemž měření jednotlivých roztoků o dané koncentraci proběhlo vždy 3x. Z analýzy těchto roztoků byly získány kalibrační závislosti 3-methoxy-1-propanolu (obr. 6) a 2-methyl-1-butanolu (obr. 7). Stejně tak byl získán celkový chromatogram směsi pro koncentrace 500 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$ (obr. 8) a 10 $\mu\text{g/ml}$; 5 $\mu\text{g/ml}$; 1 $\mu\text{g/ml}$; 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (obr. 9).

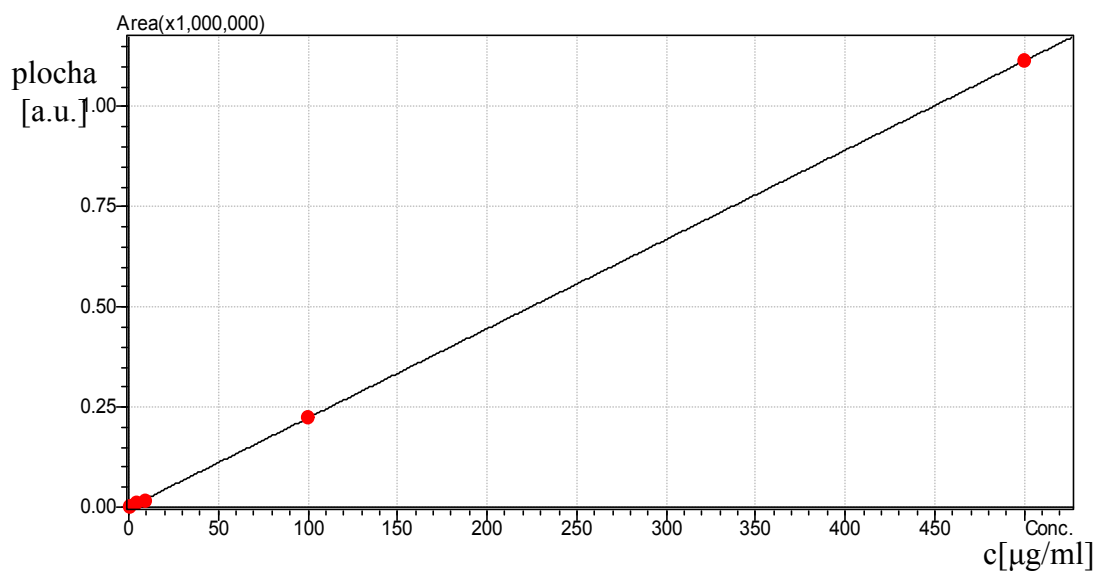
Data z kalibračních závislostí byla statisticky vyhodnocena (tab.2). Kalibrační rovnice byla použita ve tvaru

$$y = c \cdot x \tag{3}$$

kde y je plocha [a.u.], c směrnice a x koncentrace [$\mu\text{g/ml}$].



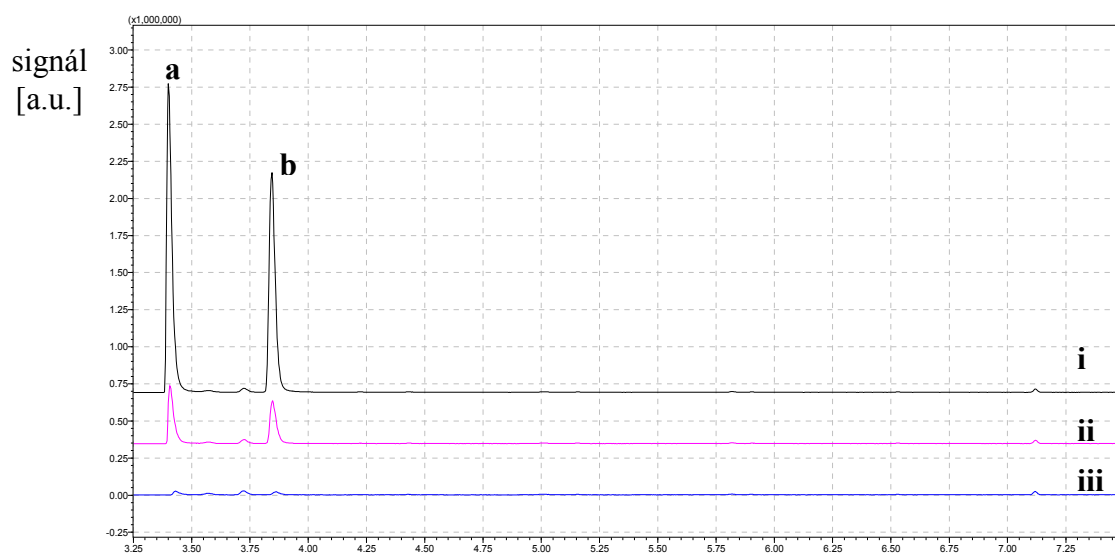
Obr. 6: Kalibrační závislost 3-methoxy-1-propanolu. Experimentální podmínky stejné jako u obrázku 1 s rozdílem v detekci: SIM mód (sledované hodnoty m/z u hledaných iontů byly 43, 45, 47).



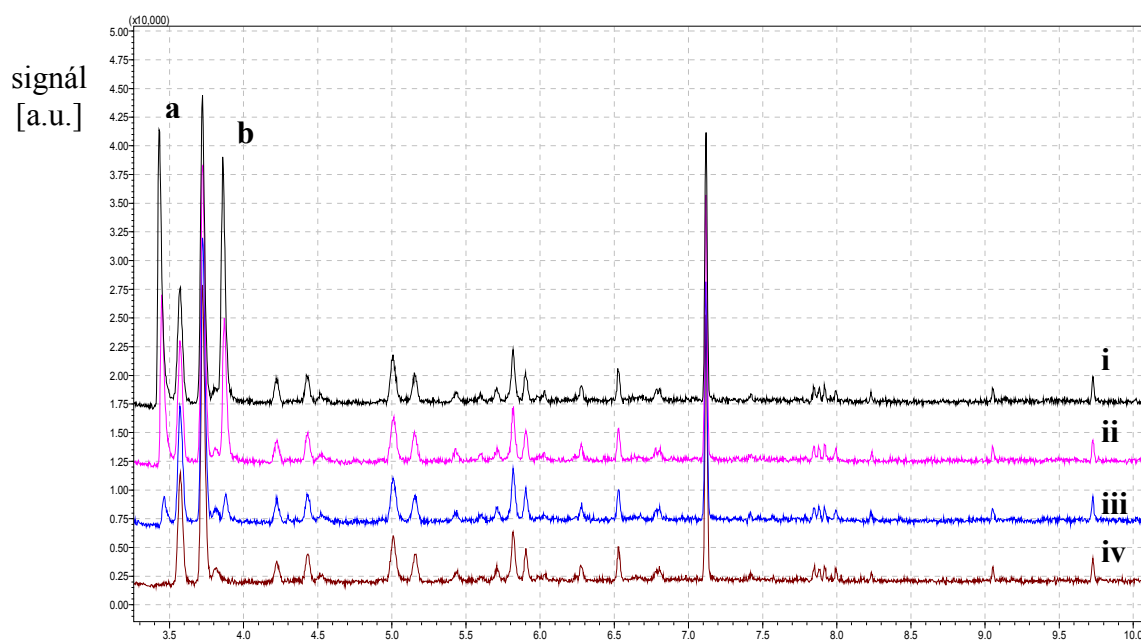
Obr. 7: Kalibrační závislost 2-methyl-1-butanolu. Experimentální podmínky stejné jako u obrázku 1 s rozdílem v detekci: SIM mód (sledované hodnoty m/z u hledaných iontů byly 41, 56, 70).

Kalibrace obou analytů vyšla lineární s korelačním koeficientem 1,0000, což vypovídá o velmi přesné linearitě dat. Kalibrace byla provedena za účelem dalšího použití, nicméně v průběhu této práce došlo k zaměření spíše na analýzu látek po

ostřelování systémem PALS, a proto s výsledky není již více pracováno. Získané výsledky kalibrace budou použity v další práci.



Obr. 8: Chromatogram směsi 3-methoxy-1-propanolu (a) a 2-methyl-1-butanolu (b) o t [min] koncentracích 500 $\mu\text{g/ml}$ (i), 100 $\mu\text{g/ml}$ (ii) a 10 $\mu\text{g/ml}$ (iii). Experimentální podmínky stejné jako u obrázku 6.



Obr. 9: Chromatogram směsi 3-methoxy-1-propanolu (a) a 2-methyl-1-butanolu (b) o t [min] koncentracích 10 $\mu\text{g/ml}$ (i), 5 $\mu\text{g/ml}$ (ii), 1 $\mu\text{g/ml}$ (iii) a 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (iv). Experimentální podmínky stejné jako u obrázku 6.

V čase 3,3 min resp. 3,7 min byly získány píky 1-methoxy-2-propanolu resp. 2-methyl-1-butanolu. Všechny ostatní píky jsou neidentifikované nečistoty z rozpouštědla.

Tab. 2: Parametry kalibračních závislostí sledovaných látek

Název analytu	Směrnice	Korelační koeicient R	Odezvový faktor (RF)	Relativní směrodatná odchylka RF
3-methoxy-1-propanol	4635	1,0000	3666	24,0%
2-methyl-1-butanol	2230	1,0000	1905	16,4%

4.1.7 Stanovení mezí detekce a stanovitelnosti

Meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) byly stanoveny dvěma způsoby.

První metodou určení LOD a LOQ je využití přímého určení poměru signál/šum (S/N) z chromatogramů nejnižší koncentrace, která je ještě opakovatelná (v tomto případě 1 µg/ml). Použitý software umožňuje určení tohoto poměru. Z experimentálně stanoveného poměru signál/šum pro chromatogramy o koncentraci 1 µg/ml byly s pomocí přímé úměry vypočteny hodnoty koncentrací odpovídající hodnotám poměru signál/šum rovným 3 pro LOD a 10 pro LOQ. Tyto hodnoty byly vypočteny pro všechna 3 opakování a zprůměrovány.

Druhá metoda využívá celou kalibrační závislost a vychází z hodnoty odezvového faktoru. Směrodatná odchylka odezvového faktoru určuje celkový rozptyl experimentálních bodů kalibrační přímky a určuje tím přesnost kalibrační závislosti, a proto lze jeho hodnotu využít pro výpočet LOD následujícím vzorcem:

$$LOD = \frac{3 \times SDRF}{RF} \quad (4)$$

kde *SDRF* představuje směrodatnou odchylku odezvového faktoru a *RF* je odezvový faktor. Hodnoty *SDRF* a *RF* byly získány přímo pomocí softwaru LabSolutions.

Obdobným způsobem byla spočtena hodnota LOQ:

$$LOQ = \frac{10 \times SDRF}{RF} \quad (5)$$

kde *SDRF* představuje směrodatnou odchylku odezvového faktoru a *RF* odezvový faktor.

Hodnoty LOD a LOQ získané oběma postupy jsou shrnuty v tabulce 3.

Tab. 3: Meze detekce a meze stanovitelnosti sledovaných látek

	Celková kalibrace (z RF)		Jednotlivé chromatogramy	
	LOD [ppm]	LOQ [ppm]	LOD [ppm]	LOQ [ppm]
3-methoxy-1-propanol	0,72	2,40	0,99	3,31
2-methyl-1-butanol	0,49	1,64	0,96	3,22

Meze detekce a stanovitelnosti jsou obecně reálnější vypočtené z poměru signál/šum, protože při výpočtu mezí detekce a stanovitelnosti z celkové kalibrace jsou ve výpočtu zahrnuty i odchylky. V našem případě jsme však získaly srovnatelné výsledky bez řádového odlišení.

4.1.8 Analýza ostřelovaného 3-methoxy-1-propanolu

Ostřelovaný 3-methoxy-1-propanol byl analyzován a následně porovnán s 3-methoxy-1-propanolem (standard) za účelem zjištění, zda v ostřelovaném analytu vznikly nové látky tj. zda se ve vzorku nacházejí kromě 3-methoxy-propanolu i jiné sloučeniny. Porovnání naměřených dat je ukázáno v tabulce 4 a 5. Jednotlivé chromatogramy neostřelovaného (3 měření)(obr. 10) a ostřelovaného

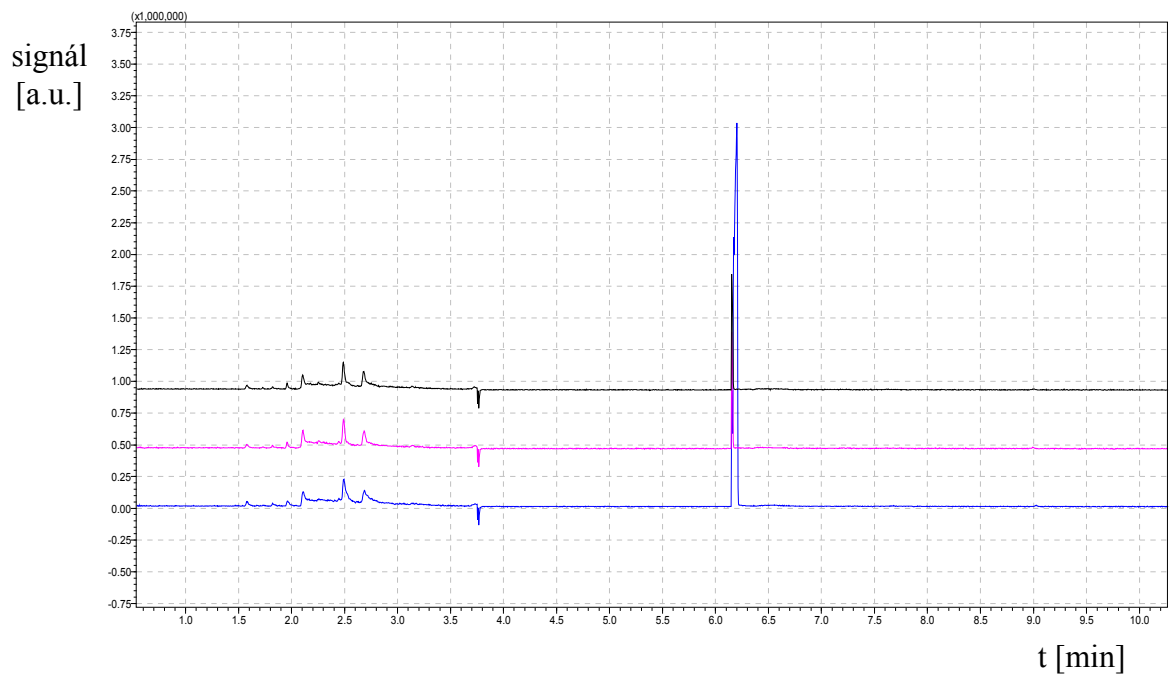
3-methoxy-1-propanolu (3 měření)(obr. 11) byly porovnány a chromatogram pro srovnání je uveden na obr. 12. Hledání nečistot bylo velmi obtížné, protože 3-methoxy-1-propanol je v přebytku. Látky byly identifikovány jak ve standardu, tak v ostřelovaném standardu. Hmotnostní spektra jednotlivých látek lze nalézt v příloze 1 a 2.

Tab. 4: Analýza neostřelovaného 3-methoxy-1-propanolu

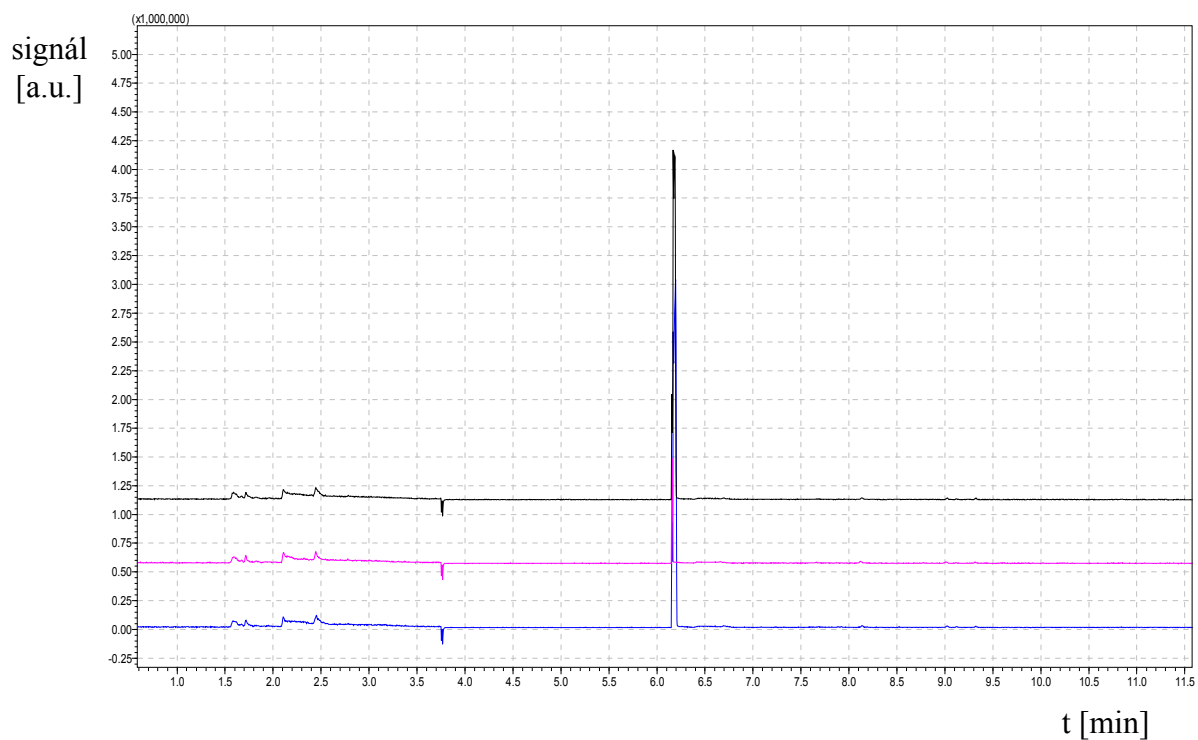
t_R [min]	Látka	Pravděpodobnost shody hmotnostních spekter [%]	Výskyt v ostřelovaném vzorku
1,58	1-alanin ethylamid	85	Ano
1,82	1,2 - diethylether	86	Ne
1,96	hexan	84	Ne
2,11	2-propen-1-ol	89	Ano
2,49	heptan	93	Ne
2,68	acetonitril	93	Ne
6,17	2-methoxy-1-propanol	98	Ano

Tab. 5: Analýza ostřelovaného 3-methoxy-1-propanolu

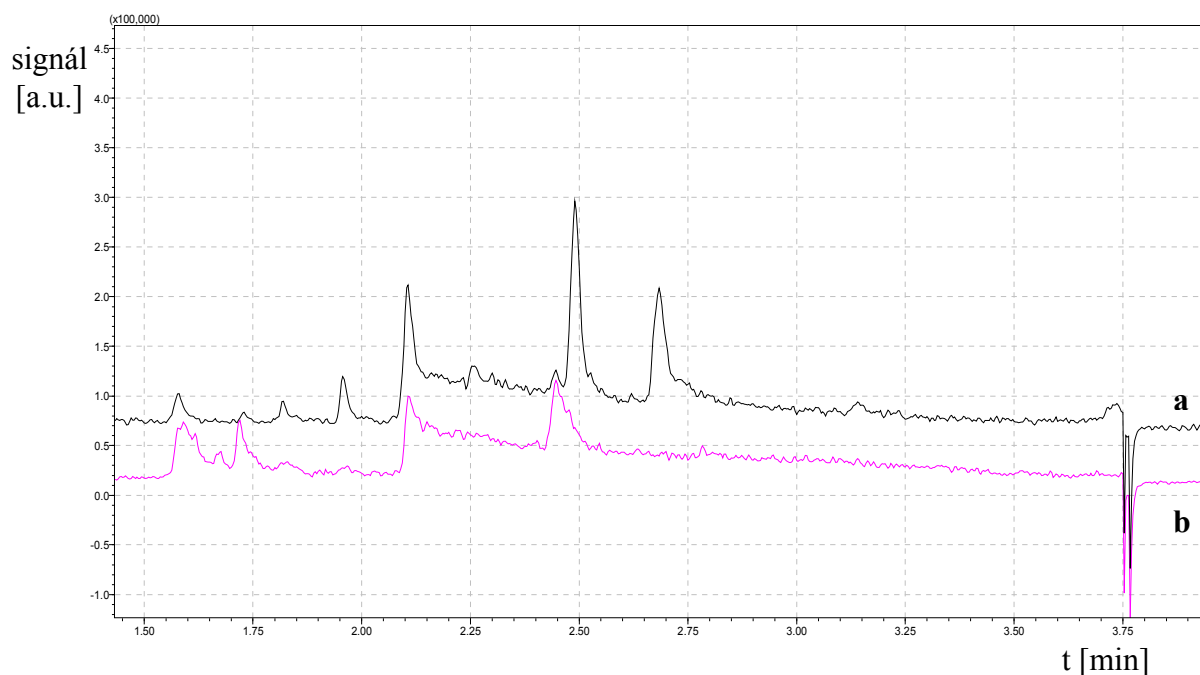
t_R [min]	Látka	Pravděpodobnost shody hmotnostních spekter [%]	Výskyt v neostřelovaném vzorku
1,58	1-alanin ethylamid	87	Ano
1,59	propan	86	Ne
1,62	3-butyn-1-ol	83	Ne
1,68	1-buten-3-yn	85	Ne
1,72	1,3-butadiyn	93	Ne
2,11	2-propen-1-ol	96	Ano
2,45	aceton	94	Ne
6,18	2-methoxy-1-propanol	98	Ano



Obr. 10: Chromatogram neostřelovaného 3-methoxy-1-propanolu. Podmínky: teplota kolony 35 °C, teplota injektoru 250 °C, lineární průtoková rychlost nosného plynu 35 cm/s, split 1:10, nástřik 2 μ l, teplota iontového zdroje 200 °C, počáteční teplota byla 35°C (5 min), 15°C/min do 150 °C (2 min), SCAN mód pro hodnoty m/z v rozmezí od 35 do 450, elektronová ionizace.



Obr. 11: Chromatogram ostřelovaného 3-methoxy-1-propanolu. Experimentální podmínky stejné jako u obrázku 10.



Obr. 12: Chromatogram neostřelovaného (a) a ostřelovaného (b) 3-methoxy-1-propanolu. Experimentální podmínky stejné jako u obrázku 10.

Ačkoliv jsou získané výsledky pro neostřelovaný i ostřelovaný 3-methoxy-1-propanol opakovatelné, lze jen velmi těžko vyhodnotit, které látky figurují v ostřelovaném analytu jako nečistoty a které naopak přibyly či ubyly, protože podobnost výskytu látek v obou analytech je velmi nízká (shodují se pouze 3 látky).

4.2 Separace a analýza vzorků vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

4.2.1 Optimalizace separace standardů

V HPLC jsem se v prvním kroku zaměřili na optimalizaci separace 2-amino-1-butanolu, 3-methoxy-1-propanolu a formamidu. Byly vyzkoušeny dvě různé kolony a mobilní fáze tvořené vodou s methanolem či acetonitrilem v objemových poměrech uvedených v experimentální části.

Obě testované kolony byly typu C18, tj. s oktadecylovým řetězcem navázaným na nosiči. Kolony se však lišily jak nosičem, tak způsobem vazby uhlíkatého řetězce. Kolona XTerra MS C18 má hydrofobní řetězce vázané přes tři

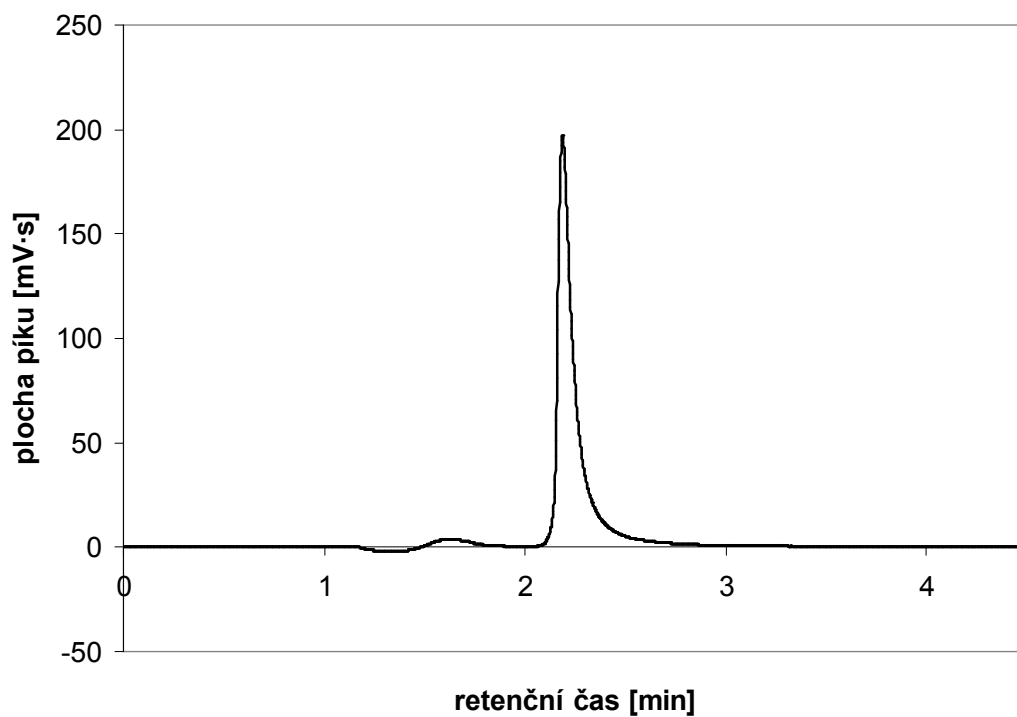
funkční skupiny na organicko-anorganické částice nosiče. Kolona Supelcosil LC-18-DB využívá jako nosič silikagel, ale je upravována proti nežádoucím interakcím s bazickými látkami. Pro separaci tří standardů se nejlépe osvědčil separační systém tvořený stacionární fází Supelcosil LC-18-DB a mobilní fází MeOH/voda 40/60 (v/v). Při průtokové rychlosti 1 ml/min eluovaly analyty s následujícími retenčními časy: formamid v 2,8 min; 2-amino-1-butanol v 3,6 min a 3-methoxy-1-propanol v 5,2 min. Retenční pořadí odpovídá rostoucí hydrofobicitě látek. Problematický byl formamid, který ve všech testovaných separačních systémech eluoval s mrtvým časem.

4.2.2 Analýza ozařovaného a neozařovaného formamidu

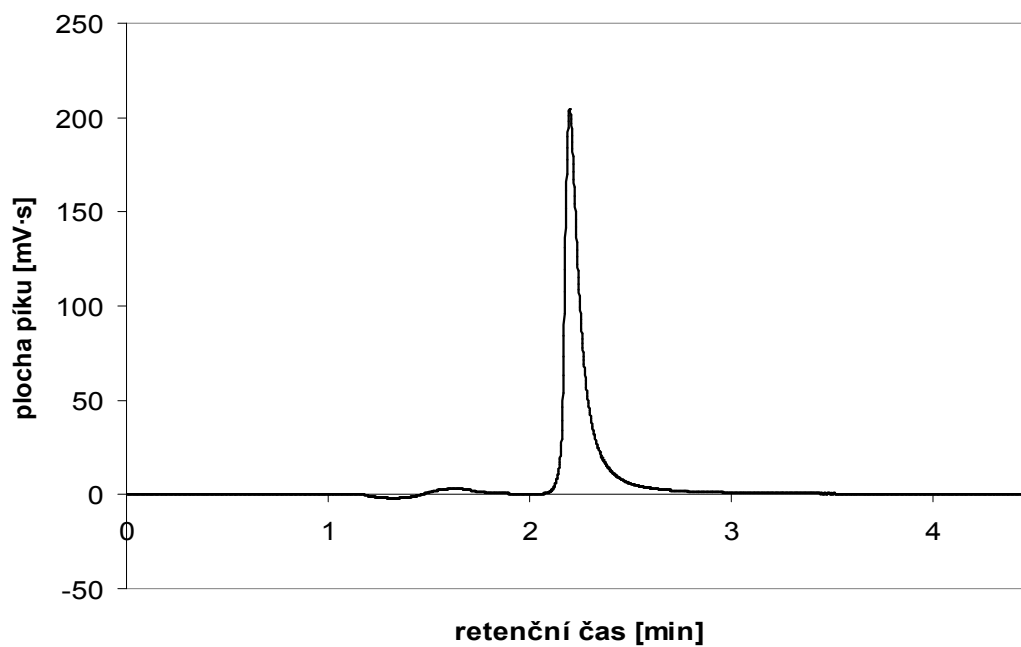
Přestože se nepodařilo najít podmínky vhodné pro analýzu formamidu, bylo alespoň zkoušeno, zda se liší eluční profil standardu od vzorku ozařovaného formamidu. (Ozařování bylo prováděno stejným způsobem jako v případě sloučenin analyzovaných plynovou chromatografií.) Zajímalo nás, zda po ozařování (ne)vznikají reakční produkty pozorovatelné v chromatogramu.

Vzorky neozařovaného i ozařovaného formamidu byly zředěny acetonitrem v poměru 1:1000 a následně analyzovány v separačním systému tvořeném kolonou Supelcosil LC-C18-DB a mobilní fází ACN/H₂O 90/10 (v/v) při průtokové rychlosti 0,5 ml/min a vlnových délkách 210 nm a 220 nm. Každé měření bylo dvakrát opakováno a získané výsledky se shodovaly. Chromatogramy neozařovaného a ozařovaného formamidu při 220 nm resp. 210 nm jsou uvedeny na obrázcích 13 a 14 resp. 15 a 16. Je zřejmé, že chromatogramy jsou za daných experimentálních podmínek identické; žádné reakční produkty nebyly pozorovány. Tento výsledek však nelze příliš generalizovat, neboť citlivost UV detekce formamidu a pravděpodobně ani případných reakčních produktů bez výrazných chromofórů je nízká.

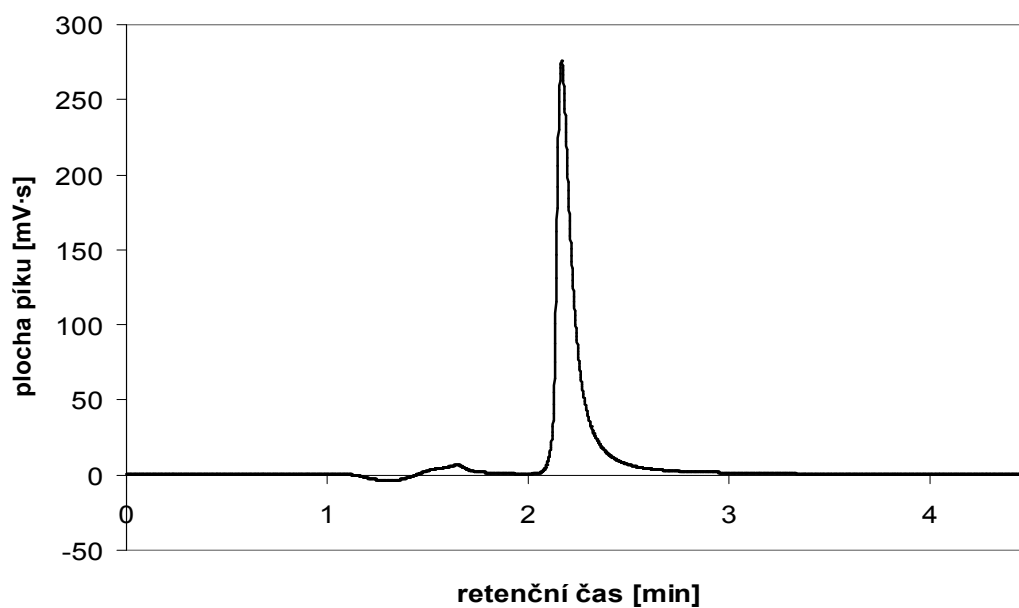
Zjištěné plochy píků ozařovaného i neozařovaného formamidu při dvou vlnových délkách jsou shrnuty v tabulce 6.



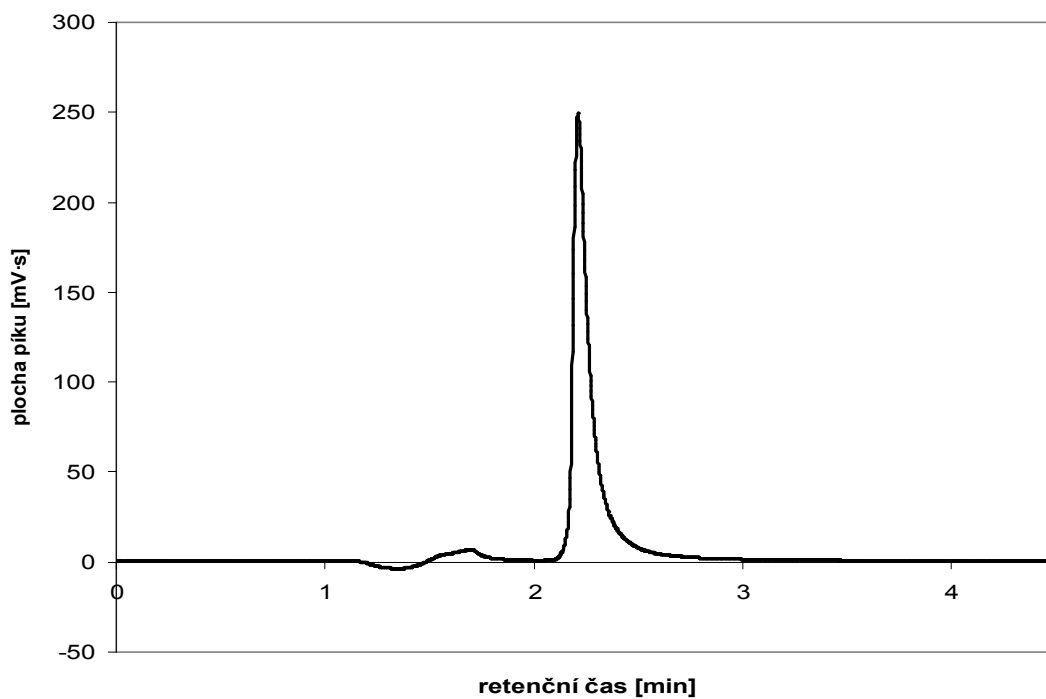
Obr. 13: Chromatogram neostřelovaného formamidu. Podmínky: kolona Supelcosil LC-C18-DB, mobilní fáze (ACN:H₂O, 90:10), průtoková rychlost 0,5 ml/min, vlnová délka 220 nm.



Obr. 14: Chromatogram ostřelovaného formamidu. Experimentální podmínky stejné jako u obrázku 13.



Obr. 15: Chromatogram neostřelovaného formamidu. Podmínky: kolona Supelcosil LC-C18-DB, mobilní fáze (ACN:H₂O, 90:10), průtoková rychlost 0,5 ml/min, vlnová délka 210 nm.



Obr. 16: Chromatogram ostřelovaného formamidu. Experimentální podmínky stejné jako u obrázku 15.

Kvantifikace formamidu nemohla být provedena, protože nebylo dosaženo rozumné retence resp. formamid eluuje v mrtvém čase. Eluční profil formamidu „koeluje“ se systémovými píky, které znemožňují vhodnou kvantifikaci. To potvrzují i těžko interpretovatelné hodnoty v tabulce 6.

Tab. 6: Plochy píků formamidu

	Plocha píku při 220 nm [mV·s]	Plocha píku při 210 nm [mV·s]
neostřelovaný formamid	1255	2041
ostřelovaný formamid	1313	1857

5 Závěr

Práce byla zaměřena na analýzu látek, ve kterých bylo generováno plazma obřím laserovým systémem PALS na Fyzikálním ústavu Jaroslava Heyrovského AV ČR. Pro analýzu 2-amino-1-butanolu, 3-methoxy-1-propanolu, 2-methyl-1-butanolu a formamidu byly zvoleny separační techniky – plynová a kapalinová chromatografie.

V systému GC-MS tvořeném středně polární kolonou Rtx-200MS byly proměřeny kalibrační závislosti 3-methoxy-1-propanolu a 2-methyl-1-butanolu a zjištěny hodnoty LOD a LOQ, které byly vypočteny dvěma způsoby: z odezvového faktoru a z jednotlivých chromatogramů. Hodnoty LOD resp. LOQ činily pro 3-methoxy-1-propanol 0,72 µg/ml (z odezvového faktoru) a 0,99 µg/ml (z jednotlivých chromatogramů) resp. 2,40 µg/ml (z odezvového faktoru) a 3,31 µg/ml (z jednotlivých chromatogramů); pro 2-methyl-1-butanol 0,49 µg/ml (z odezvového faktoru) a 0,96 µg/ml (z jednotlivých chromatogramů) resp. 1,64 µg/ml (z odezvového faktoru) a 3,22 µg/ml (z jednotlivých chromatogramů).

Analýzou ozařovaného a neozařovaného 3-methoxy-1-propanolu bylo zjištěno, že není možné vzhledem k nadbytku 3-methoxy-1-propanolu jednoznačně určit, které látky by generováním plazmatu mohly vzniknout a které jsou jen nečistotami z rozpouštědla či standardu. Pro přesnou identifikaci je potřeba provést další měření.

V optimalizovaném systému HPLC tvořeném kolonou Supelcosil LC-18-DB a mobilní fází MeOH/H₂O 40/60 (v/v) byly od sebe formamid, 2-amino-1-butanol a 3-methoxy-1-propanol účinně separovány v časech 2,8 min; 3,6 min a 5,2 min. Přestože formamid vždy eluoval s mrtvým časem, byl v optimalizovaném systému HPLC analyzován ostřelovaný formamid, aby mohlo být zjištěno, zda v něm po ozáření PALSem přibýly nové reakční produkty. Měření neukázalo v porovnání se standardem formamidu přílišný rozdíl, což může být dáno i nízkou citlivostí UV detekce.

Literatura

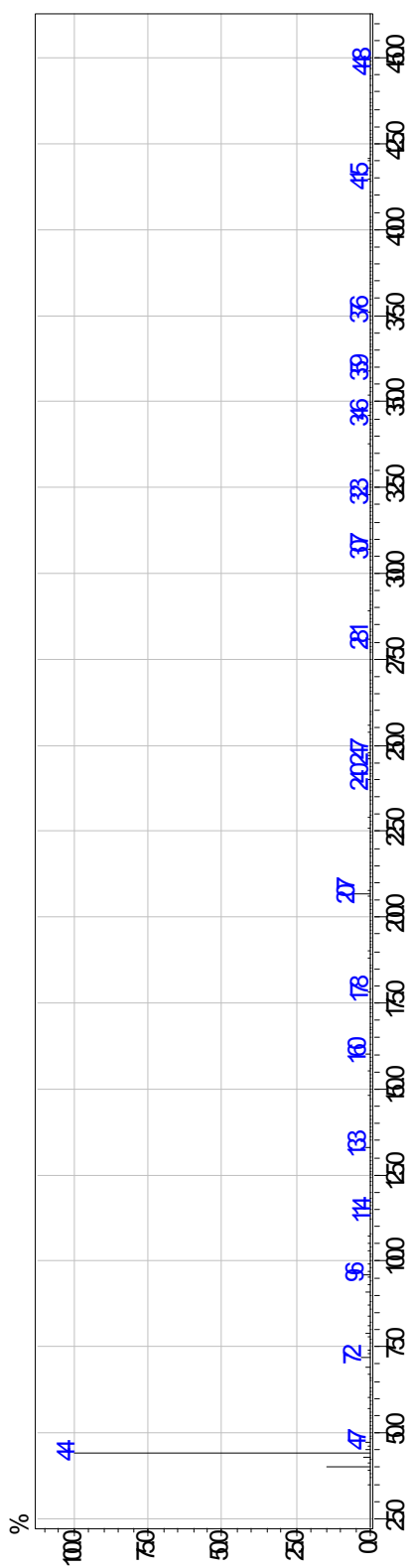
1. Moorbath S., Whitehouse M. J.: *Chemical Evolution: Physics of the Origin and Evolution of Life*, Cluver Acad. Publ. 87, Dordrecht (1996).
2. McClendon J.H.: *Earth-Science Reviews* **47**, 71 (1999).
3. Safronov V.S.: *Nasa Rep. TT F*, 677 (1972).
4. Kasting J.F.: *Orig. Life Evol. Biosph.* **20**, 199 (1990).
5. Walker J.C.G.: *Origins of Life* **16**, 117 (1985).
6. Levine J.S., Augustsson T.R., Natarajan M.: *Origins of Life* **12**, 245 (1982).
7. Levine J.S., Graedel T.E.: *Trans. Amer. Geophys. Union* **62**, 1177 (1981).
8. Grygar J., Horský Z., Mayer P.: *Vesmír*, Mladá Fronta, Praha, 1983.
9. Lesch H., Müller J.: *Velký třesk*, Knižní klub, Praha, 2005.
10. Kleczek J.: *Vesmír kolem nás*, Albatros, Praha, 1986.
11. McCord T.B. et al. (The Cassini VIMS Team): *Planetary and Space Science* **54**, 1524 (2006).
12. Civiš S., Ferus M.: *Astrochemie*, 2010
13. Babánková D., Civiš S., Juha L.: *Chem. Listy* **99**, 109 (2005).
14. Kamas, M.: Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, 103 s., 2010
15. URL: <<http://www.pals.cas.cz>> [cit. 26.4.2011].
16. Costanzo G., Saladino R., Crestini C, et.al: *BMC Evolutionary Biology* **7** (2007).
17. J. Takahashi, T. Hosakawa, H. Masuda, T. Kaneko, K. Kobayashi, T. Saito, Y. Utsumi: *Appl. Phys. Lett.* **74**, 877 (1999).
18. Juha L.: osobní sdělení
19. Karlíček R., Polášek M., Pospíšilová M., Solich P.: *Analytická chemie pro farmaceuty*, Karolinum, Praha, 2008.
20. Opekar, F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: *Základní analytická chemie*, Karolinum, Praha, 2003.
21. Zachař, P., Sýkora, D.: Plynová chromatografie, dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>> [cit. 2011-03-26].

22. Braithwaite A.; Smith F. J.: *Chromatographic methods*, Blackie Academic&Professional, Glasgow, 1996.
23. Štulík, K. a kol.: *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha, 2004.
24. URL:<<http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html>>
[cit.26.4..2011].
25. Churáček J., Jandera P.: *Úvod do vysokoučinné kapalinové chromatografie*, SNTL, Praha, 1984.
26. Churáček, J., Jandera, P., Krupčík J., Polonský J., Popl M., Vláčil F.: *Analytická separace látek*, SNTL, Praha, 1990.

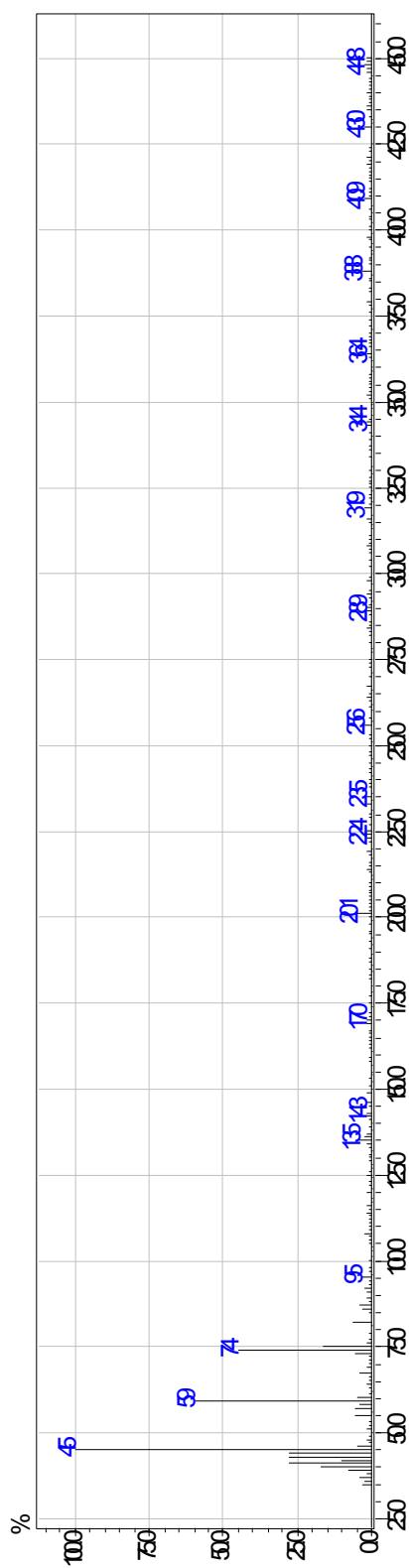
Příloha 1

Hmotová spektra látek detekovaných v roztoku neostřelovaného
3-methoxy-1-propanolu (osa y: signál [%];osa x: m/z)

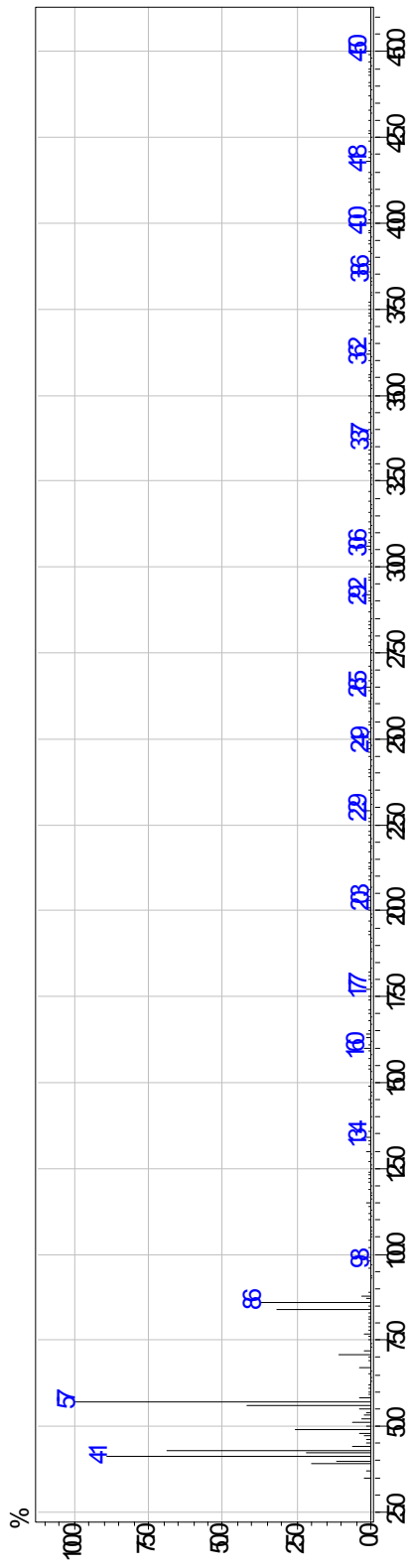
alanin ethylamid



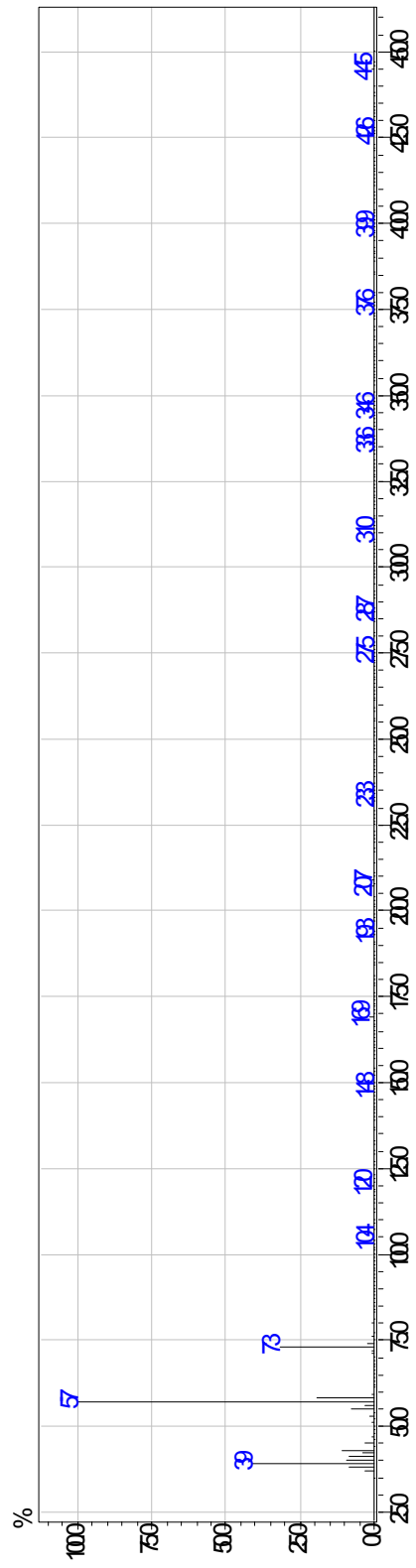
ethylether



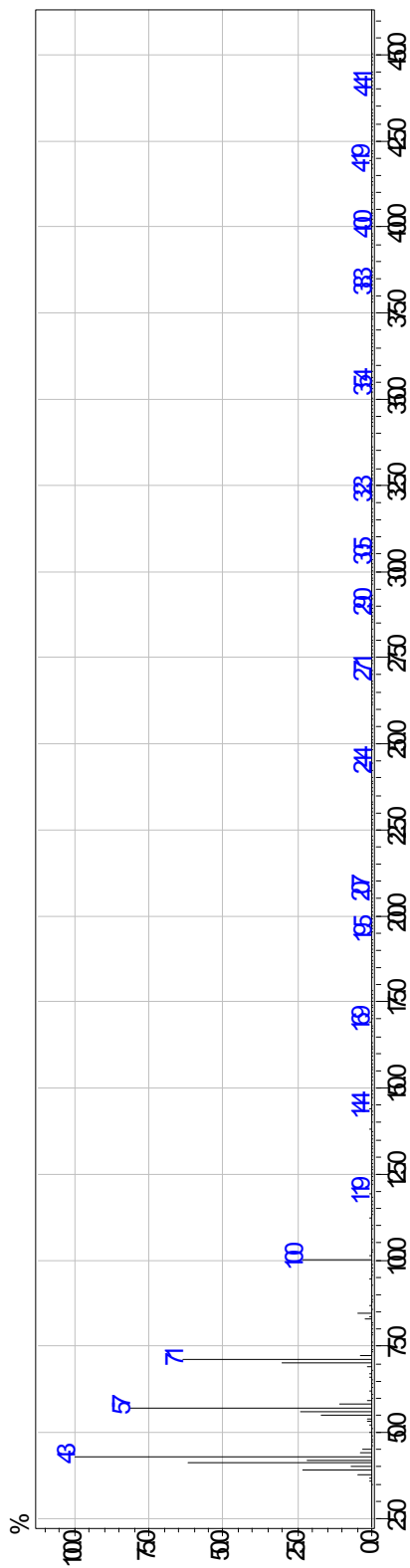
hexan



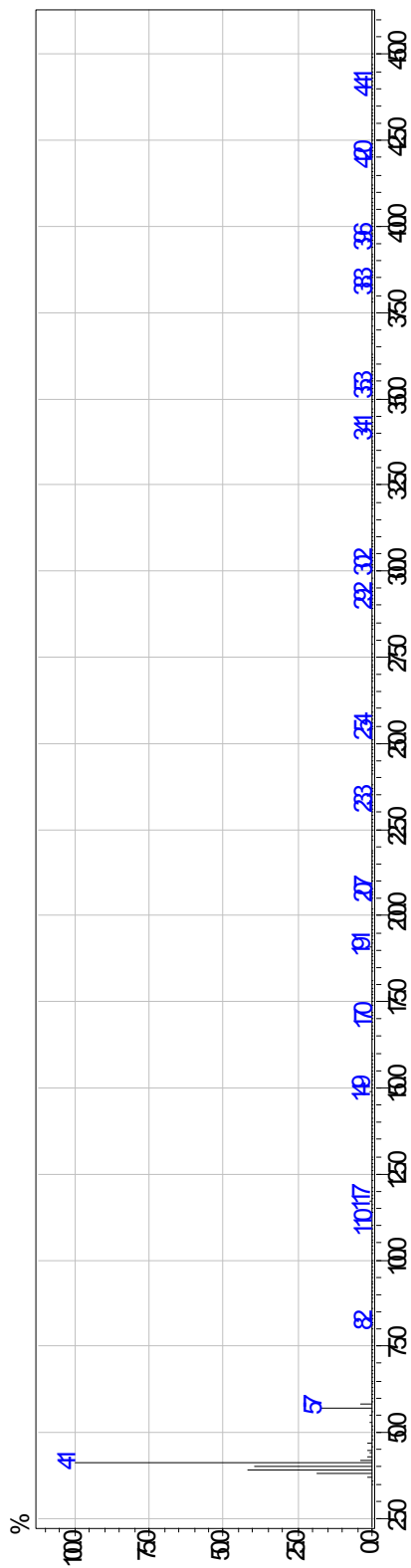
2-propen-1-ol



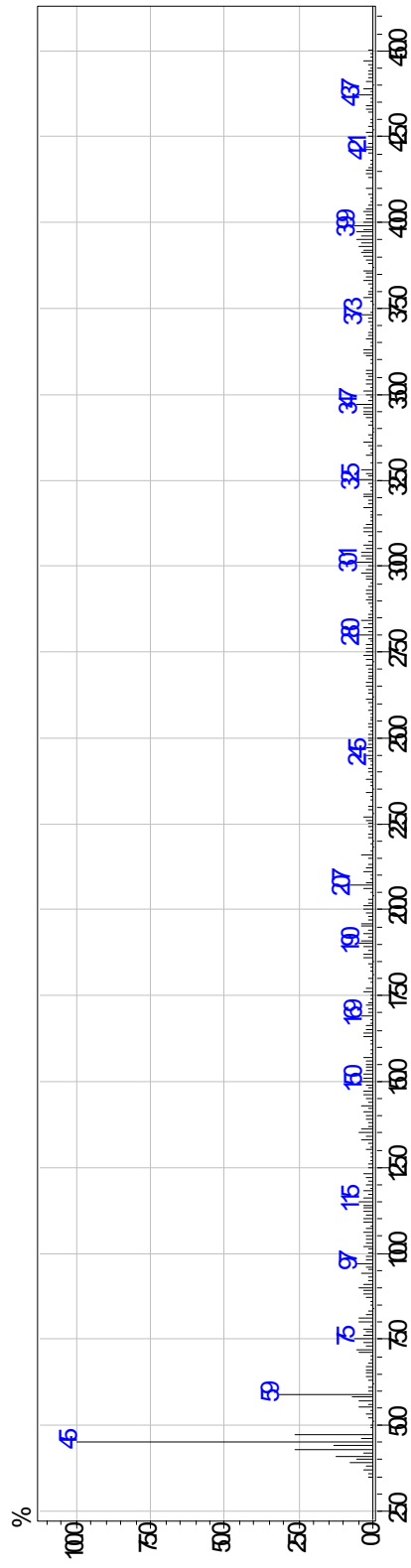
heptan



acetonitril



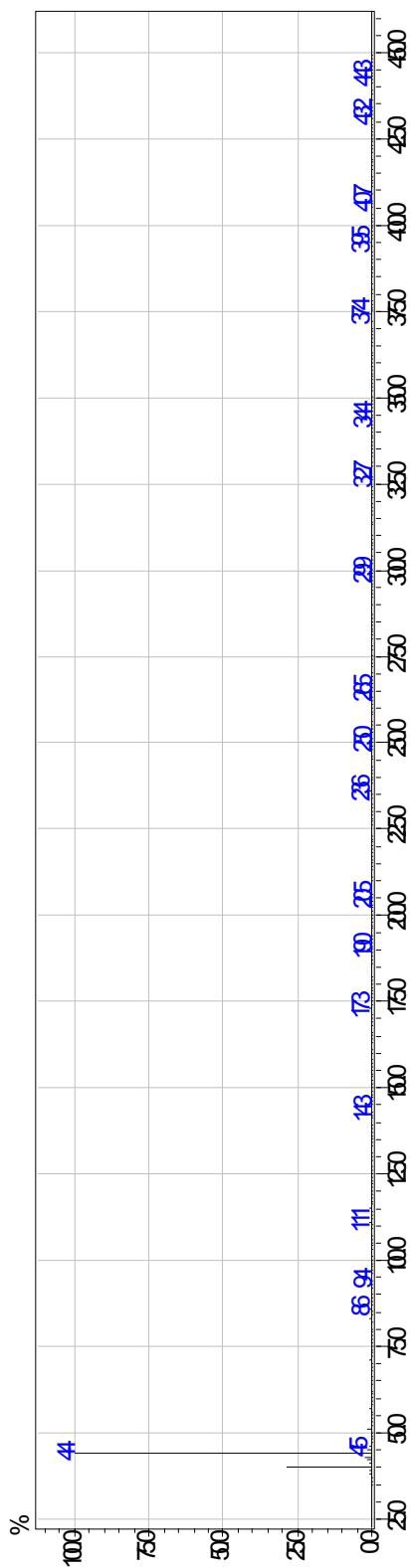
2-methoxy-1-propanol



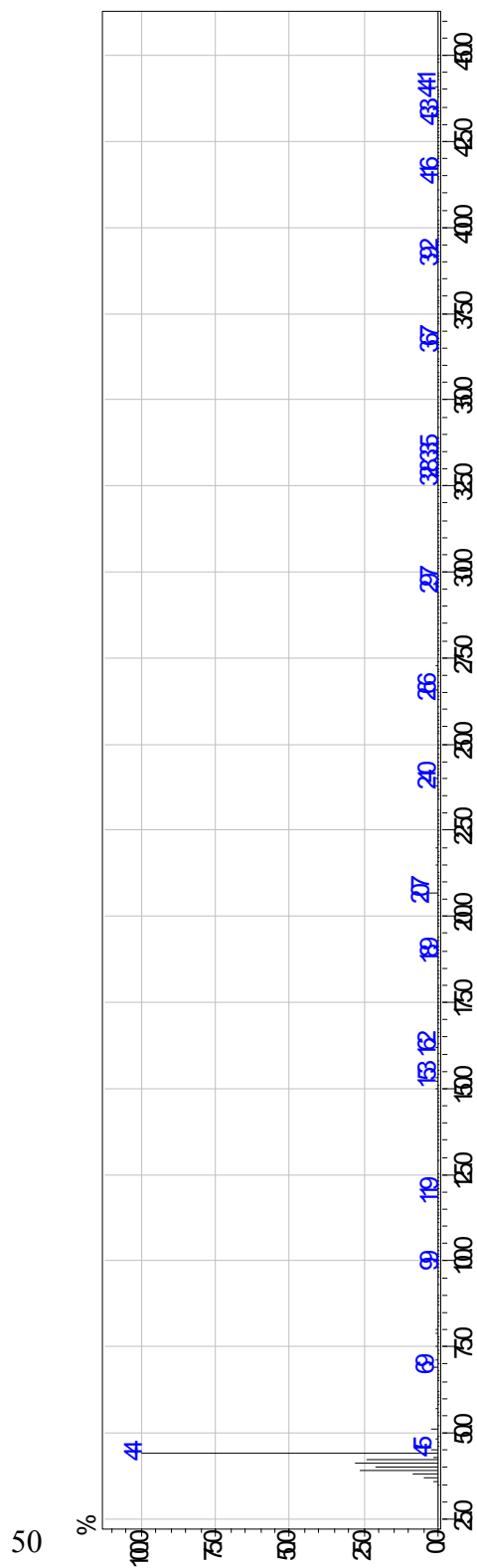
Příloha 2

Hmotová spektra předpokládaných reakčních produktů ostřelovaného
3-methoxy-1-propanolu (osa y: signál [%];osa x: m/z)

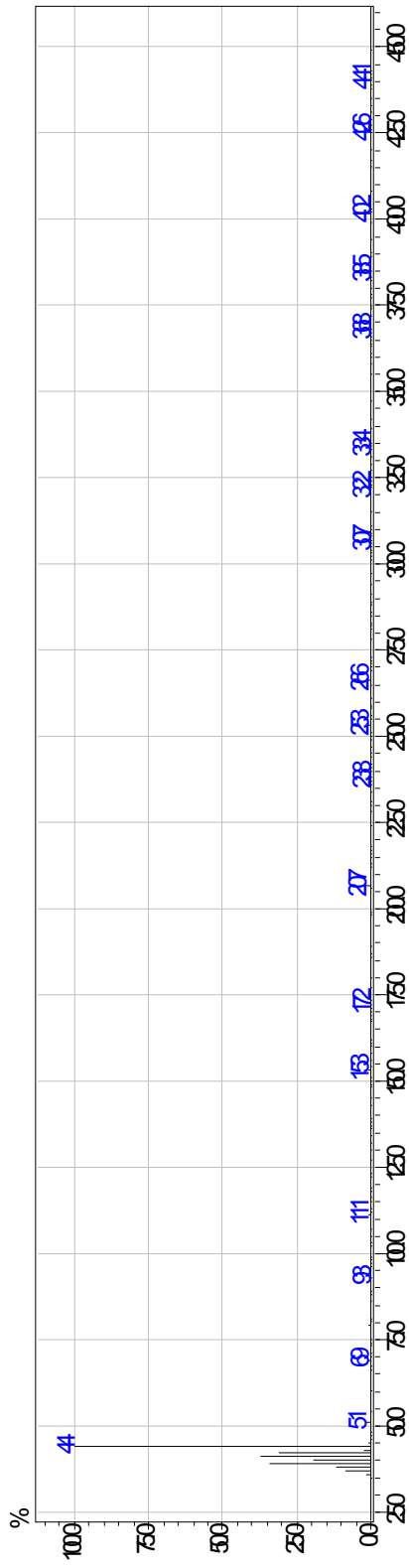
1-alanin ethylamid



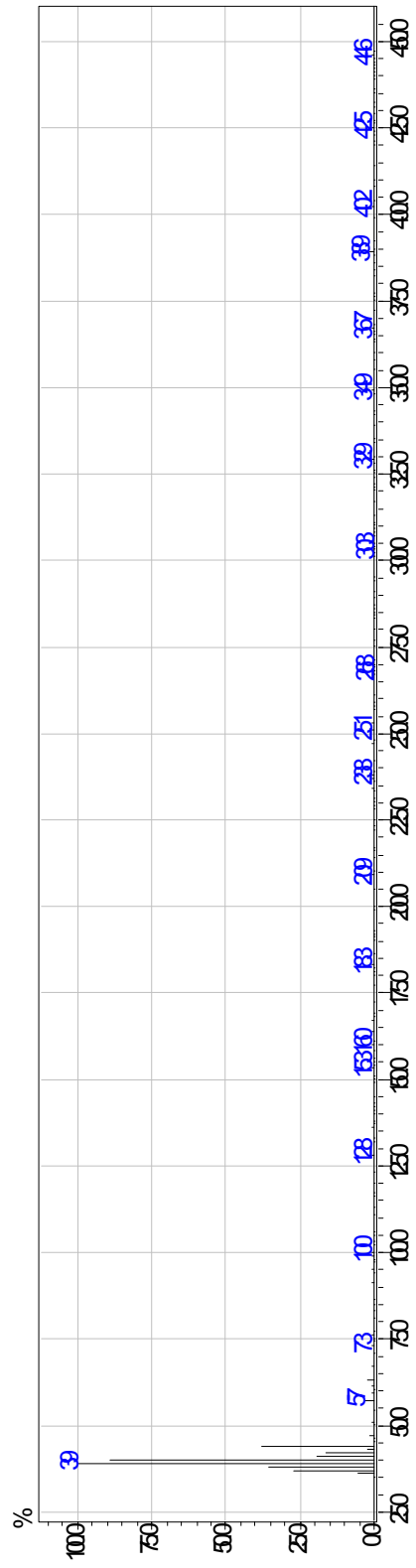
acetamid



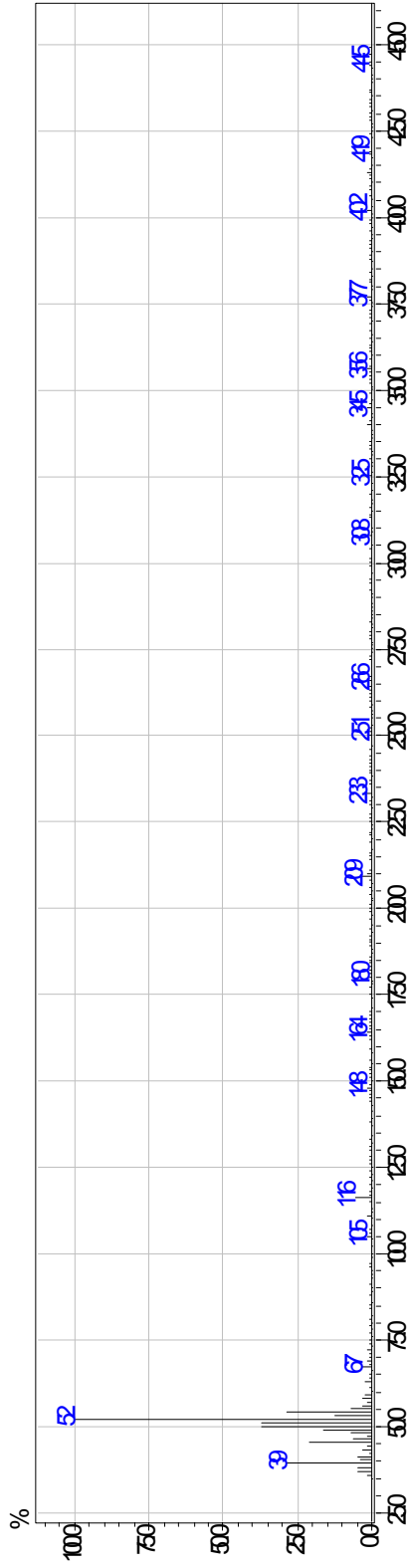
propan



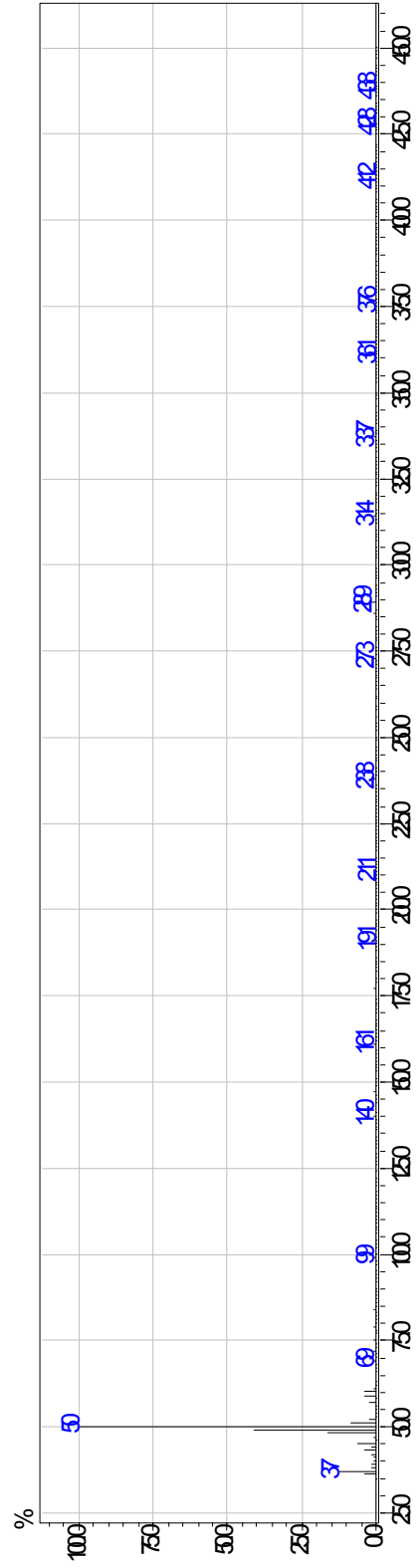
3-butin-1-ol



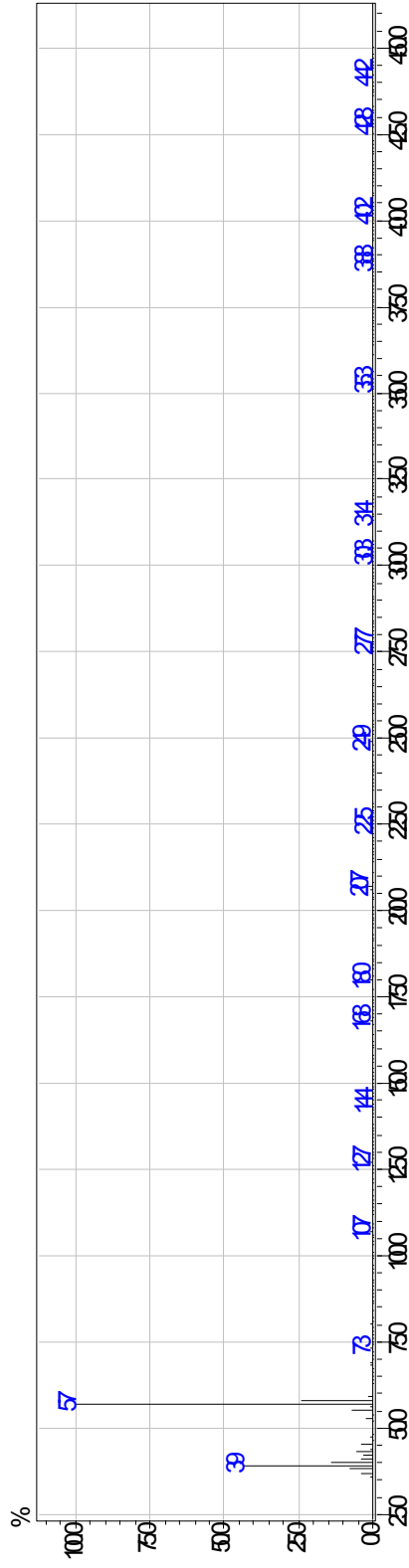
1-buten-3-in



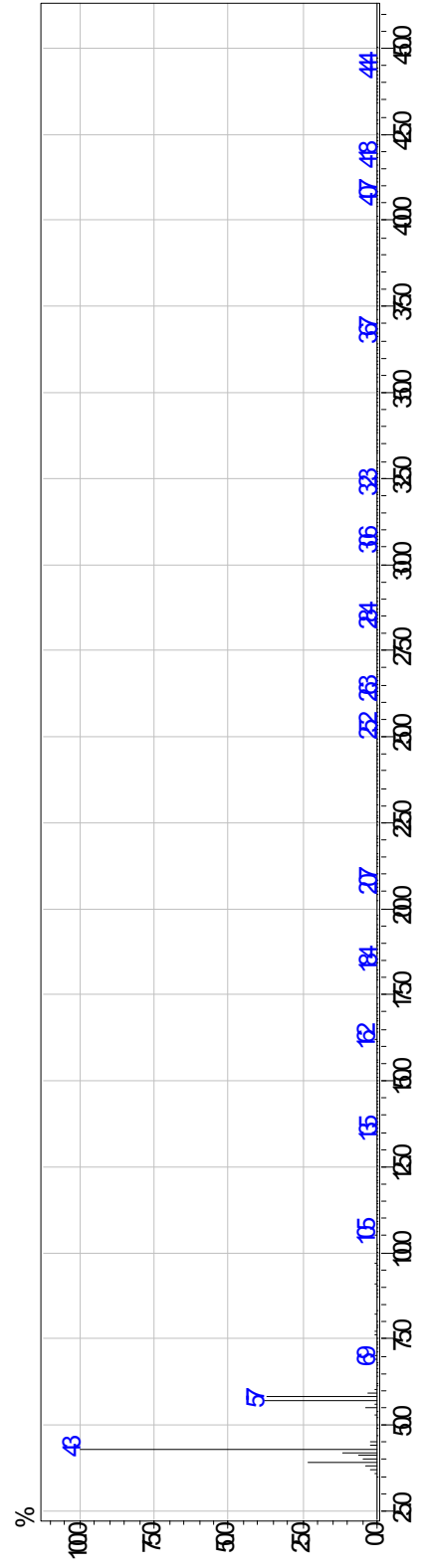
1,3-butadien



2-propen-1-ol



acetone



2-methoxy-1-propanol

