

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**VÝVOJ HPLC METODY PRO STANOVENÍ
VÝBUŠNINY DIAZODINITROFENOLU**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedúci diplomové práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský PhD.



Hradec Králové 2012

Lukáš Ihnát

Ďakujem Doc. RNDr. Daliborovi Šatinskému PhD za jeho odborné rady, vedenie a pomoc pri vypracovaní tejto diplomovej práce.

Čestne prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím autorským dielom, ktoré som vypracoval samostatne. Literatúra a zdroje v nej použité sú uvedené v časti Bibliografia.

Súhlasím s tým aby bola moja práca požičiavaná k študijným účelom a bola ďalej citovaná podľa platných noriem.

V Hradci Králové dne:

Lukáš Ihnát

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Konzultant: Doc. RNDr. Dalibor Šatinský, PhD.

Názov diplomovej práce: Vývoj HPLC metody pro stanovení výbušniny diazodinitrofenolu

Bola vyvinutá a optimalizovaná HPLC metóda pre stanovenie diazodinitrofenolu spolu s pikraminam sodným. Použitá kolóna bola Ascentis® Express C18 10cm x3mm; 2,7 μ m častice. Látky boli detekované UV spektrofotometrom pri 220 nm. Izokratická elúcia prebiehala s mobilnou fázou o zložení 0,085% H₃PO₄ a acetonitrilom v pomere 70/30. Prietok mal rýchlosť 0,8 ml/min. Termostat bol nastavený na 50°C. Retenčné časy pri týchto podmienkach boli: $t_{DDNP}=1,324$ min a $t_{PikNa}=4,012$ min.

Kľúčové slová: stanovenie, pikraminam sodný, diazodinitrofenol, HPLC, chromatografia, dinol, DDNP

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Consultant: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, PhD.

Diploma Thesis Title: The method development for determination of diazodinitrofenol explosive

A new HPLC method for determination of diazodinitrophenol alongside with sodium picramate was developed and optimized. Column Ascentis® Express C18 10cm x 3mm; 2.7µm particles was select as most suitable one. Detection of compounds was performed at 220 nm using UV detector. Mobile phase consist of mixture 0.085% H₃PO₄ and acetonitrile in ratio 70/30. Flow rate was determined at 0.8 ml/min. Column oven temperature was set to 50°C. Retention times under these condition was $t_{\text{DDNP}}=1.324$ min a $t_{\text{PiKNa}}=4.012$ min.

Keywords: determination, diazodinitrophenol, sodium picraminate, HPLC, chromatography, dinol, DDNP

1. OBSAH

1.	Obsah	6
2.	Zoznam skratiek.....	8
3.	Úvod.....	9
4.	Cieľ a zadanie diplomovej práce	10
5.	Teoretická časť.....	11
5.1.	Chromatografia	11
5.1.1.	História chromatografie	11
5.1.2.	Chromatografické metódy	12
5.1.3.	Vysokoučinná kvapalinová chromatografia	14
5.1.4.	Schéma kvapalinového chromatografu.....	15
5.1.5.	Chromatografické kolóny	17
5.1.6.	Stacionárna fáza.....	17
5.1.7.	Detektory v HPLC	18
5.2.	Test vhodnosti chromatografického systému.....	19
5.2.1.	počet teoretických priehradiek (N)	20
5.2.2.	Faktor symetrie píku (A_s).....	20
5.2.3.	Rozlíšenie chromatografických pík (R_s).....	21
5.3.	Validácia analytickej metódy	21
5.3.1.	Linearita	21
5.3.2.	Opakovateľnosť	21
5.3.3.	Presnosť	22
5.3.4.	Správnosť	22
5.3.5.	Robustnosť	22
5.3.6.	Stabilita	23
5.4.	Metódy stanovenia Diazodinitrofenolu a Pikrminanu sodného	23
5.5.	Testované látky	23

5.5.1.	Diazodinitrofenol	23
5.5.2.	Pikraminan sodný	24
6.	Experimentálna časť	25
6.1.	Materiály a pomôcky.....	25
6.1.1.	Prístroje.....	25
6.1.2.	Látky a chemikálie.....	25
6.2.	Príprava Roztokov.....	25
6.3.	Popis práce	26
6.4.	Optimalizácia chromatografických podmienok	26
6.4.1.	Výber kolóny a Optimalizácia mobilnej fázy.....	26
6.4.2.	Optimalizácia vlnovej dĺžky	37
6.4.3.	Optimalizácia teploty	38
6.4.4.	Súhrn chromatografických podmienok.....	38
6.5.	Test vhodnosti chromatografického systému.....	40
6.5.1.	počet teoretických priehradiek (N)	40
6.5.2.	Faktor symetrie píku	40
6.5.3.	Rozlíšenie chromatografických píkov	41
6.6.	Validácia analytickej metódy	41
6.6.1.	Linearita	41
6.6.2.	Opakovateľnosť	44
6.6.3.	Robustnosť.....	45
6.6.4.	Stabilita	47
7.	Záver	56
8.	Bibliografia	57

2. ZOZNAM SKRATIEK

ACN	Acetonitril
DAD	Diode Array detektor
DDNP	Diazodinitrofenol
FCHT UPCE	Fakulta chemicko-technologická Univerzita Pardubice
FaF UK	Farmaceutická fakulta Univerzity Karlove
GC	Plynová chromatografia
HPLC	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
LC	Kvapalinová chromatografia
MeOH	Metanol
MF	Mobilná fáza
MS	Hmotnostná spektrometria
PikNa	Pikraminan sodný
RSD	Relatívna smerodajná odchýlka
SD	Smerodajná odchýlka
SFC	Superkritická fluidná chromatografia
UV/VIS	Ultrafialová/viditeľná oblasť spektra svetla

3. ÚVOD

Diazodinitrofenol alebo tiež 4,6-dinitrobenzen-2-diazo-1-oxid, prvý krát pripravený Griessom v roku 1858, sa používa hlavne ako súčasť traskavín, teda primárnych spúšťačov explózie prevažne v USA a Japonsku. DDNP má tiež svoje využitie v zmesi so skleneným práškom pri výrobe zápaliek. Vysoká stabilita tiež uľahčuje jeho skladovanie, samotný môže byť ľahko iniciovaný iskrou, ohňom, trením alebo úderom. Tlakom ho na rozdiel od ostatných fyzikálnych dejov nedetonujeme. Vzhľadom na fakt, že traskaviny s DDNP neobsahujú olovo, sú označované ako netoxické alebo tiež neolovnaté rozbušky.

Chromatografia, hlavne vysokoúčinná kvapalinová chromatografia je v súčasnosti jednou z najrozšírenejších moderných analytických metód. Za posledných 35 rokov došlo k jej veľkému rozšíreniu v laboratóriách a je asi po analytických váhach základom modernej analýzy. K jej univerzálnosti prispieva nielen nespočetné množstvo kolón, ktoré sa ďalej zlepšujú alebo možnosť pripravenia si vlastnej mobilnej fázy na mieru ale aj fakt, že došlo k signifikantnému zníženiu cien čo je v dnešnej dobe dôležitý fakt.

4. CIEĽ A ZADANIE DIPLOMOVEJ PRÁCE

Táto diplomová práca mala za cieľ vyvinúť, optimalizovať a následne validovať HPLC metódu stanovenia diazodinitrofenolu. Postupne sme testovali rozdielne kolóny, zároveň sme menili zloženie a rýchlosť prietoku mobilnej fázy. Dôraz sme kládli na retenčný čas DDNP a tiež symetriu piku, v neposlednom rade bol dôležitý aj celkový čas analýzy.

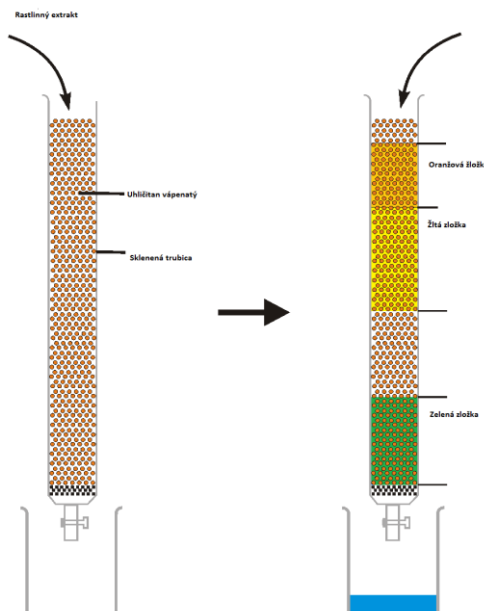
Popri vývoji a validácii sme si stanovili za cieľ aj stabilitné skúšky. Tie sme robili jednak s rôznymi rozpúšťadlami ale tiež sme testovali stability na priamom slnečnom svetle a za zvýšenej teploty.

5. TEORETICKÁ ČASŤ

5.1. CHROMATOGRAFIA

5.1.1. HISTÓRIA CHROMATOGRAFIE

Za priekopníka chromatografie sa považuje ruský chemik a botanista Michael Tswett (1872-1919), ktorý v roku 1901 dokázal oddeliť zmes rastlinných farbív na kolóne so stacionárnou fázou z uhličitanu vápenatého na žltú, oranžovú a zelenú zložku. Mobilnou fázou v tomto prípade bol petroléter. Päť rokov nato použil termín chromatografia odvodený z gréckych slov chroma – farba a graphein – písať (1). Na jeho prácu následne nadviazali až začiatkom 30. rokov Lederer odseparovaním luteinu a xanthínu z rastlinného extraktu.



OBR.Č. 1 - TSWETTISOV POKUS ROZDELENIA RASTLINNEHO ESTRAKTU

Veľkým medzníkom bolo prestavenie časticovej chromatografie Archer J.P. Martinom a Richardom L.M. Syngom začiatkom 40. rokov. Kedy použili silikagel v kolóne spolu s vodou. Spoločne taktiež pracovali aj na iných princípoch chromatografie a popísali základy plynovo-kvapalinovej chromatografie (2). Títo páni resp. ich práce dali základ ďalšiemu rozvoju chromatografických metód, papierovej chromatografii (Consden et al.), iontovo-výmennej chromatografie (Mayer a Tompkins, Samuelson), elektroforéze (Haugaard a Kroner) a mnohým ďalším (3).

Martin spolu s Jamesom a Janákom pracovali na plynovo-kvapalnej a plynovo-pevnofázovej chromatografii. Prvé základy a štúdie o plynovej chromatografii boli publikovane koncom druhej svetovej vojny. Plynová chromatografia sa stala kvalitnou

separačnou technikou rozširujúca sa do chémie, biochémie a iných vied (4). Úspešné výsledky GC sa postupne aplikovali aj do starších metód kvapalinovej chromatografie. Vzhľadom na fakt, že tieto nové podmienky využívali vysokých tlakov, termín HPLC bol zavedený (5).

Celkovo by sa dalo zhrnúť, že samotná história chromatografie nie je sled za sebou nasledujúcich objavov ale skôr pavúkom vzájomne sa ovplyvňujúcich a inšpirujúcich sa prác a vynálezov. No napriek tomu jednotlivé oblasti stále zlepšovali v poradí selektivita → detekcia → citlivosť → tandemové systémy → automatizácia → počítačom ovládané systémy → miniaturizácia → paralelná separácia na kolónach → chirálna analýza → separácia s molekulárnym rozpoznávaním.

5.1.2. CHROMATOGRAFICKÉ METÓDY

Chromatografia je definovaná ako fyzikálna metóda separácie, v ktorej sa jednotlivé zložky oddeľujú medzi dve fáze, z ktorých jedna je stacionárna a druhá (mobilná) preteká systémom (6). Ako už z definície vyplýva delenie chromatografie môže byť z niekoľkých hľadísk. Ako najčastejšie používaná je klasifikácia podľa mobilnej fázy. Tu existujú dve hlavné metódy: plynová chromatografia (*gas chromatography* – GC) a kvapalinová chromatografia (*liquid chromatography* - LC). Do tejto kategórie sa najnovšie zaradzuje aj superkritická fluidná chromatografia (*supercritical fluid chromatography* - SFC). Mobilná fáza sa v tomto prípade nachádza v superkritickej forme. A práve tato vlastnosť, kedy mobilná fáza vykazuje znaky kvapaliny a plynu zároveň robí z SFC unikátnu metódu separácie (7).

Iné delenie je z pohľadu stacionárnej fázy. Tu existujú dve skupiny: kolónová chromatografia, v ktorej je stacionárna fáza usporiadaná v trubici o danej dĺžke a priemere. Materiál môže byť rozdielny ale vo väčšine prípadov je to buď oceľ alebo sklo. V druhom prípade je zoskupenie stacionárnej fázy plošné. To zahŕňa dve podskupiny a to papierovú chromatografiu a tenkovrstvú chromatografiu na hliníkovej alebo sklenenej podložke (8).

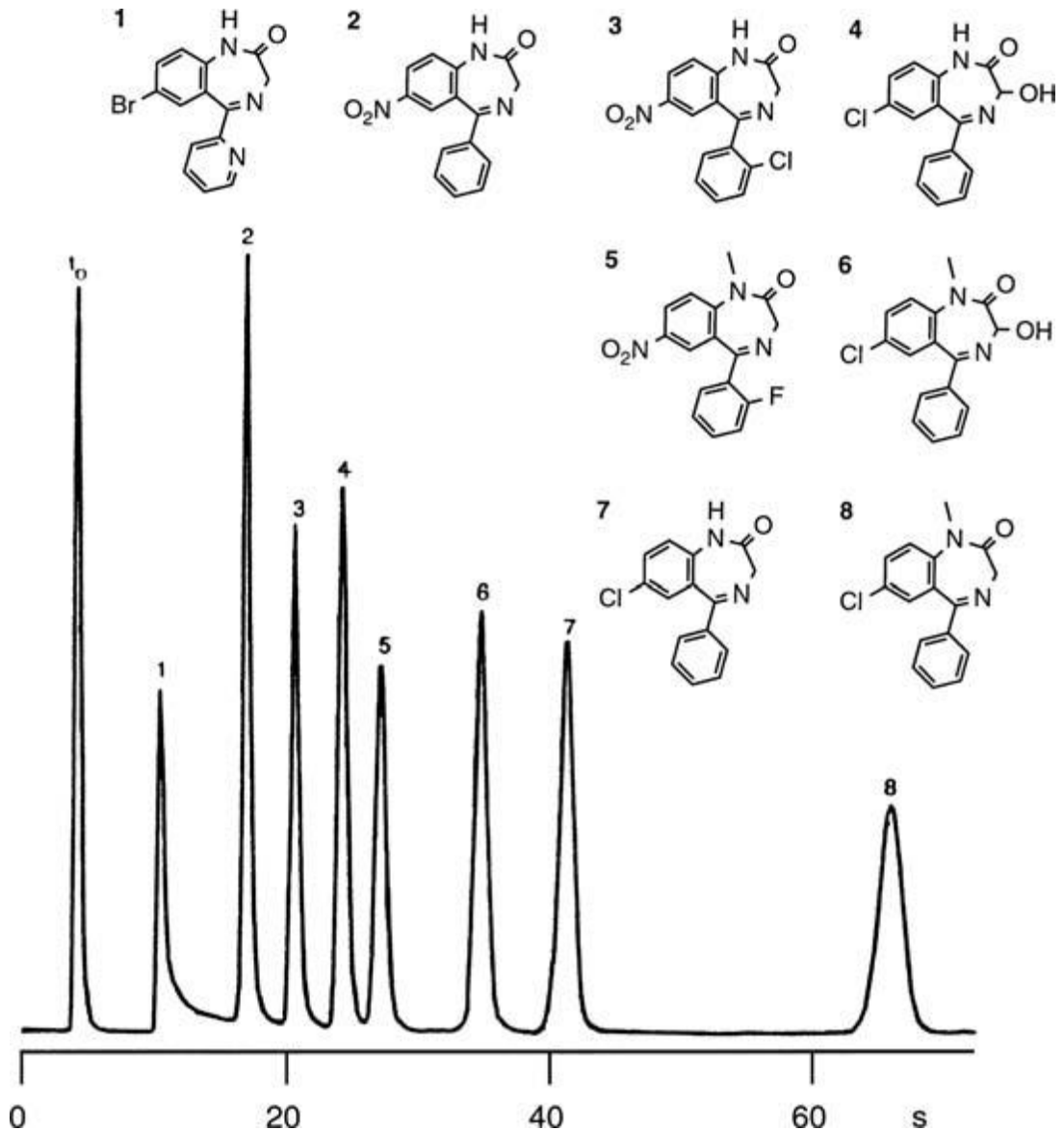
Jedno z ďalších delení, ktoré dobré vystihuje podstatu chromatografického deja je na základe samotného princípu, ktorý prevláda pri separácii. Mnohokrát je týchto fyzikálno-chemických dejov viac ale jeden prevláda a charakterizuje ho. Patrí sem rozdeľovacia chromatografia, absorpčná chromatografia, iontovo-výmenná chromatografia, gélová a afinitná chromatografia.

Samotný odsek by som venoval špeciálnym technikám či metódam, ktoré nemožno podľa predchádzajúcich kritérií nikam zaradiť. Často spomínaným termínom v rámci

chromatografie je technika na reverzných fázach, kedy je mobilná fáza významne polárnejšia ako stacionárna. Opakom je zase chromatografia na normálnej fáze. Izokratická prípadne jej opak gradientová elúcia je proces, v ktorom sa zloženie mobilnej fázy nemení (izokratická) počas doby analýzy alebo mení kontinuálne (gradientová). Stepwise elúcia je odnož gradientovej, kedy sa zloženie mobilnej fázy mení skokovo počas procesu. Dvojrozmerná chromatografia príp. viac-rozmerná chromatografia je metóda kedy sa časť alebo všetky zložky separačného procesu ďalej vystavujú separácii. Techniky kedy sa mení teplota kolóny sa nazývajú izotermická prípadne programovo-teplotná chromatografia. *Programmed-Flow chromatography* a *Programmed-Pressure chromatography* sú metódy kedy sa mení rýchlosť prietoku prípadne tlak počas celej analýzy alebo len jej časti. Reakčná chromatografia je technika, kedy identita jednotlivých zložiek je úmyselne zmenená pred ich príchodom do detektora. Pyrolysis-Gas chromatography zase schválne termicky ničí vzorky na jednoduchšie fragmenty pred ich vstupom na kolónu. Post-Column derivatization pozostáva z derivatizácie oddelených zložiek po ich eluovaní z kolóny a pred ich príchodom do detektora (9).

5.1.3. VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, HPLC, je moderná separačná metóda ponúkajúca ako kvalitatívnu tak kvantitatívnu možnosť analýzy. Na jednoduchom príklade si môžeme znázorniť účinnosť HPLC. Osem benzodiazepínov môže byť separovaných len za 70 sekúnd (obr.č. 2).



OBR.Č. 2 - HPLC ANALÝZA 8 BENZODIAZEPÍNŮV

V porovnaní s inými technikami je táto skoro univerzálna aplikácia, vysoká presnosť výsledkov, široké spektrum zariadení, kolón umožňujúcich jej všestrannosť v neposlednom rade treba spomenúť, že mnoho dnešných laboratórií je vybavených HPLC prístrojmi a preto sú technikami číslo jedna (10).

Chromatografický proces aby nám poskytol kvalitné a požadované výsledky potrebuje presne zadané podmienky na svoj priebeh. Od typu kolóny, jej dĺžky, priemeru či

typu samotných častíc, cez typ mobilnej fázy, jej rýchlosť prietoku až po nastavenia termostatu v priestore s kolónou.

Separácia jednotlivých zložiek vzorku na kolóne a ich postupná detekcia môže prebiehať na základe viacerých fyzikálno-chemických princípov.

Adsorpčná chromatografia pracuje na princípe rozdielnych medzi-molekulárnych síl medzi stacionárnou fázou a jednotlivými zložkami analytu. Silikagel sa využíva primárne ako sorbent. Veľký povrch je jednou z podmienok, preto sú často jednotlivé častice pórovité. Ako ďalšie materiály sú využívané absorpčné uhlie, celulóza, uhličitan vápenatý. Všeobecným pravidlom je, že pri analýze sa nepolárne vzorky eluujú nepolárnou mobilnou fázou.

Rozdeľovacia kvapalinová chromatografia sa na rozdiel od adsorpčnej ako obe fázy využívajú kvapaliny. Zložky analytu sa rozdeľujú medzi 2 nemiesiteľné kvapaliny. Pričom jedna je zakotvená na pevnom nosiči a druhá je mobilná fáza. Rozdelenie a rýchlosť elúcie potom závisí od rozpustnosti v daných kvapalinách.

Iontovo-výmenná chromatografia pracuje na princípe výmeny iónov analytu a stacionárnej fázy. Iontomeniče alebo tiež ionexy sa delia na základe toho či menia anióny vtedy sa nazývajú anexy alebo katióny – katexy. Tento typ chromatografie je často využívaný k analýze organických kyselín a zásad, prípadne anorganických iónov.

Gélová permeačná chromatografia alebo tiež ang. *size exclusion chromatography* – *SEC* je typ kvapalinovej chromatografie kedy sa látky obsiahnuté vo vzorku delia na základe svojej veľkosti. Menšie molekuly sú permeované do pórov gélu a teda eluované neskôr v dôsledku toho, že prenikli hlbšie do stacionárnej fázy (8).

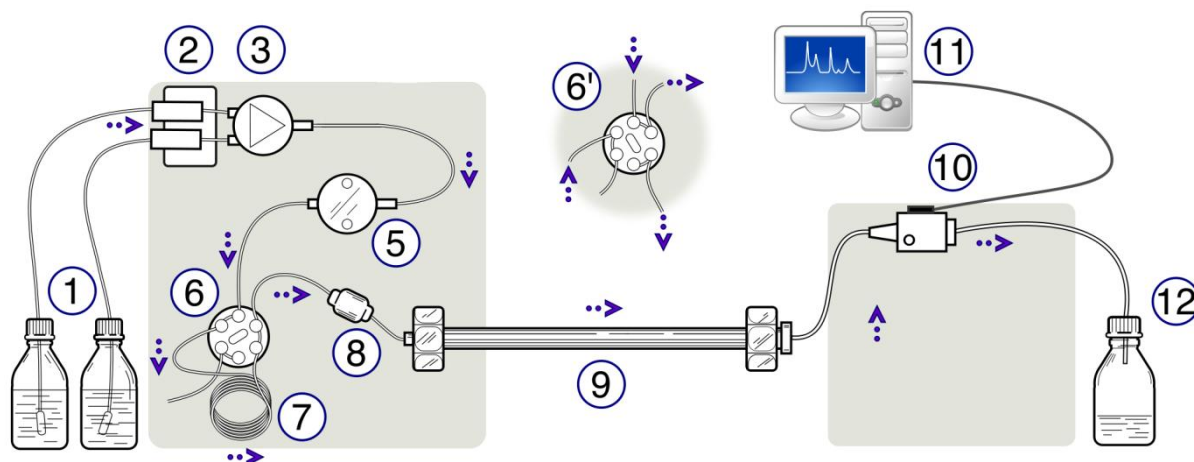
Afinitná chromatografia prevažne používaná biochémií funguje na princípe kedy sa na špeciálne upravenú stacionárnu fázou dokáže naviazať len molekula, ktorá spĺňa špecifické sterické a nábojové podmienky. Táto metóda dokáže úspešne odizolovať veľké molekuly ako sú proteíny, lipidy atď. (11)

Chirálna chromatografia separuje od seba dva stereoizoméry. V tomto prípade musí byť buď stacionárna fáza alebo mobilná chirálna. To môžeme dosiahnuť naviazaním chirálnej látky na achirálnu ako je napríklad silikagel.

5.1.4. SCHÉMA KVAPALINOVÉHO CHROMATOGRAFU

Chromatografický systém napriek tomu akokoľvek moderný je sa skladá stále z rovnakých častí. Postupne sa však jednotlivé komponenty zlepšujú ako ich materiálna

výroba tak aj ich možnosti. Schému chromatografu s jeho postupným zapojením vidíme dole na obrázku.



OBR.Č. 3- SCHÉMA HPLC PRÍSTROJA

Jednotlivé prvky HPLC ako aj ich jednoduchá špecifikácia sú:

Zásobník mobilnej fázy (1): uskladňujú dostatočné množstvo mobilnej fázy pre celý proces analýzy. Ak je mobilná fáza multikompozitná zásobníkov je zákonite viac. Ich objem môže byť rozdielny záleží od rýchlosti prietoku, dĺžky analýzy a samozrejme či sa jedna len o jednu alebo viacej naprogramovaných za sebou.

Degaser (2): už z názvu vyplýva, že ide o zariadenie, ktoré odstraňuje plyn z mobilnej fázy aby zabránil tvorbe bubliniek, ktoré by mohli ovplyvniť výsledky analýzy. Ako jedna metóda sa používa hélium, ktoré prebubláva a cez mobilnú fázu, ta druhá je použitie vákua.

Gradientový ventil (3): slúži na tvorbu mobilnej fázy, ktorá sa skladá z viacerých látok.

Pumpa (5): nazývaná tiež srdcom chromatografu musí spĺňať niekoľko podmienok. Konštantný tok bez pulzov s minimálnou odchýlkou až do tlaku 50 MPa. Musí byť taktiež odolná voči chemikáliám, ktoré sú používané ako mobilné fázy.

Injektor (6): sprostredkúva nástrek analytu do prúdu mobilnej fázy. Moderné systémy sa zoskupujú do tzv. autosamplerov, do ktorých môžeme dať niekoľko vzoriek vo vialkách a programovo následne zadať, aké prípadne v akom poradí sa majú dávkovať do systému. Dôležitý aspekt u injektoru je reprodukovateľnosť nástreku a jeho presnosť. Najmenšie rozumné množstvo v systéme HPLC je 1 μ l.

Kolóna (9): ak sme pumpu prirovnali k srdcu tak kolóna je určite mozgom celého systému. Práve tu dochádza na základe rôznych fyzikálno-chemických dejov k rozdeleniu zložiek analytu (bližšie v kap. 5.1.5 Chromatografické kolóny).

Detektor (10): zariadenie, ktoré on-line sníma niektorú z vlastností jednotlivých zložiek analytu ako vychádzajú za sebou z kolóny (bližšie v kap. 5.1.7 Detektory v HPLC).

Počítač (11): v dnešnej dobre elektronizácii sa vyhodnocovanie analýzy robí v podstate len na počítači, ktorým vieme spätne zasahovať do procesu a robiť určité korektúry v snahe získať lepšie výsledky.

V rámci zapojenia HPLC prístroja môže ešte obsahovať navyše injekčnú slučku (7), predkolónu (8) a zberač frakcií alebo odpadu (12)

5.1.5. CHROMATOGRAFICKÉ KOLÓNY

V súčasnosti sa ako materiál výroby HPLC kolóny využíva nerezová oceľ, ktorá je odolná voči vysokým tlakom a tiež chemickej korózii. Sklenené trubice ako základ kolón sú hlavne inertné, na použite v HPLC systéme sa kombinujú s nerezovými trúbkami. Vzácné sa môžeme stretnúť aj s tantalovými kolónami a plastickými z PEEK (polyetylén éter ketón). Vnútorň priemer analytickej kolóny sa pohybuje v rozsahu 2-5 mm. Existujú tiež mikro a kapilárne kolóny no tie sa nevyužívajú v HPLC systéme. Bežná dĺžka býva od 5 cm až po 25 ak sú využívané častice menšie ako 10 μm . Dlhšie kolóny predzujú retenčné časy.

5.1.6. STACIONÁRNA FÁZA

Náplne chromatografických kolón zodpovedajú za selektivitu a konečnú separáciu analytu, preto je veľmi dôležitý ich výber a spolu s dĺžkou a vnútorným priemerom jednoznačne určujú kolónu. Vo väčšine prípadov je stacionárnou fázou porézna častica o veľkostiach od 2 do 10 μm .

Silikagel je v súčasnosti najpoužívanejším materiálom na ich výrobu, jeho hlavnou nevýhodou je rozmedzie pH 3 – 8, pri ktorom je stabilný. Dôležitá je taktiež povaha naviazaných ligandov na stacionárnej fázy. Stacionárna fáza pre normálnu chromatografiu má na svojom povrchu naviazané polárne skupiny (kyano, amino, hydroxy,...). No táto metóda je v pozadí a častejšie sa využíva chromatografia na reverzných fázach, kde sú na povrchu naviazané uhlíkové reťazce o dĺžke 8 – 18 uhlíkov, prípadne iné lipofilné skupiny akým je napr. fenyl.

Stacionárna fáza na základe **oxidu zirkoničitého**, na ktorom nie sú naviazané silánové skupiny ale miesta charakteru Lewisových kyselín. Z tohto dôvodu je nutne pri použití tejto stacionárnej fázy celý proces analýzy pufrovať. Výhodou je teplotná stabilita a celé spektrum pH, pri ktorej môžeme analyzovať.

Polymérne stacionárne fázy s dostatočným povrchom, kvôli svojej makroporéznej štruktúre na báze polystyrendivinylbenzénu. Výhodou je rovnako celé rozmedzie pH a vysoká tepelná stabilita (do 200° C). No pracovné tlaky sú obmedzené na 20 MPa.

Združením silikagelu a polymérnej štruktúry vznikli **hybridné stacionárne fázy**, pH a teplotná stabilita sa málo znížili na max 12 resp. 100° C, no zvýšil sa možný pracovný tlak na 40 MPa.

Porézny grafitický karbón je tiež jedným z materiálov na výrobu stacionárnych fáz, jeho inertnosť je jednou z výhod. Veľmi často sa tento typ využíva pri analýze chirálnych a štruktúrnych izomérov.

Monolitické stacionárne fázy na rozdiel od predchádzajúcich, ktoré sú tvorené čiastočkami, monolity obsahujú špeciálny silikagel, ktorý tvorí jeden kompaktný kus. Póry o veľkosti 1-2 μm , nazývane makropóry, umožňujú použitie vysokých prietokových rýchlostí mobilnej fázy. Výhodami sú hlavne skrátenie času analýzy, nízky protitlak, rovnaká účinnosť ako u klasických silikagelových kolón.

HILIC – Hydrophilic Interaction liquid chromatography je jednou z najnovších trendov v rámci kvapalinovej chromatografie, pri ktorej sú analyzované pomocou organickej mobilnej fázy a neutrálnej stacionárnej látky silne polárne a hydrofilné látky s nízkou alebo až žiadnou retenciou k reverznej SF. (12).

5.1.7. DETEKTORY V HPLC

Detekcia eluátu je jedným z posledných krokov analýzy vzorku. Ako prvý „detektor“ môžeme považovať ľudské oko. V prvopočiatoch kvapalinovej chromatografie sa používala off-line analýza, pri ktorej sa jednotlivé zložky eluátu frakčne delili a následne osobitne analyzovali. Až v polovici 60. rokov Horvaath a Lipsky prvýkrát uviedli detektor pre masovejšie použitie – UV detektor. Následne zdokonaľovaný a postupne vytlačovaný UV/VIS s premenlivou vlnovou dĺžkou. Detektor sa umiestňuje čo najbližšie za kolónu aby sa minimalizovalo možné zníženie meranej vlastnosti. Následne za neho môžeme zasadiť nádobu na odpad, zberač frakcii alebo ďalší detektor (10).

Detektor musí byť schopný zaznamenať zmenu zloženia mobilnej fázy a tú následne premeniť na elektrický signál, ktorý je priamoúmerný sledovanej zmene. Signál je ďalej spracovaný a zaznamenávaný. Najdôležitejšou vlastnosťou detektora je jeho linearita, teda schopnosť priamoúmernej zmeny signálu ku koncentrácii. Medzi ďalšie kľúčové vlastnosti patrí vysoká citlivosť, dostatočný odstup medzi signálom a šumom, malá citlivosť pri zmenách teploty, tlaku a prietoku.

Spektrofotometrický detektor – vo všeobecnosti najpoužívanejší typ detektora pre analýzu. Základom je absorpcia určitej vlnovej dĺžky eluátom pretekajúcim celou detektoru. Už podľa definície vidíme, že sa nejedná len o jediný detektor ale o niekoľko typov na základe toho aký druh žiarenia použijeme. V najjednoduchšej podobe sa jedná o ortuťovú lampu nastavenú na jednu vlnovú dĺžku, 254 nm. UV/VIS na rozdiel má nastaviteľnú vlnovú dĺžku, ktorú si prispôbíme pre naše potreby. Ďalším zdokonaľovaním tohto detektora vznikol DAD – diode array detector, ktorý meria absorbanciu simultánne v určitom rozmedzí vlnových dĺžok. To nám poskytuje omnoho viacej údajov na presnejšiu analýzu.

Fluorimetrický detektor – založený na princípe absorpcie určitého druhu žiarenia (najčastejšie UV) a následne emituje žiarenie o vyššej vlnovej dĺžke, ktoré sa meria kolmo na smer pôvodného žiarenia.

Refraktometrický detektor – jedná sa o univerzálny detektor, ktorého princíp spočíva v lome svetla pri prechode medzi dvoma fázami. Index lomu analytu a mobilnej fázy je rozdielny pokiaľ analyt obsahuje zložku, ktorá spôsobuje výchylku. Problémom ale pri použití je jeho vysoká citlivosť na zmeny teploty.

Elektrochemické detektory – založené na vlastnostiach zložiek analytu podstúpiť oxidáciu alebo redukciu a tým vytvárať elektrický potenciál, ktorý je merateľný. Tieto vlastnosti využíva ampérometrický, voltmetrický alebo polarografický detektor.

Light-scattering detector - patrí medzi neselektívne spôsoby detekcie, kedy sa k eluátu pristrieka inertný plyn (prevažne dusík). Kvapôčky mobilnej fázy sa odparia sa v zohriatej trubici, zvyšné čiastočky postupujú ďalej a sú osvetlené laserom. Rozptýlene svetlo laseru je detekované fotodiodov alebo fotozosilovačom a premenené na elektrický signál (13).

Hmotnostný spektrofotometer – MS bolo prevzaté z plynovej chromatografie, no ako také muselo byť upravené aby sa dalo použiť aj za tlakov používaných u HPLC. MS detektor separuje ióny plynnej fázy na základe ich náboja ku hmotnosti. Na ionizáciu sa používajú dve techniky *APCI - Atmospheric pressure chemical ionization* a *APESI - Atmospheric pressure electrospray ionization* (11).

5.2. TEST VHODNOSTI CHROMATOGRAFICKÉHO SYSTÉMU

Tento test je súčasťou každej analytickej metódy a má za úlohu zaistiť vhodnosť vyvinutých podmienok pre každodenné použitie v laboratóriu. Definuje minimálne požiadavky na kritéria, ktoré metóda musí spĺňať nato aby bola prijatá do praxe (14).

Primárne parametre testu je rozlíšenie píkov, efektivita kolóny (počet teoretických priehradiek), faktor symetrie píku.

5.2.1. POČET TEORETICKÝCH PRIEHRADIEK (N)

Účinnosť chromatografickej kolóny sa vypočíta podľa vzorca za podmienok rovnakých aké sú pri samotnej analýze vzorku.

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

t_R retenčný čas

w_h šírka píku v polovici jeho výšky

pričom tieto hodnoty sa musia vyjadriť v rovnakých jednotkách. Vyšší počet teoretických priehradiek znamená vyššiu účinnosť kolóny. (15)

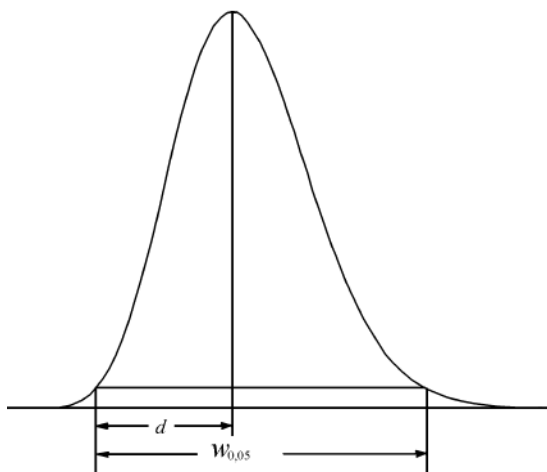
5.2.2. FAKTOR SYMETRIE PÍKU (A_s)

Faktor symetrie alebo chvostovanie (anglicky tailing), označuje rovnomernosť píku až na základnú líniu. Vypočíta sa podľa vzorca:

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

$w_{0,05}$ šírka píku v 1/20 jeho výšky

d vzdialenosť medzi kolmicou spustenou zo stredu vrcholu píku a vzostupnou časťou v 1/20 jeho výšky



OBR.Č. 4 - PÍK ELUÁTU S VYZNAČENOU ŠÍRKOU A ŠÍRKOU V 1/20 VÝŠKY

Hodnota 1,0 sa považujú za ideálne, čo sa v praxi nestáva, preto sú prípustné aj hodnoty väčšie ako 1,0 (dochádza ku chvostovaniu) a menšie ako 1,0 kedy dochádza ku frontovaniu píku. (15)

5.2.3. ROZLIŠENIE CHROMATOGRAFICKÝCH PÍKOV (R_s)

Rozlíšením sa myslí rozlíšenie medzi dvoma za sebou nasledujúcimi píkmí. Vypočíta sa podľa vzorca:

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

t_{R1} a t_{R2} retenčné časy dvoch susedných píkov

w_{h1} a w_{h2} šírky píkov v polovičnej výške

Hodnoty väčšie ako 1,5 zodpovedá rozlíšeniu píkov až na základnú líniu. (15)

5.3. VALIDÁCIA ANALYTICKEJ METÓDY

Validácia znamená zber dôkazov o tom, že vyvíjaná metóda je dostatočne podložená a presná a produkuje želané výsledky. Požaduje rozdielne experimentálne nastavenie a štatistické vyhodnotenie výsledkov (16).

5.3.1. LINEARITA

Linearita ako vlastnosť metódy je chápaná ako lineárna odozva signálu na koncentráciu zložky analytu (17).

Pre test linearity je potreba minimálne 5 koncentrácií stanovovaného vzorku prípadne iného štandardu. Linearitu dvoch vzájomne premenných charakterizujeme metódou lineárnej regresie. Pričom čím viac sa korelačný koeficient blíži hodnote 1 tým je závislosť lineárnejšia. Matematickým vyjadrením sa jedná o rovnicu:

$$y = a + bx$$

5.3.2. OPAKOVATELNOSŤ

Opakovateľnosť definujeme ako tesnosť zhody výsledkov validovanej metódy získaných v rovnakom laboratóriu, rovnakým pracovníkom, použitím rovnakých nástrojov v krátkom časovom rozmedzí.

Výsledkom je relatívna smerodajná odchýlka v percentách pre sled meraní vypočítaná podľa vzorca:

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

y_i jednotlivé hodnoty (plocha píku, výška alebo pomer plôch)

\bar{y} priemer jednotlivých meraní

n počet jednotlivých hodnôt (15)

5.3.3. PRESNOSŤ

Presnosť metódy definujeme znova ako tesnosť zhody ale teraz prevádzanej v sérii (6 – 10 meraní) s homogénnou vzorkou. Ako výsledok je opäť relatívna smerodajná odchýlka alebo štandardná odchýlka.

Opakovateľnosť ako podskupinu presnosti chápeme ako presnosť za rovnakých analytických podmienok v krátkom časovom slede. Reprodukovateľnosť je zase vyjadrenie medzilaboratornej presnosti. (17)

5.3.4. SPRÁVNOSŤ

Vyjadrujeme ňou tesnosť zhody výsledkov meraní a skutočnej hodnoty meranej veličiny (najčastejšie teda koncentrácie). Ide teda o rozdiel medzi získanou hodnotou veličiny a reálnou hodnotou získanou z iného zdroja. Nezávislou metódou, ktorá je overená vnútorným štandardom teda získame skutočné hodnoty. Týmto hodnotením zisťujeme prítomnosť náhodnej alebo systémovej chyby, ktorá sa pri testovaní analytu môže vyskytnúť. Získane údaje ďalej porovnávame podľa vzorca:

$$R_i = 100 \cdot \frac{c_i}{c_0}$$

c_0 je vložená koncentrácia

c_i je koncentrácia nameraná našou metódou

V anglickej literatúre sa termín správnosť označuje ako *recovery* voľne preložené ako výťažnosť. (18)

5.3.5. ROBUSTNOSŤ

Robustnosť analytickej metódy je miera zachovať výsledky čo najmenej zmenené aj pri malých zmenách parametroch metódy. Naznačuje spoľahlivosť analytického postupu počas jeho používania za stanovených podmienok. Medzi klasické parametre, ktoré meníme je pH, zmena kolóny, zmena zloženia mobilnej fázy, rýchlosť prietoku, zmena teploty. (18)

5.3.6. STABILITA

Stabilitou látky chápeme jej schopnosť zachovať si určité vlastnosti po určitú dobu za daných podmienok. Súborom testov sledujeme zmenu/y v kvalite stanovovanej látky pôsobením iných ako štandardných vonkajších podmienok. Ich cieľom je stanoviť také podmienky, pri ktorých si daná látka zachová svoje vlastnosti čo najdlhšie.

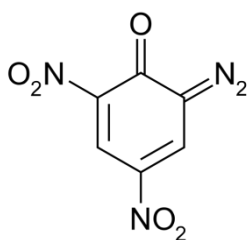
5.4. METÓDY STANOVENIA DIAZODINITROFENOLU A PIKRMINANU SODNÉHO

V čase písania diplomovej práce neboli publikované žiadne metódy stanovenia DDNP ani PikNa.

5.5. TESTOVANÉ LÁTKY

5.5.1. DIAZODINITROFENOL

Nazývaný tiež dinol alebo DDNP (4,6-dinitrobenzen-2-diazo-1-oxid) bol prvýkrát pripravený koncom 50. rokov 19. storočia ale ako výbušnina, presnejšie traskavina, až v 20. rokoch minulého storočia.



OBR.Č. 5 - CHEMICKÝ VZOREC DDNP

DDNP je oranžovo-žltý prášok. Slabo rozpustný vo vode (19). Lepšie rozpustný je v étery, alkohole a benzéne. Rozpustnejší v kyseline octovej a stabilný v studených anorganických kyselinách. V nitrobenzéne a acetóne sa rozpúšťa bez známok rozkladu. K rozloženiu dochádza pôsobením kyseliny syrovej a iných organických zlúčenín. Taktiež vystavením priamemu slnečnému žiareniu, k výbuchu dochádza pri zahriati na 150°C. Ľahko sa vznieti iskrou, plameňom, trením. Tlak nespôsobuje výbuch priamo ale stlačený môže byť stále ľahko detonovaný (20). Zmes vody a DDNP znižuje citlivosť na vznietenie, čo sa využíva pri transporte tejto traskaviny (21).

Vlastnosti DDNP

Molekulový vzorec	C ₆ H ₂ N ₄ O ₆
Molekulová hmotnosť	210,104
Hustota	1,803 g/cm ³

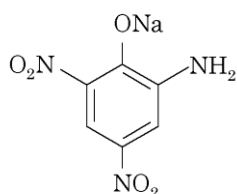
Stabilita	Dobrá
Citlivosť	Vysoko citlivý
Klasifikácia	Traskavina

Proces priemyselnej výroby DDNP nie je známy ale existujú minimálne 3 spôsoby ako ho pripraviť v laboratórnych podmienkach. Jeden zo spôsobov je diazotácia pikraminanu sodného s kyselinou dusitou, pripravenou *in situ* z dusitanu sodného pôsobením 20% kyseliny chlorovodíkovej (20).

DDNP je menej citlivý ako ostatné bežne používané traskaviny (fulminát ortuťnatý alebo azid olovnatý) preto sa používa ako súčasť rozbušiek alebo zápalníc. Výhodou je tiež, že neobsahuje ťažké kovy ako je ortuť a je teda málo toxický k životnému prostrediu (22).

5.5.2. PIKRAMINAN SODNÝ

Je červeno-hnedá pasta, používaná pri príprave farbív a pigmentov. Molekulový vzorec je $C_6H_4N_3NaO_5$ a jeho molekulová hmotnosť 221,10 g/mol. Vo vode veľmi ťažko rozpustný. Za laboratórnych podmienok je stabilný (23). Jedná sa o horľavinu a reaguje s redukujúcimi látkami.



OBR.Č. 6 - CHEMICKÝ VZOREC PIKNA

6. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

6.1. MATERIÁLY A POMÔCKY

6.1.1. PRÍSTROJE

Chromatografický systém Shimadzu	
Pumpa	Shimadzu LC-20AD
Degasér	Shimadzu DGU-14 ALVP
Autosampler	Shimadzu SIL-MTA
Termostat	Shimadzu CTO-10 ACVP
DAD detektor	Shimadzu SPAD-M10 AVP
Vyhodnotenie	Chromatografický software LC Solution
Spektrofotometer	Agilent 8453
pH meter	Hanna Instruments
Analytické váhy	Sartorius analytic

6.1.2. LÁTKY A CHEMIKÁLIE

Acetonitril (Sigma Aldrich)

Diazodinitrofenol (Syntetizované na Katedre teórie a technológie výbušnín, FCHT UPCE)

Hydroxid sodný (Penta, Chrudim)

Kyselina fosforečná 85% (Sigma Aldrich)

Kyselina chlorovodíková (Penta, Chrudim)

Metanol (Sigma Aldrich)

Peroxid vodíka (Sigma Aldrich)

Pikraminan sodný (Syntetizované na Katedre teórie a technológie výbušnín, FCHT UPCE)

Voda

6.2. PRÍPRAVA ROZTOKOV

Pracovný roztok sa skladal z pikraminanu sodného a DDNP o koncentrácii 500mg/l rozpustených v MeOH. Návažky jednotlivých látok ($m_{\text{PikNa}} = 1,11 \text{ mg}$ a $m_{\text{DDNP}} = 1,15 \text{ mg}$) sme osobitne rozpustili v 1 ml MeOH a zmiešali sa v pomere 1:1. Pre kalibráciu sme pracovný roztok riedili podľa nasledujúcej tabuľky:

c(mg/l)	riedenie(μl pracovného roztoku + μl MeOH)
150	150 + 350
125	125 + 375
100	100 + 400
75	75 + 425
50	50 + 450
25	25 + 475
5	5 + 495
2	2 + 498

TABUĽKA 1- SCHÉMA PRÍPRAVY ROZTOKOV

Pri testoch stability v čase sme navažovali dvojnásobné množstvá ($m_{\text{PikNa}}= 2,08$ mg a $m_{\text{DDNP}}=2,30$ mg) a rozpúšťali v 2 ml MeOH. Príprava vzorkou u testovania stability v rozpúšťadle prebiehala podobne ako v predošlých prípadoch, tj. návažka približne 1 mg a rozpustenie v 1 ml rozpúšťadla ale s tým rozdielom, že miesto 1 ml MeOH sme používali 0,1 M a roztok NaOH, 0,1% a 0,01% roztok H_2O_2 , 0,1M a HCl a H_2O .

6.3. POPIS PRÁCE

Pri optimalizácii metódy sme začínali výberom najvhodnejšej kolóny a úpravy podmienok stanovenia ako rýchlosť prietoku, teplota a zloženie mobilnej fázy tak aby došlo k odseparovaniu PikNa a DDNP až na základnú líniu s ohľadom na veľkosť a symetriu jednotlivých píkov.

Následne sme metódu validovali pri optimálnych podmienkach.

6.4. OPTIMALIZÁCIA CHROMATOGRAFICKÝCH PODMIENOK

Výber a optimalizácia podmienok pre stanovenie DDNP spočívala predovšetkým s správnej voľbe kolóny (stacionárnej fázy), určení vhodného zloženia mobilnej fázy a prietokovej rýchlosti, teploty počas analýzy a v neposlednom rade aj správnej vlnovej dĺžke pre detekciu.

Cieľom bola separácia oboch píkov až na základnú líniu s ohľadom na rozumný čas analýzy vzorku a zachovania vhodných podmienok pre použitú kolónu.

6.4.1. VÝBER KOLÓNY A OPTIMALIZÁCIA MOBILNEJ FÁZY

Pri optimalizácii boli merané retenčné časy DDNP a PikNa a tabuľkovite usporiadané v závislosti na výbere kolóny, zmene zloženia mobilnej fázy pri 30 °C.

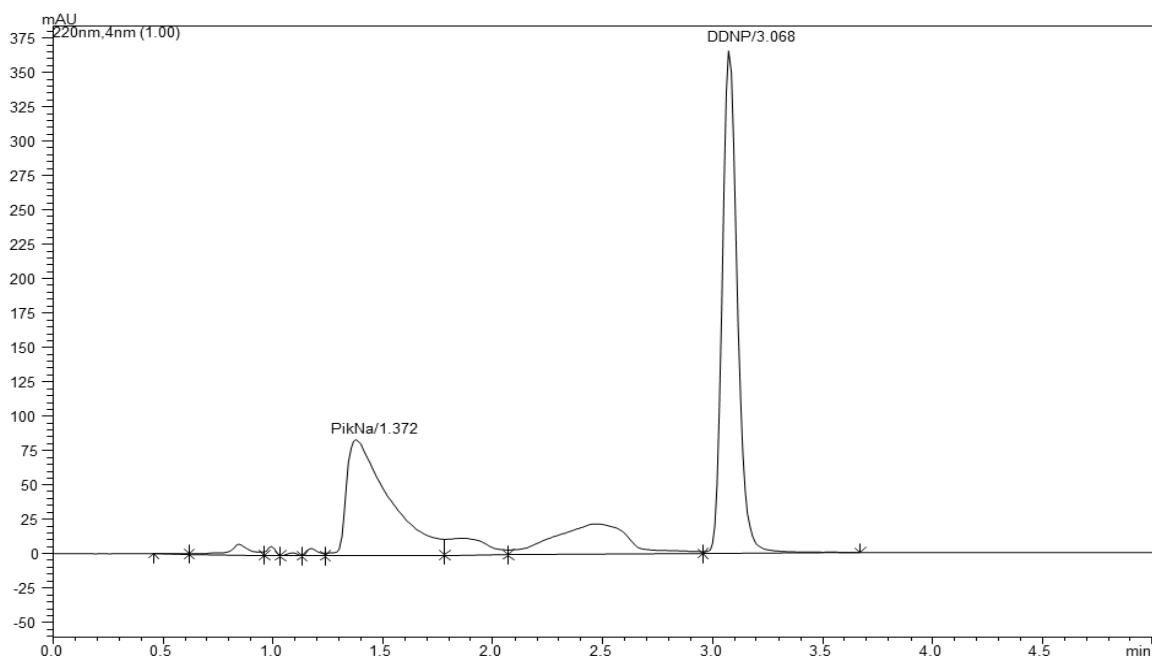
Následne bolo z najlepších výsledkov vybraná jedná kolóna, ktorá poskytovala kvalitné údaje a tú sme ďalej optimalizovali a validovali.

Kolóna - Ascentis® Express C18 10cm x 4,6mm; 2,7µm častice

Mobilná fáza Pomer zložiek	Prietok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	t _r (PikNa) [min]	t _r (DDNP) [min]	Poznámky
H ₂ O/ACN 90/10	1	15	30	1,650	4,97	
H ₂ O/ACN 85/15	1	15	30	1,462	3,650	
H ₂ O/ACN 80/20	1	15	30	1,372	3,068	Obr.č.7

TABUĽKA 2 - TESTOVANÉ PODMIENKY A VÝSLEDKY ASCENTIS® EXPRESS C18 10CM X 4,6MM; 2,7µM ČASTICE

Pri testovaní za zvolených podmienok sa ako jediný vhodný pík na analýzu eluoval DDNP, pík PikNa chvostoval ako vidno na obr.č. 7. Preto tieto podmienky nie sú vhodné pre použitie v praxi.



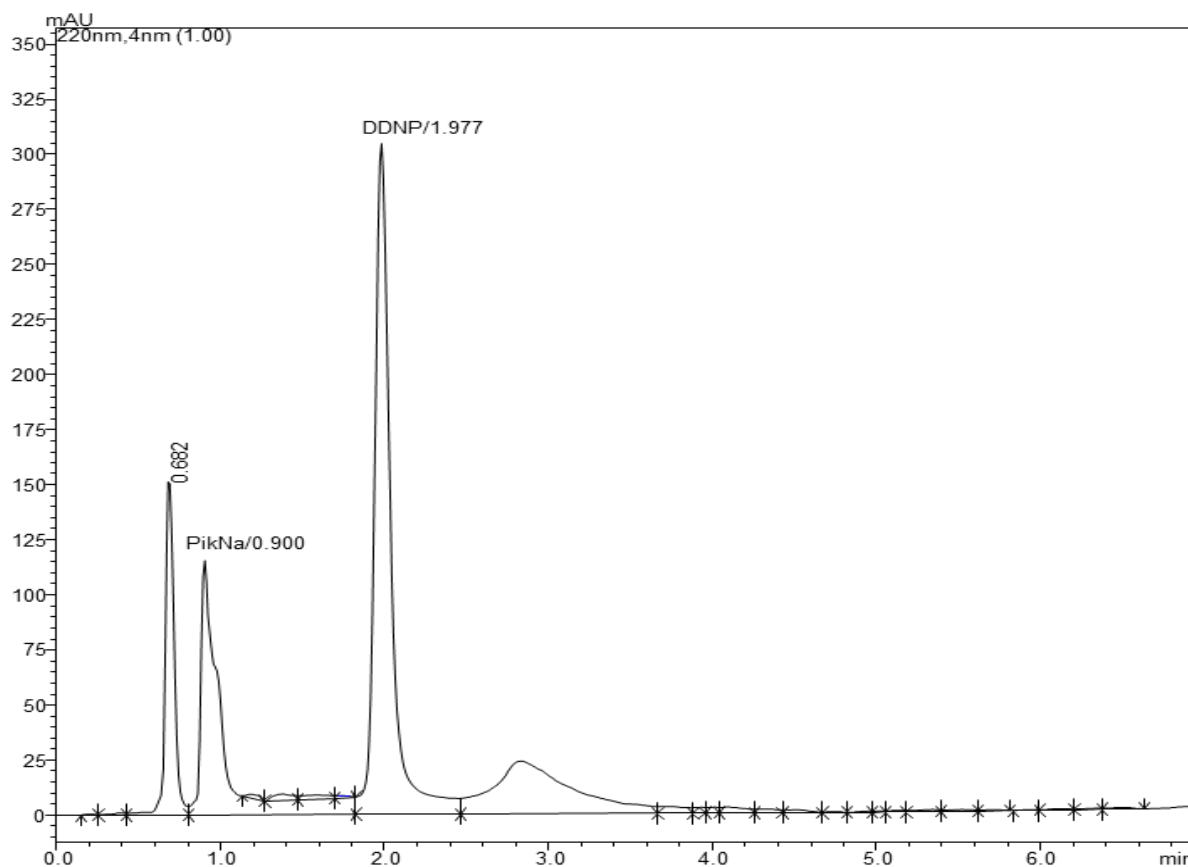
OBR.Č. 7 - CHROMATOGRAM PRI POUŽITÍ KOLÓNY ASCENTIS® EXPRESS C18 10CM X 4,6MM; 2,7µM ČASTICE

Kolóna – Monolith C18 10cm x 3mm

Mobilná fáza Pomer zložiek	Prietok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	$t_{r(\text{PikNa})}$ [min]	$t_{r(\text{DDNP})}$ [min]	Poznámky
H ₂ O/ACN 90/10	1	5,5	30	0,901	1,997	Obr.č.8
H ₂ O/ACN 85/15	1	5,5	30	0,903	1,733	

TABUĽKA 3 - TESTOVANÉ PODMIENKY A VÝSLEDKY PRE KOLÓNU MONOLITH C18 10CM X 3MM

Pri testovaní tejto kolóny boli retenčné časy oboch látok uspokojivé ale symetria píku PikNa ako je vidieť na obr. č. 8 už nie. Taktiež sa eluoval príliš blízko píku mŕtveho objemu. Ani zmena pomeru zložiek mobilnej fázy nepriniesla žiadaný výsledok.



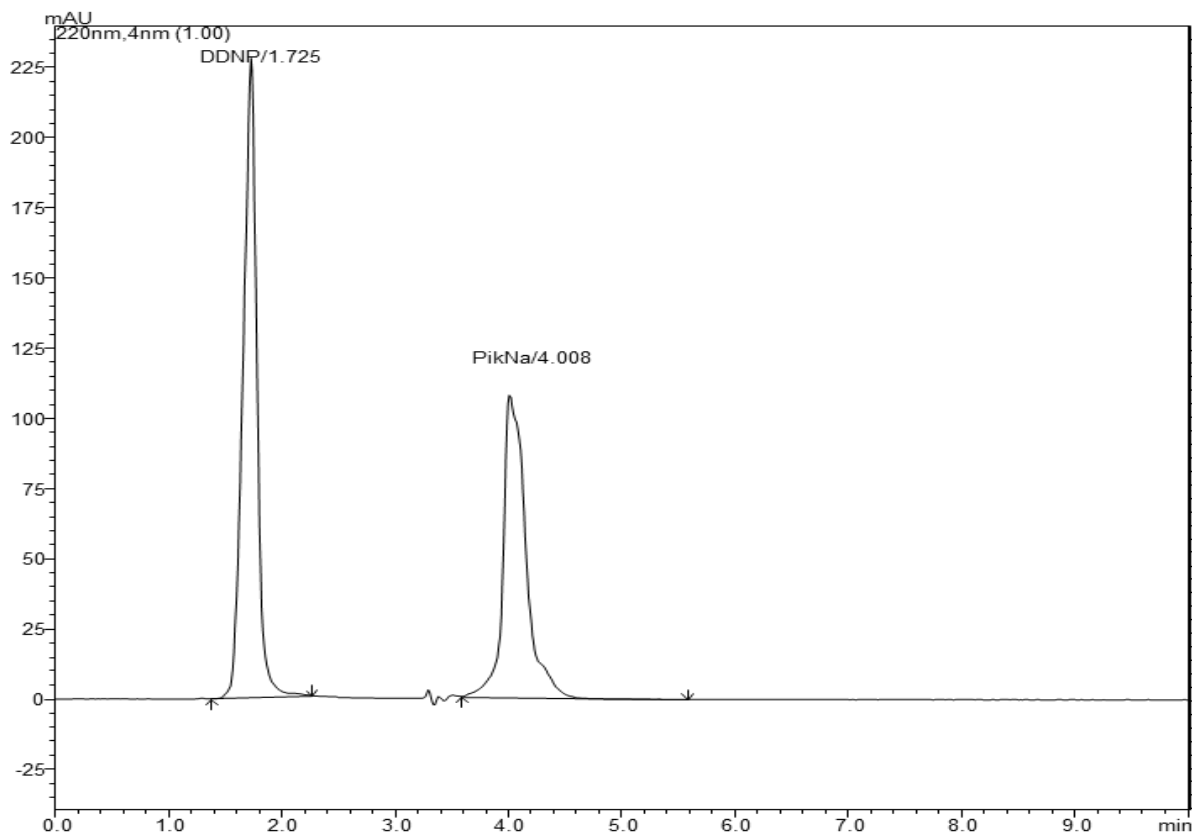
OBR.Č. 8- CHROMATOGRAM PRI POUŽITÍ KOLÓNY MONOLITH C18 10CM X 3MM

Kolóna – Zorbax® 25cm x 4,6mm; 5 µm častice

Mobilná fáza Pomer zložiek	Prietok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	t _r (PikNa) [min]	t _r (DDNP) [min]	Poznámky
H ₂ O/ACN 90/10	1	7,55	30	1,725	4,008	Obr.č.9
H ₂ O/ACN 85/15	1	7,55	30	1,741	3,769	
H ₂ O/ACN 80/20	1	7,55	30	1,773	3,696	

TABUĽKA 4 - TESTOVANÉ PODMINEKY A VÝSLEDKY PRE KOLÓNU ZORBAX® 25CM X 4,6MM; 5 µM ČASTICE

Testovanie kolónou Zorbax® bolo pri pomere zložiek MF 90/10 veľmi uspokojujúce. Látky sa správne separovali a aj retenčné časy boli optimálne (obr.č. 9). Avšak pri znižovaní obsahu vody v MF, začal pík DDNP zhoršovať svoju symetriu.



OBR.Č. 9 - CHROMATOGRAM PRI POUŽITÍ KOLÓNY ZORBAX® 25CM X 4,6MM; 5 µM ČASTICE

Kolóna – Discovery® CYANO 10cm x 4mm; 5 µm častice

Mobilná fáza Pomer zložiek	Prietok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	t _{r(PikNA)} [min]	t _{r(DDNP)} [min]	Poznámky
H ₂ O/ACN 90/10	1	5,5	30	2,052	2,615	
H ₂ O/ACN 80/20	1	5,5	30	1,758	1,977	
H ₂ O/ACN 70/30	1	5,5	30	1,854	2,009	

TABUĽKA 5 - TESTOVANÉ PODMIENKY A VÝSLEDKY PRE KOLŔNU DISCOVERY® CYANO 10CM X 4MM; 5 µM ČASTICE

Použitím kolóny Discovery® CYANO za podmienok hore uvedených sme síce dosiahli rýchle retenčné časy ale rozlíšenie píkov nebolo vôbec dostatočné.

Kolóna – Gemini C18 5cm x 3mm; 3 µm častice

Mobilná fáza Pomer zložiek	Prietok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	t _{r(PikNA)} [min]	t _{r(DDNP)} [min]	Poznámky
H ₂ O/ACN 90/10	1	13,2	30	-	1,655	
H ₂ O/ACN 80/20	1	13,3	30	-	1,641	

TABUĽKA 6 - TESTOVANÉ PODMIENKY A VÝSLEDKY PRE KOLŔNU GEMINI C18 5CM X 3MM; 3 µM ČASTICE

Pri analýze vzorku sa eluoval len pík DDNP a ani pri zmene podmienok neprišlo k zlepšeniu. Preto táto kolóna nebude zohľadnená v záverečnom výbere.

Kolóna – Ascentis® Express RP-AMIDE 10cm x 3mm; 2,7 µm častice

Mobilná fáza Pomer zložiek	Prietok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	t _{r(PikNA)} [min]	t _{r(DDNP)} [min]	Poznámky
H ₂ O/ACN 90/10	0,8	22,5	30	1,899	2,334	
H ₂ O/ACN 80/20	0,8	22,5	30	1,264	1,627	
H ₂ O/ACN 70/30	0,8	19,5	30	1,344	1,833	

TABUĽKA 7 - TESTOVANÉ PODMIENKY A VÝSLEDKY PRE KOLŔNU ASCENTIS® EXPRESS RP-AMIDE 10CM X 3MM; 2,7 µM ČASTICE

Testovanie tejto kolóny za uvedených podmienok nespĺňovalo podmienky pre optimálnu analýzu. Symetria píku PikNa nebola dostatočná.

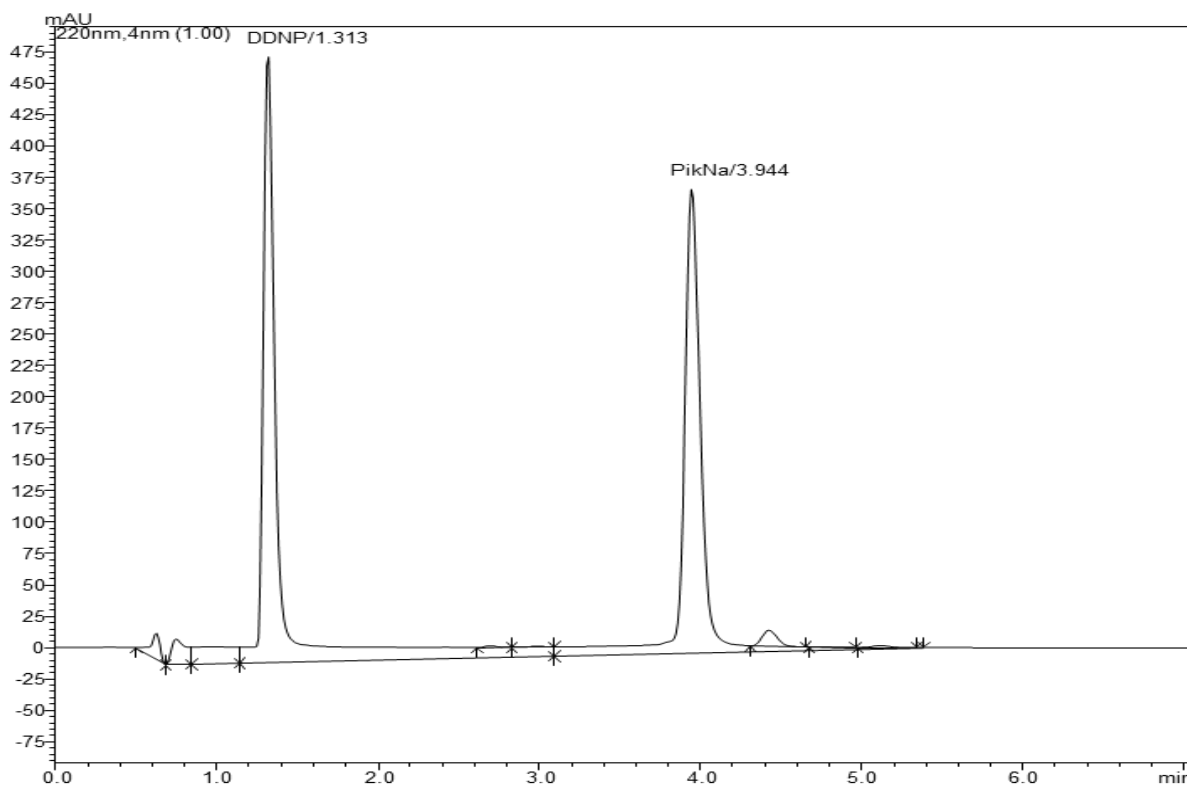
Pre ďalšie testovanie sme sa rozhodli, že vodnú fázu okyslíme H_3PO_4 na pH 2,3, jedna sa teda o 0,085% kyselinu fosforečnú a pomer zložiek MF bude primárne 70/30 v prospech vodnej časti a spätne vyskúšame znova už testované kolóny, ktoré predtým poskytovali neuspokojivé výsledky a ďalšie, ktoré sme ešte netestovali. Elučný poriadok sa po okyslení mobilnej fázy zmenil.

Kolóna – Ascentis® Express C18 10cm x 3mm; 2,7 μ m častice

Mobilná fáza Pomer zložiek	Prietok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	$t_{r(PikNa)}$ [min]	$t_{r(DDNP)}$ [min]	Poznámky
0,085% H_3PO_4/ACN 70/30	0,8	27	30	3,944	1,313	Obr. č.10

TABULKA 8 - TESTOVANÉ PODMIENKY A VÝSLEDKY PRE KOLÓNU ASCENTIS® EXPRESS C18 10CM X 3MM; 2,7 μ M ČASTICE

Skúšaná kolóna spĺňala všetky požiadavky na optimálnu analýzu DDNP spolu s PikNa.



OBR.Č. 10 - CHROMATOGRAM PRI POUŽITÍ KOLÓNY ASCENTIS® EXPRESS C18 10CM X 3MM; 2,7 μ M ČASTICE

Kolóna – Monolith 10cm x 3mm

Mobilná fáza Pomer zložiek	Prietok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	$t_{r(\text{PikNA})}$ [min]	$t_{r(\text{DDNP})}$ [min]	Poznámky
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 70/30	1	5	30	0,692	-	

TABUĽKA 9 - TESTOVANÉ PODMINEKY A VÝSLEDKY PRE KOLÓNU MONOLITH 10CM X 3MM

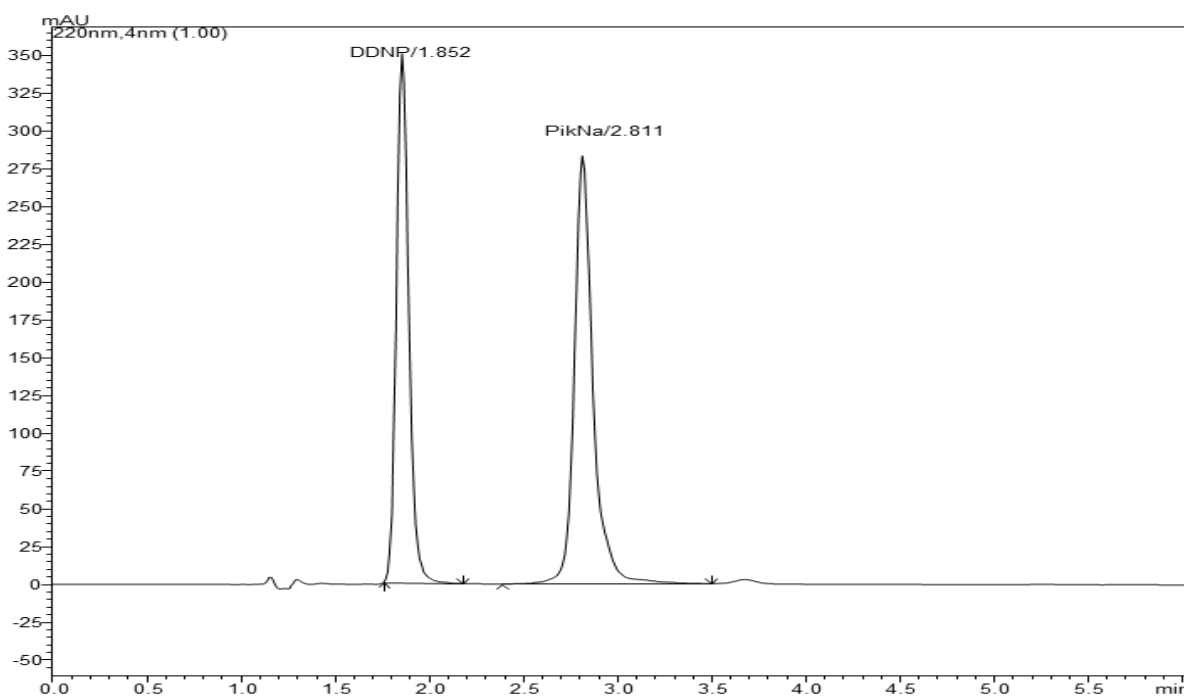
Testovanie tejto kolóny neprinieslo ani po zmene podmienok dobré retenčné časy ale naopak došlo k ich zhoršeniu a eluovaniu len jedného píku.

Kolóna – Discovery® CYANO 10cm x 4mm; 5 μm častice

Mobilná fáza Pomer zložiek	Prietok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	$t_{r(\text{PikNA})}$ [min]	$t_{r(\text{DDNP})}$ [min]	Poznámky
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 70/30	1	5	30	2,811	1,852	Obr.č.11

TABUĽKA 10 - TESTOVANÉ PODMINEKY A VÝSLEDKY PRE KOLÓNU DISCOVERY® CYANO 10CM X 4MM; 5 μM ČASTICE

Elúcia pri daných podmienkach prebiehala rýchlo a rozlíšenie píkov bolo úplne. Daná kolóna pri týchto podmienkach bude teda zohľadnená pri konečnom výbere.



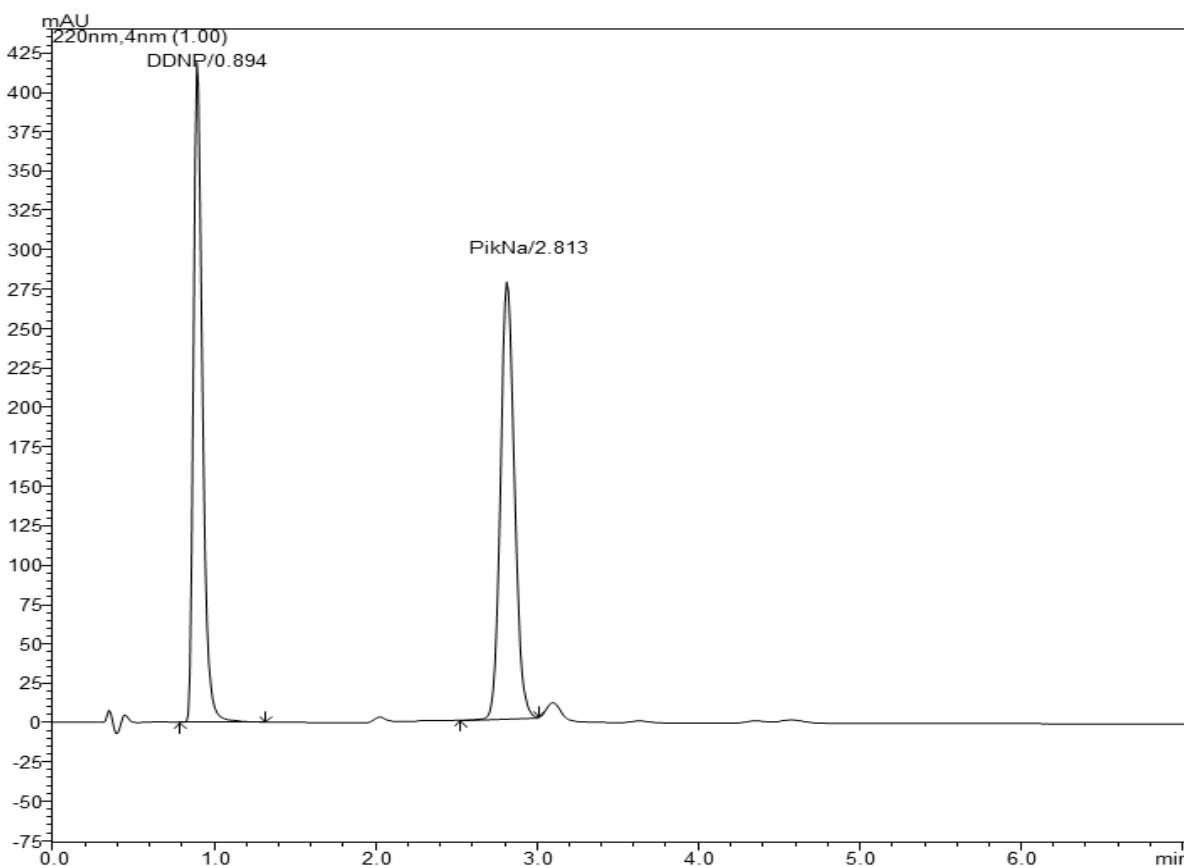
OBR.Č. 11 - CHROMATOGRAM PRI POUŽITÍ KOLÓNY DISCOVERY® CYANO 10CM X 4MM; 5 μM ČASTICE

Kolóna – Gemini C18 5cm x 3mm; 3 µm častice

Mobilná fáza Pomer zložiek	Prietok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	$t_{r(\text{PikNa})}$ [min]	$t_{r(\text{DDNP})}$ [min]	Poznámky
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 70/30	1	14	30	2,813	0,894	Obr.č.12

TABUĽKA 11 - TESTOVANÉ PODMINEKY A VÝSLEDKY PRE KOLÓNU GEMINI C18 5CM X 3MM; 3 µM ČASTICE

Testovanie tejto kolóny pri zvolených podmienkach prebehlo úspešne. Jediným nedostatkom by mohla byť rýchla elúcia DDNP a koelúcia pravdepodobne nečistoty alebo rozkladného produktu s PikNa.



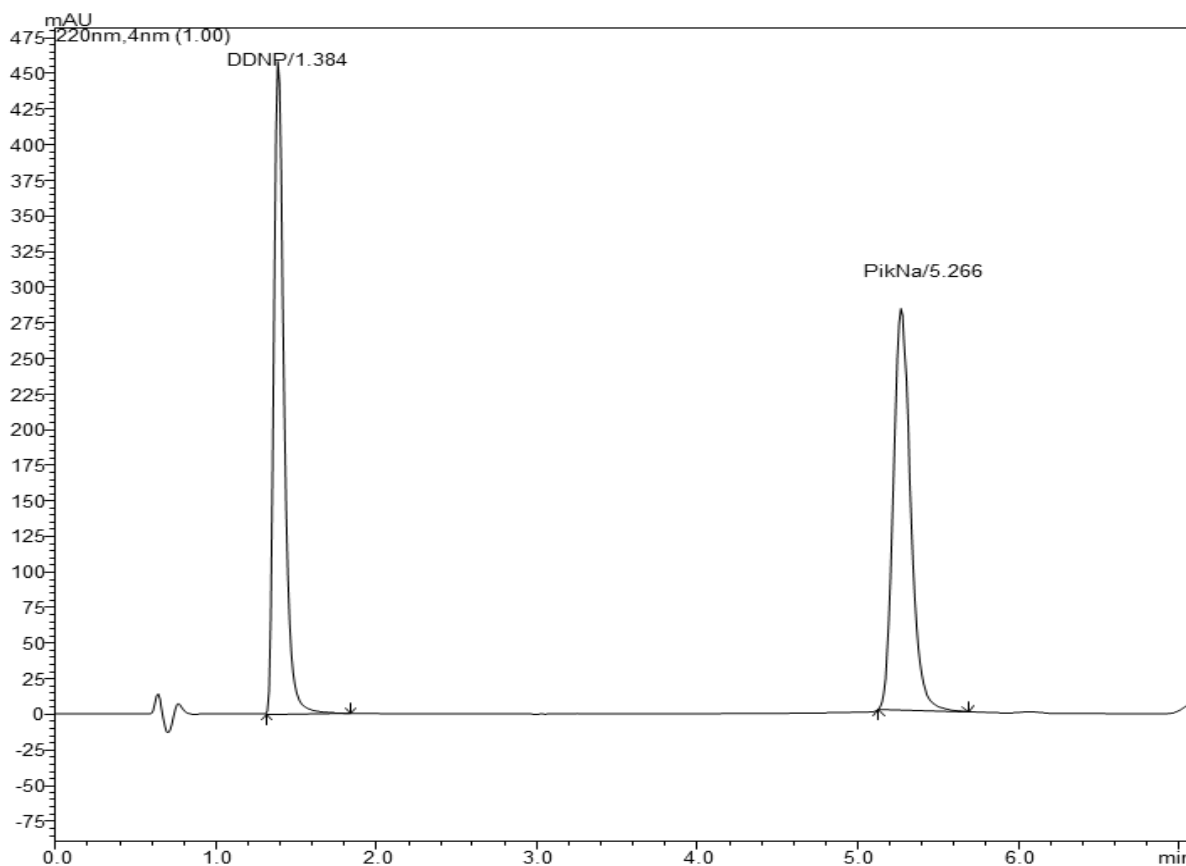
OBR.Č. 12 - CHROMATOGRAM PRI POUŽITÍ KOLÓNY GEMINI C18 5CM X 3MM; 3 µM ČASTICE

Kolóna – Ascentis® Express RP-AMIDE 10cm x 3mm; 2,7 µm častice

Mobilná fáza Pomer zložiek	Prietok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	$t_{r(\text{PikNa})}$ [min]	$t_{r(\text{DDNP})}$ [min]	Poznámky
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 90/10	0,8	22,5	30			
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 80/20	0,8	22,5	30	1,690	3,339	
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 70/30	0,8	19,5	30	5,266	1,384	Obr.č.13

TABUĽKA 12 - TESTOVANÉ PODMINEKY A VÝSLEDKY PRE KOLÓNU ASCENTIS® EXPRESS RP-AMIDE 10CM X 3MM; 2,7 µM ČASTICE

Znovu testovanie tejto kolóny pri zmenených podmienkach už došlo k odseparovaniu oboch píkav ale len pri pomere zložiek MF 70/30. Zvyšné dve pomery neposkytovali uspokojujúce výsledky.



OBR.Č. 13 CHROMATOGRAM PRI POUŽITÍ KOLÓNY ASCENTIS® EXPRESS RP-AMIDE 10CM X 3MM; 2,7 µM ČASTICE

Kolóna – Phenomenex Synergi Polar-RP 7,5cm x 3mm; 4 µm častice

Mobilná fáza Pomer zložiek	Prietok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	$t_{r(\text{PikNA})}$ [min]	$t_{r(\text{DDNP})}$ [min]	Poznámky
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 70/30	1	8	30	4,325	1,845	

TABUĽKA 13 - TESTOVANÉ PODMINEKY PRE KOLÓNU PHENOMENEX SYNERGI POLAR-RP 7,5CM X 3MM; 4 µM ČASTICE

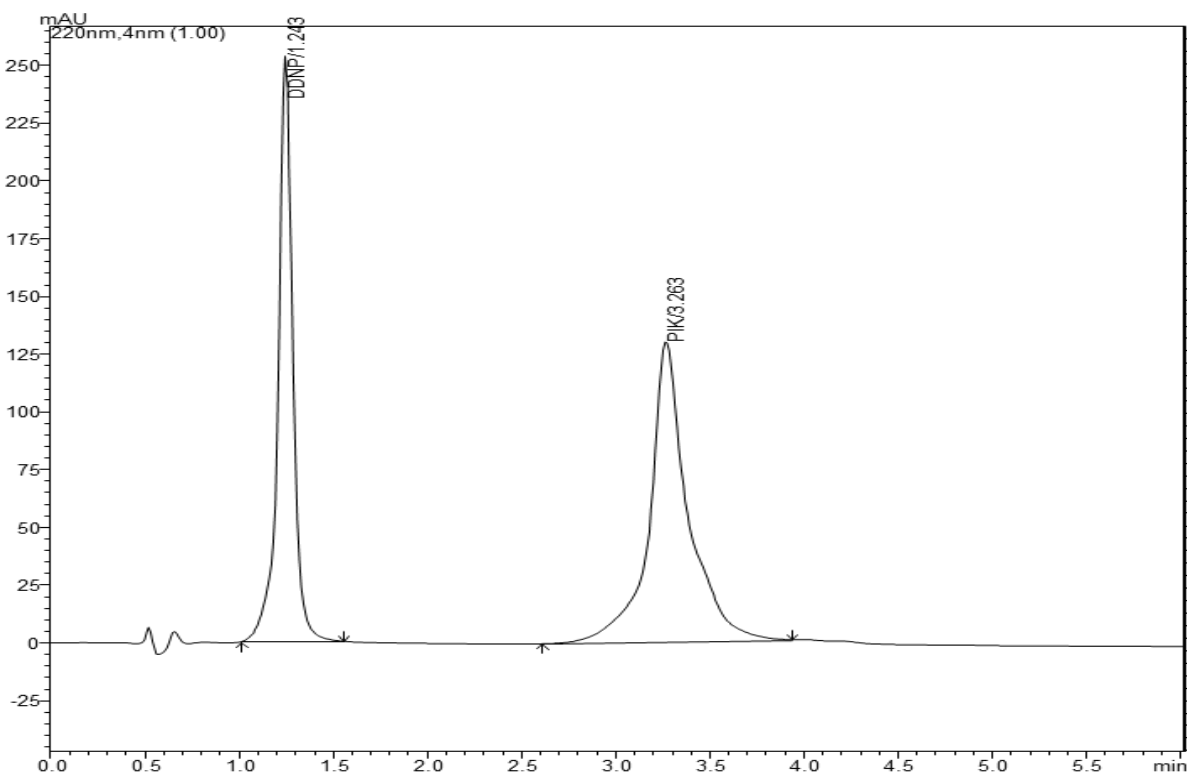
Testovanie kolóny bolo síce rýchle ale oba píky chvostovali, z tohto dôvodu nie sú tieto podmienky vhodné na analýzu.

Kolóna – Synergi Fusion RP-80 7,5cm x3mm; 4 µm častice

Mobilná fáza Pomer zložiek	Prietok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	$t_{r(\text{PikNA})}$ [min]	$t_{r(\text{DDNP})}$ [min]	Poznámky
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 70/30	1	8	30	3,263	1,243	Obr.č.14

TABUĽKA 14 / TESTOVANÉ PODMINEKY A VÝSLEDKY PRE KOLÓNU SYNERGI FUSION RP-80 7,5CM X3MM; 4 µM ČASTICE

Skúška tejto kolóny bola pri daných podmienkach úspešná a splňala všetky požiadavky avšak symetria píku PikNa nebola dostatočná. Preto tieto podmienky nie sú ideálna pre túto analýzu.



OBR.Č. 14 - CHROMATOGRAM PRI POUŽITÍ KOLÓNY SYNERGI FUSION RP-80 7,5CM X3MM; 4 µM ČASTICE

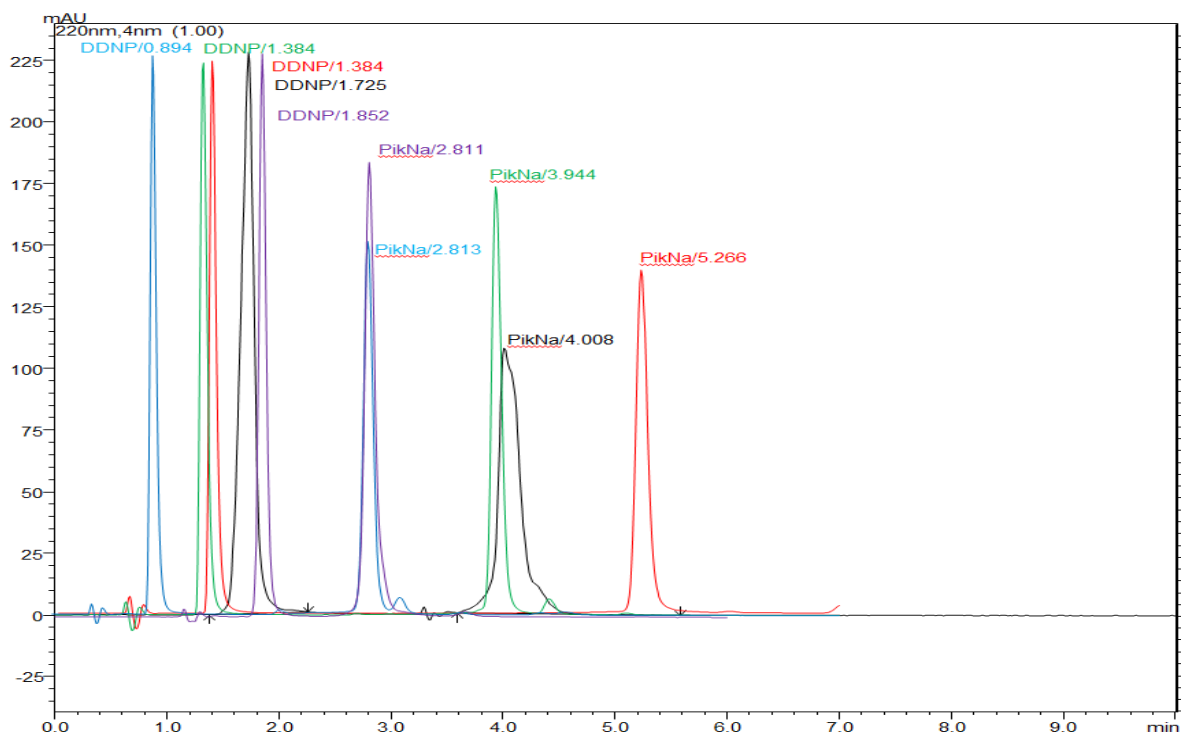
Kolóna – Ascentis® Express C18 3cm x 4,6mm; 2,7 µm častice

Mobilná fáza Pomer zložiek	Prietok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	t _r (PikNA) [min]	t _r (DDNP) [min]	Poznámky
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 80/20	1	8,5	30	-	-	
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 90/10	1	8,5	30	-	-	
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 85/15	1	8	30	1,187	5,553	

TABUĽKA 15 - TESTOVANÉ PODMIENKY PRE KOLÓNU ASCENTIS® EXPRESS C18 3CM X 4,6MM; 2,7 µM ČASTICE

Pri všetkých pomeroch MF sa eluoval len jeden pik. Preto táto kolóna nie je vhodná na analýzu týchto látok.

Bolo vyskúšaných spolu 10 kolón pri použití dvoch rozdielnych MF. Prv sme použili vodu s acetonitrilom, pri týchto podmienkach len jediná kolóna, **Zorbax® 25cm x 4,6mm; 5 µm častice** bola vhodná. Po zmene zloženia MF, kedy sme vodu okyslili kyselinou fosforečnou na pH=2,3 a znovuotestovaní niektorých kolón, podmienky na optimálnu analýzu splnili ďalšie 4 kolóny, **Ascentis® Express C18 10cm x 3mm; 2,7 µm častice**; **Discovery® CYANO 10cm x 4mm; 5 µm častice**; **Gemini C18 5cm x 3mm; 3 µm častice** a **Ascentis® Express RP-AMIDE 10cm x 3mm; 2,7 µm častice**.



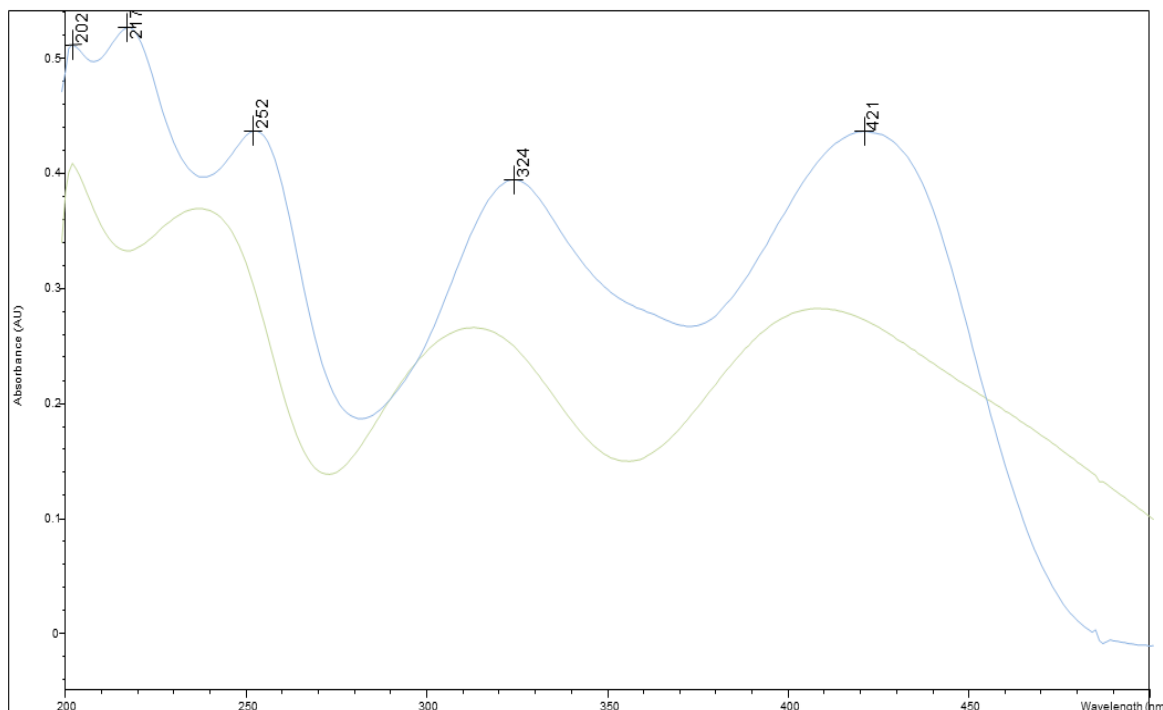
OBR.Č. 15 - POROVNANIE VÝSLEDKYCH CHROMATOGRFICKÝCH ZÁZNAMOV

Aby sme si uľahčili výber optimálnej kolóny, preložil som cez seba chromatogramy jednotlivých analýz. Na základe týchto výsledkov je viditeľné, že u kolóny Zorbax® symetria píku PikNa nie je ideálna. Analýza u kolóny Ascentis® Express RP-AMIDE trvá o niečo dlhšie ako u zvyšných kolón. Pík DDPN u kolóny Gemini C18 eluuje príliš blízko mŕtvemu objemu MF. Analýza u kolóny Discovery® CYANO trvala síce prijateľnú dobu no píky jednotlivých látok sú relatívne blízko u seba. Preto ako optimálna kolóna bola vybraná Ascentis® Express C18 10cm x 3mm; 2,7 µm častice, u ktorej analýza je prijateľne dlhá, symetria oboch píkov taktiež dobrá a aj rozlíšenie píkov je úplné na základnú líniu.

Zloženie mobilnej fázy sme ďalej nemenili keďže sa javilo ako vhodné použitie 0,085% kyseliny fosforečnej a acetonitrilu v pomere 70/30.

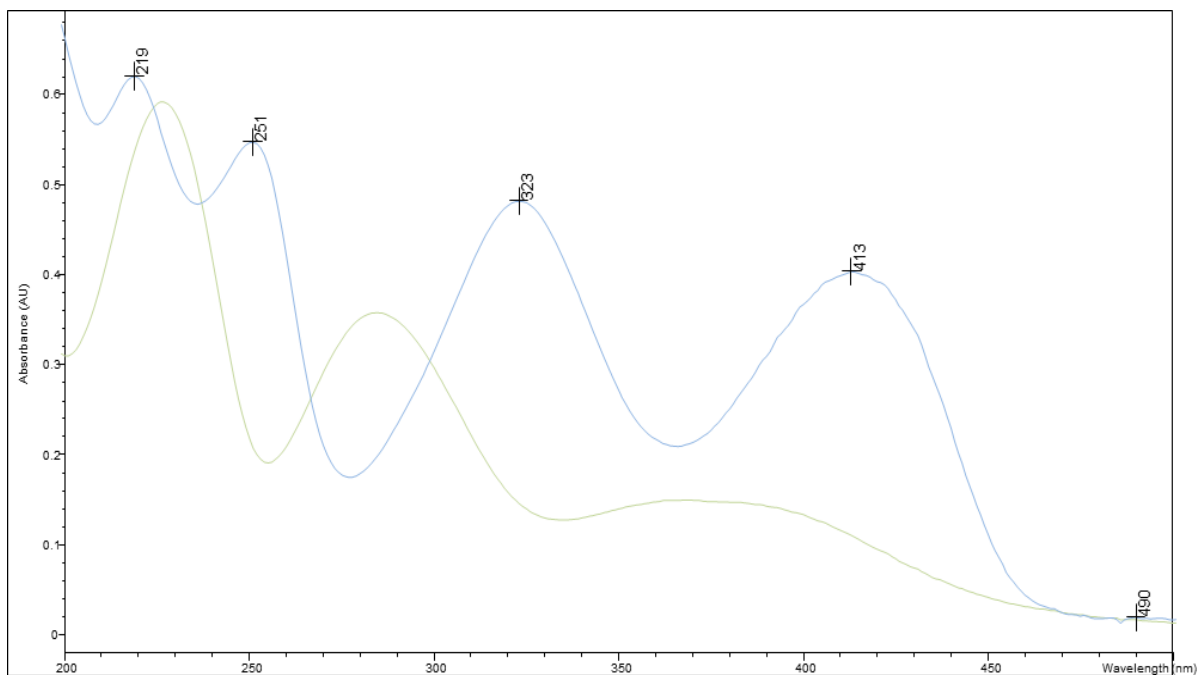
6.4.2. OPTIMALIZÁCIA VLNOVEJ DĹŽKY

Primárne bol detektor nastavený na 254 nm čo nám poskytovalo dobré výsledky ale pre úplnosť optimalizácie sme sa rozhodli zmerať absorpčné spektrum a zistiť či niektoré iné vlnové dĺžky neposkytujú lepšie výsledky. Bolo zmerané absorpčné spektrum zmeny DDPN a PikNa v MeOH.



GRAF 1 ZÁVISLOTI ABSORBANCIE DDPN(MODROU) A PIKNA(ZELENOU) NA VLNOVEJ DĹŽKE V MEOH

Následne sme sa rozhodli ešte premerať absorbanciu zmesi látok v MF (0,085% H₃PO₄/ACN). Výsledne spektrum je zobrazené v grafe č.2



GRAF 2 - ZÁVISLOSTI ABSORBANCIE DDPN(MODROU) A PIKNA(ZELENOU) NA VLNOVEJ DLŽKE V MF

Je viditeľné zvýšenie absorbcie PikNa pri 230 nm, krivka DDPN ostala v prevažnej miere nezmenená. Preto bolo rozhodnuté, že ďalšia optimalizáciu bude prebiehať pri 220 nm.

6.4.3. OPTIMALIZÁCIA TEPLoty

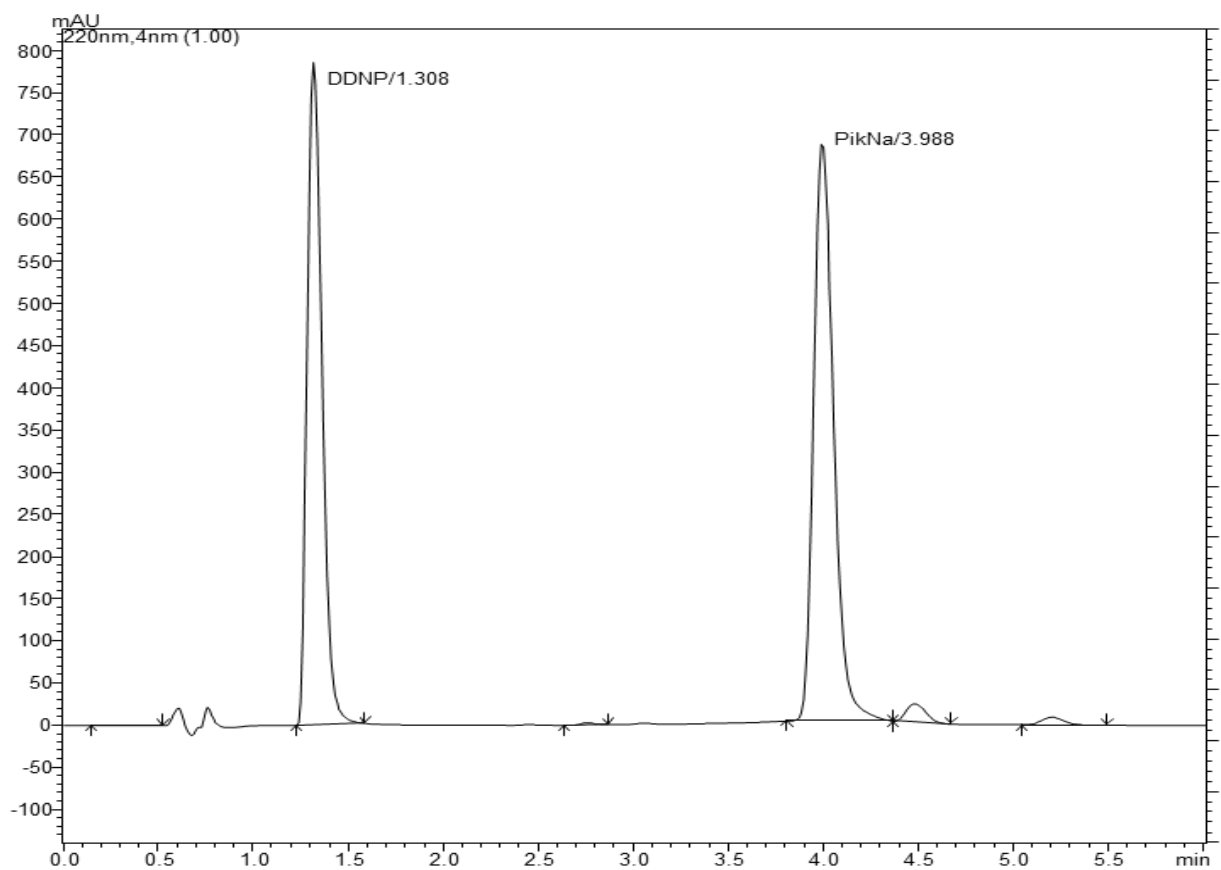
Pre vybranú kolónu boli zmerané retenčné časy DDPN a PikNa v závislosti na teplote v rozmedzí 20°C až 60°C aby sme zistili optimálnu pre ďalšiu validáciu. V tabuľke sú sumarizované namerané retenčné časy jednotlivých látok. Z nej je jasne vidno tendenciu $t_{r(\text{PIKNA})}$ a $t_{r(\text{DDNP})}$ znižovať sa. Z toho dôvodu bola zvolená teplota 50°C, teplota 60°C nebola zvolená preto, že sa jedná o limitnú hodnotu pre túto kolónu (24).

Teplota [°C]	$t_{r(\text{PIKNA})}$ [min]	$t_{r(\text{DDNP})}$ [min]
20	5,699	3,059
30	4,907	2,329
40	4,223	1,887
50	3,999	1,322
60	3,310	1,024

TABUĽKA 16 - OPTIMALIZÁCIA TEPLoty

6.4.4. SÚHRN CHROMATOGRAFICKÝCH PODMIENOK

Chromatograf	Chromatografický systém Shimadzu
Detektor	Shimadzu SPAD-M10 AVP
Kolóna	Ascentis® Express C18 10cm x 3mm; 2,7 µm častice
Dávkovanie	5 µl
Detekcia	UV, 220 nm
Mobilná fáza	0,085% kyselina fosforečná/acetonitril v pomere 70/30
Typ elúcie	Izokratická
Prietok	0,8 ml/min
Teplota	50 °C
Čas analýzy	4,5 min



OBR. Č. 16 - CHROMATOGRFICKÝ ZÁZNAM PRI OPTIMÁLNYCH PODMIENKACH

6.5. TEST VHODNOSTI CHROMATOGRAFICKÉHO SYSTÉMU

6.5.1. POČET TEORETICKÝCH PRIEHRADIEK (N)

Účinnosť kolóny bola overená premeraním pracovných roztokov na opakovateľnosť o koncentrácii 150 mg/l.

Účinnosť chromatografickej kolóny bola vypočítaná podľa vzorca dole uvedeného z priemeru troch za sebou idúcich meraní.

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

t_R retenčný čas

w_h šírka píku v polovici jeho výšky

Analyzovaná látka	t_R [min]	w_h [min]	N
DDNP	1,3423	0,081	1521
PikNa	4,0152	0,112	7120

6.5.2. FAKTOR SYMETRIE PÍKU

Faktor symetrie označuje rovnomernosť píku až na základnú líniu. Vypočítaný bol podľa vzorca a z hodnôt získaných pri testoch na opakovateľnosť.

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

$w_{0,05}$ šírka píku v 1/20 jeho výšky

d vzdialenosť medzi kolmicou spustenou zo stredu vrcholu píku a vzostupnou časťou v 1/20 jeho výšky

Analyzovaná látka	$w_{0,05}$	d	A_s
DDNP	0,177	0,058	1,506
PikNa	0,236	0,094	1,247

6.5.3. ROZLIŠENIE CHROMATOGRAFICKÝCH PÍKOV

Rozlíšenie chromatografických píkov bol vypočítane z hodnôt získaných pri meraní na opakovateľnosť podľa vzorca:

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

t_{R1} a t_{R2} retenčné časy dvoch susedných píkov

w_{h1} a w_{h2} šírky píkov v polovičnej výške

Hodnotené látky	R_s
DDNP - PikNa	5,546

Hodnoty väčšie ako 1,5 zodpovedá rozlíšeniu píkov až na základnú líniu.

6.6. VALIDÁCIA ANALYTICKEJ METÓDY

6.6.1. LINEARITA

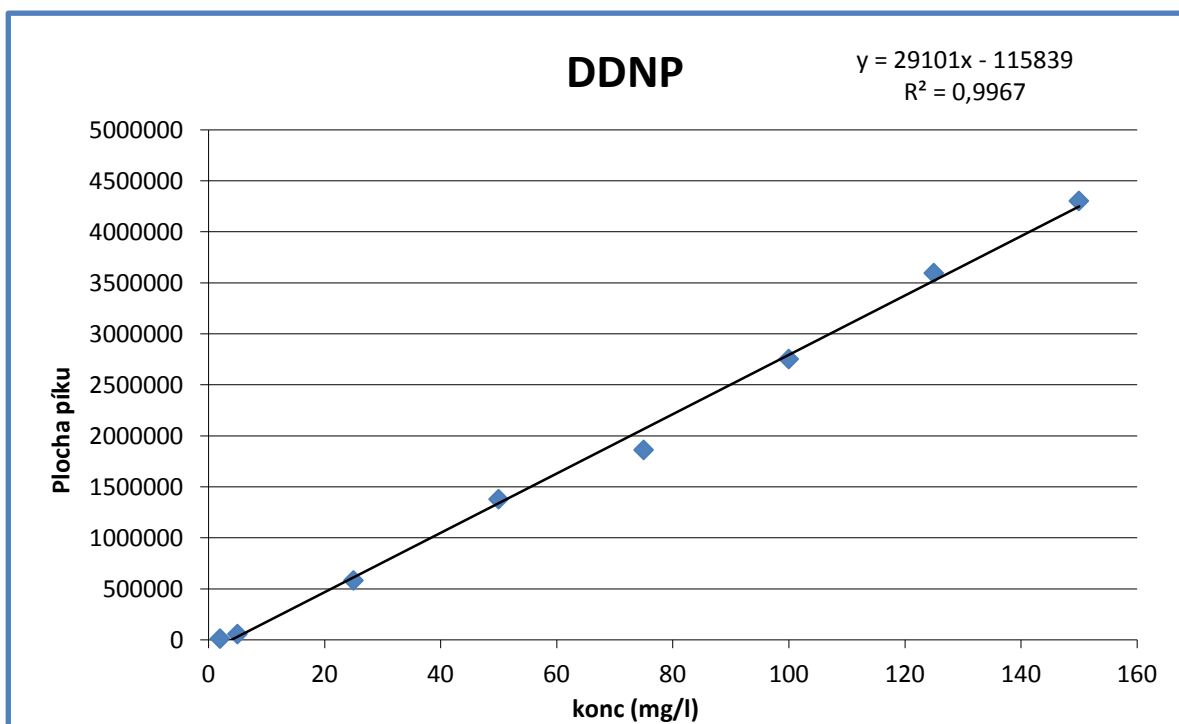
Bola použitá metóda absolútnej kalibrácie. Pripravených bolo 8 pracovných roztokov pre kalibráciu o rozdielnej koncentrácii (príprava popísaná v kapitole 6.2 Príprava Roztokov). U každého z nich boli prevedené 3 merania, ktoré sa následne spriemerovali. Závislosť priemerných plôch píkov roztokov pre kalibráciu na ich koncentrácii bola vyhodnotená metódou lineárnej regresie.

konc (mg/l)	DDNP	
	plocha píku	priemer
150	4314465	4304042
	4302368	
	4295293	
125	3607808	3596619
	3597560	
	3584490	
100	2764396	2754156
	2753311	
	2744761	
75	1864406	1863561
	1864525	
	1861751	
50	1382067	1380617
	1381973	
	1377810	
25	584883	584217
	585030	
	582738	
5	57113	58098
	57503	
	59678	
2	13055	13552
	13978	
	13623	

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$

Počet bodů	n = 8	Odhad chyby
Směrnice	k = 29100,71 ± 680,6115	
Abs. člen	q = -115839,5 ± 57401,83	
Korelační koef.	r = 0,998363	
Reziduální odch.	s = 99857,57	

TABUĽKA 17 - HODNOTY PRE VÝPOČET KALIBRAČNEJ KRIVKY DDNP



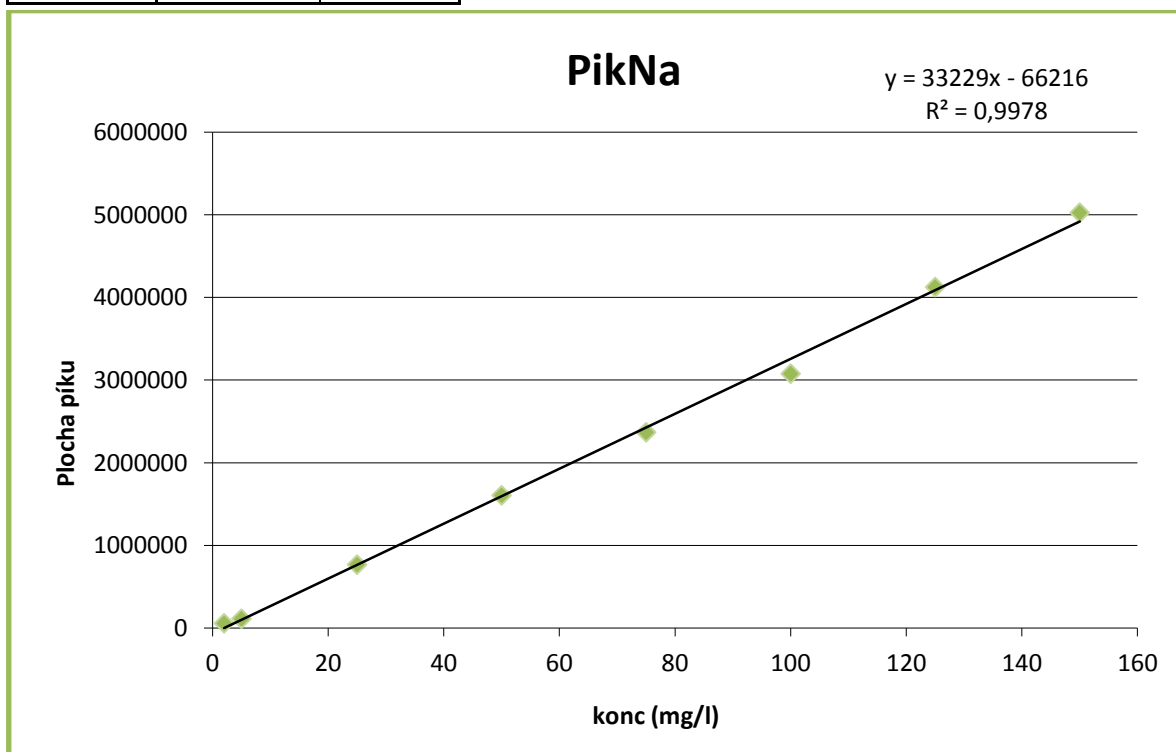
GRAF 3 - KALIBRAČNÁ KRIVKA DDNP

konc (mg/l)	PikNa	
	plocha píku	priemer
150	5040296 5025377 5014636	5026770
125	4127117 4148272 4104479	4126623
100	3095315 3067185 3073237	3078579
75	2364116 2370731 2373527	2369458
50	1609161 1602549 1608424	1606711
25	772081 768360 764888	768443
5	112980 112975 114075	113343,3
2	57847 58925 57864	58212

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$

Počet bodů	n = 8	Odhad chyby
Směrnice	k = 33229,08	± 634,1582
Abs. člen	q = -66216,26	± 53484,01
Korelační koef.	r = 0,998909	
Reziduální odch.	s = 93042,05	

TABUĽKA 18 - HODNOTY PRE VÝPOČET KALIBRAČNEJ KRIVKY PIKNA



GRAF 4 - KALIBRAČNÁ KRIVKA PIKNA

6.6.2. OPAKOVATELNOSŤ

Pri testoch na opakovateľnosť bola meraná tesnosť zhody 6 po sebe idúcich meraní pri koncentráciách 150mg/l, 75mg/l a 2 mg/l. Roztoky boli 6 krát nadávkované na kolónu z výsledných plôch píkov boli vypočítané relatívne smerodajné odchýlky pre DDNP a PikNa samostatne.

c (mg/l)	DDNP			
	plocha	priemer	SD	RSD (%)
150	4314465			
	4302368			
	4295293	4288455	18200	0,42
	4273773			
	4274585			
	4270246			
75	1860891			
	1874575			
	1871591	1866290	5534	0,30
	1864406			
	1864525			
	1861751			
2	13545			
	13978			
	13623	13612	226	1,67
	13269			
	13639			
	13617			

TABUĽKA 19 - VÝSLEDKY TESTOV NA OPAKOVATELNOSŤ U DDNP

c(mg/l)	PikNa			
	plocha	priemer	SD	RSD (%)
150	5040296			
	5025377			
	5014636	4996589	34546	0,69
	4970290			
	4973053			
	4955885			
75	2323784			
	2330162			
	2354185	2352750	21145	0,90
	2364116			
	2370731			
	2373527			
2	57847			
	58925			
	57864	58303	532	0,91
	58653			
	57765			
	58768			

TABUĽKA 20 - VÝSLEDKY TESTOV NA OPAKOVATELNOSŤ U PIKNA

6.6.3. ROBUSTNOSŤ

Testovanie vplyvu premenných chromatografických podmienok na analýzu látok, bol skúšaný vplyv na retenčný čas a plochu píku DDNP a PikNa.

6.6.3.1. Vplyv teploty

Vplyv teploty bol testovaný pri hodnotách 40 °C, 60 °C a porovnaný s pôvodnou teplotou 50 °C. Každá teplota bola zmeraná 3 krát za podmienok zloženia mobilnej fázy 0,085% H₃PO₄/ACN v pomere 70/30 a prietoku 0,8 ml/min

a) Vplyv na plochu píkov bol vypočítaný podľa vzorca:

$$A_R = 100 \times \frac{A_i}{A_{50^\circ C}}, \text{ kde}$$

A_i plocha píku za testovaných podmienok

A_{50°C} plocha píku za štandardných podmienok

Boli získané výsledky, ktoré sú uvedené v tabuľke č.21 a 22. Z nich je viditeľné, že dochádza k malému zníženiu plochy u DDNP, naproti tomu je zníženie plochy PikNa pri 40 °C dosť viditeľné.

teplota	DDNP	
	A _i	Ar(%)
40°C	2328681	96,42
50°C	2414986	100,00
60°C	2356137	97,56

TABUĽKA 21 - VPLYV TEPLoty NA PLOCHU PÍKU DDNP

teplota	PikNa	
	A _i	Ar(%)
40°C	2442374	89,16
50°C	2739215	100,00
60°C	2862797	104,51

TABUĽKA 22 - VPLYV TEPLoty NA PLOCHU PÍKU PIKNA

b) Vplyv na retenčný čas bol vypočítaný podľa vzorca:

$$t_R = 100 \times \frac{t_{Ri}}{t_{R50^\circ C}}, \text{ kde}$$

t_{Ri} retenčný čas pri testovaných podmienkach

t_{R50°C} retenčný čas pri štandardných podmienkach

Získané výsledky sú uvedené v tabuľke č. 23 a 24. Z nameraných hodnôt je vidieť, spomalenie elúcie DDNP a PikNa pri 40 °C.

teplota	DDNP	
	t _{Ri}	t _R (%)
40°C	1,887	142,73
50°C	1,322	100,00
60°C	1,024	77,46

TABUĽKA 23 - VPLYV TEPLoty NA RETENČNÝ ČAS DDNP

teplota	PikNa	
	t _{Ri}	t _R (%)
40°C	4,225	105,65
50°C	3,999	100,00
60°C	3,310	82,77

TABUĽKA 24 - VPLYV TEPLoty NA RETENČNÝ ČAS PIKNA

6.6.3.2. Vplyv mobilnej fázy

Testovanie vplyvu zmeny pomeru zložiek zastúpených mobilnej fázy a to 0,085% H₃PO₄ a acetonitrilu v pomeroch 60/40 a 80/20. Každá mobilná fáza bola premeraná 3 krát po sebe.

a) Vplyv na plochu píkov :

$$A_R = 100 \times \frac{A_i}{A_{70/30}}, \text{ kde}$$

A_i plocha píku za testovaných podmienok

A_{70/30} plocha píku za štandardných podmienok

Získané výsledky sú zobrazené v tabuľke č. 25 a 26. Plochy píkov sú vzťahnuté k ploche píku za analyzovanej za štandardných podmienok, tj. 0,085% H₃PO₄/ACN v pomere 70/30 a teplote 50 °C a prietoku 0,8 ml/min.

Zmeny zloženia MF nepôsobili rozdiel plochy píkov u DDNP na rozdiel u PikNa, kde zmenšenie prípadne zväčšenie je už výrazné.

mobilná fáza	DDNP	
	A _i	Ar(%)
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 60/40	2450421	101,47
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 70/30	2414986	100,00
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 80/20	2368547	98,08

TABUĽKA 25 - VPLYV ZLOŽENIA MF NA PLOCHU PÍKU DDNP

mobilná fáza	PikNa	
	A _i	Ar(%)
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 60/40	3015673	110,09
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 70/30	2739215	100,00
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 80/20	2185445	79,78

TABUĽKA 26 - VPLYV ZLOŽENIA MF NA PLOCHU PÍKU PIKNA

b) Vplyv na retenčný čas:

$$t_R = 100 \times \frac{t_{Ri}}{t_{R70/30}}, \text{ kde}$$

t_{Ri} retenčný čas pri testovaných podmienkach

$t_{R70/30}$ retenčný čas pri štandardných podmienkach

Namerané výsledky sú uvedené v tabuľke č. 27 a 28. Z nich je viditeľné, že zvýšením obsahu ACN v MF dôjde k výraznému spomaleniu elúcie a predĺženiu analýzy.

mobilná fáza	DDNP	
	t_{Ri}	$t_R(\%)$
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 60/40	1,245	92,97
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 70/30	1,339	100,00
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 80/20	1,865	139,33

TABUĽKA 27 - VPLYV ZLOŽENIA MF NA RETENČNÝ ČAS DDNP

mobilná fáza	PikNa	
	t_{Ri}	$t_R(\%)$
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 60/40	3,011	74,62
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 70/30	4,035	100,00
0,085% H ₃ PO ₄ /ACN 80/20	8,021	198,76

TABUĽKA 28 - VPLYV ZLOŽENIA MF NA RETENČNÝ ČAS PIKNA

6.6.4. STABILITA

Stabilitu látky definujeme ako vlastnosť zachovať si v stanovených medziach za určitých podmienok akostné znaky a to všetko počas určitej doby. Stabilitné testy môžeme rozdeliť na stresové, zrýchlene a dlhodobé testy podľa podmienok záťaže (25).

Naše látky sme testovali na stresové testy, ktoré simulujú extrémne výrobné, skladovacie a iné podmienky. DDNP a PikNa boli vystavené rôznym chemickým či fyzikálnym vplyvom. Prípadne degradačné produkty sme ďalej už neidentifikovali.

Obe látky sme podrobili rovnakým testom, analýza prebiehala za podmienok optimalizovaných a validovaných v prechádzajúcich kapitolách. Výsledky sme vyhodnocovali porovnaním plôch pík nameraných a plochy píku pri prvom meraní alebo s plochou štandardného roztoku pri testoch na fotostabilitu.

Pri stabilitných testoch sme skúmali:

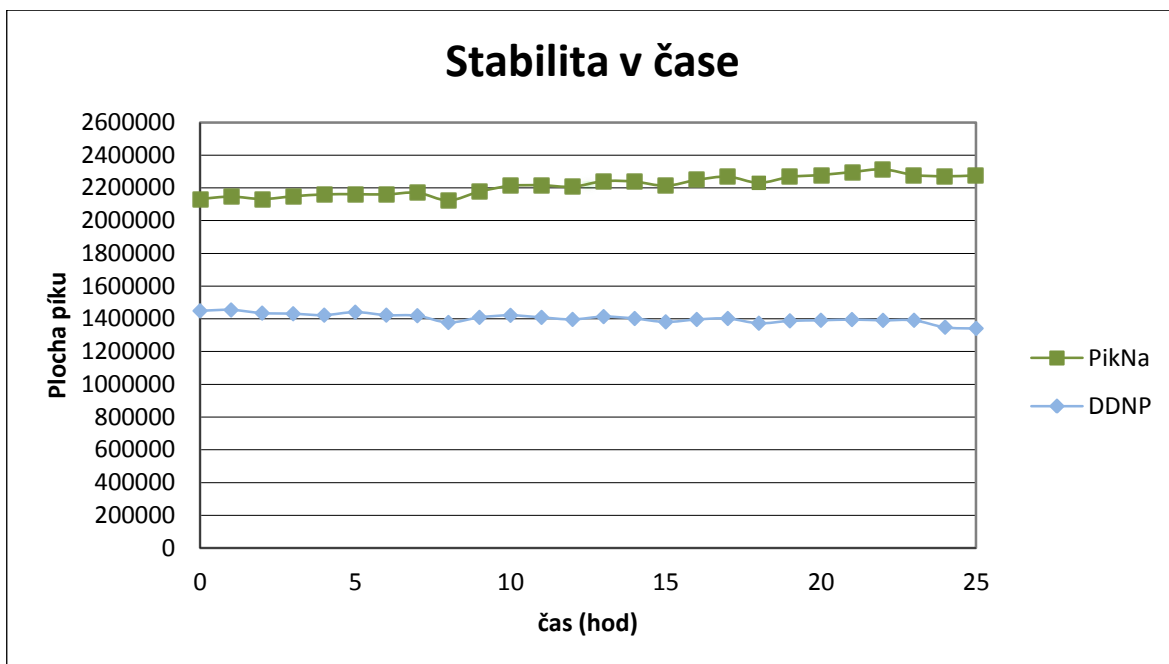
- Stabilitu DDNP a PikNa počas 24 hod pri izbovej teplote v roztoku MeOH ako základného rozpúšťadla pri HPLC stanovení
- Stabilitu vo vode
- Stabilitu za zvýšenej teploty, pri 50 °C po 24 hod
- Fotostabilitu po 24 hod
- Vplyv oxidačných činidiel – 0,1% a 0,01% H₂O₂
- Vplyv pH – kyslého prostredia 1M HCl a zasadiťého prostredia 0,1M NaOH
-

6.6.4.1. Stabilita v čase

Navážky 2,30 mg DDNP a 2,08 mg PikNa sme rozpustili osobitne v dvoch vialkach v 2 ml MeOH. Následne sme ich uložili v autosamplery a nastavili automatickú analýzu každú hodinu po dobu 24 hod. Hodinové výsledky plôch pík sme dali do pomeru s píkom v čase t=0 aby sme získali percentuálny prehľad vzostupu prípadne poklesu.

čas (hod)	plocha DDNP	v %	plocha PikNa	v %
0	1448688	100	2132238	100
1	1453943	100,36	2146607	100,67
2	1434853	99,04	2131724	99,98
3	1430849	98,77	2148510	100,76
4	1422454	98,19	2160123	101,31
5	1440584	99,44	2161432	101,37
6	1422454	98,19	2160123	101,31
7	1418965	97,95	2170331	101,79
8	1377624	95,09	2123285	99,58
9	1408861	97,25	2177332	102,11
10	1421076	98,09	2212112	103,75
11	1408843	97,25	2215832	103,92
12	1396437	96,39	2206651	103,49
13	1413533	97,57	2240885	105,10
14	1401997	96,78	2238033	104,96
15	1381309	95,35	2212741	103,78
16	1396078	96,37	2248336	105,44
17	1402119	96,79	2268403	106,39
18	1373045	94,78	2230714	104,62
19	1387559	95,78	2266620	106,30
20	1391125	96,03	2278626	106,87
21	1395555	96,33	2296724	107,71
22	1390753	96,00	2313207	108,49
23	1391125	96,03	2278626	106,87
24	1348756	93,10	2270772	106,50
25	1341321	92,59	2275928	106,74

TABUĽKA 29 - STABILITA DDNP A PIKNA V ČASE



GRAF 5 ZÁVISLOTI PLOCHY PÍKU DDNP A PIKNA NA ČASE.

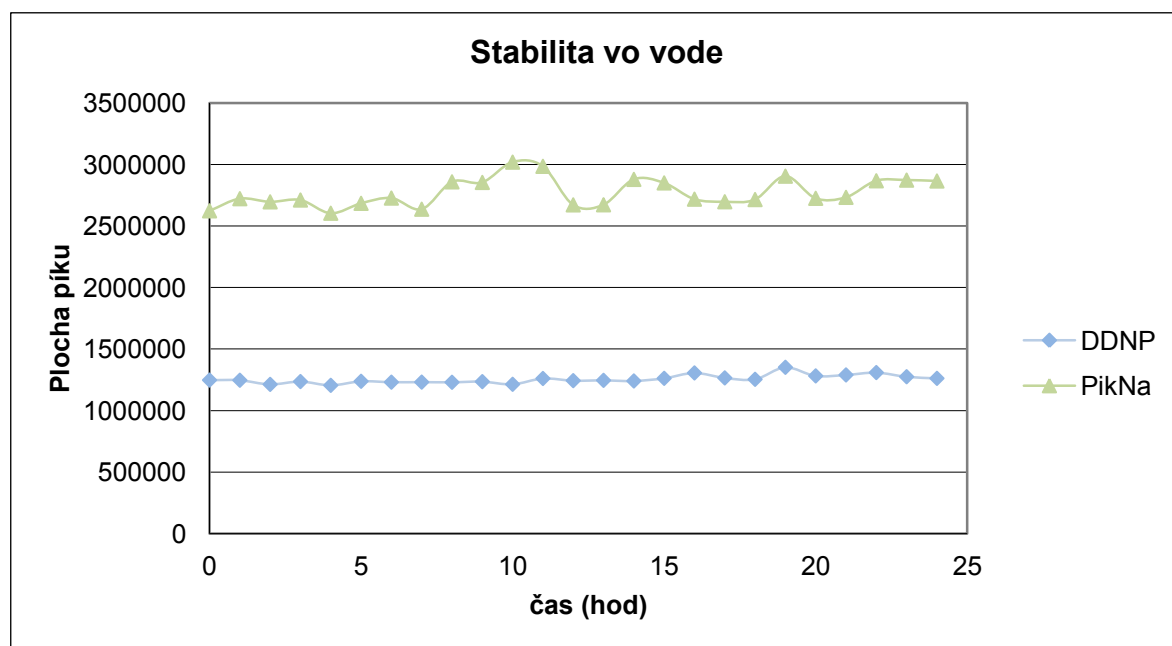
Z tabuľky a grafu je vidieť, že obsah DDNP poklesol o necelých 8% a obsah PikNa zase stúpol, môžeme teda špekulovať či sa DDNP spätne rozložilo na PikNa ako jednu zo svojich východných látok. Na preukázanie tohto tvrdenia sú potrebné ďalšie testy.

6.6.4.2. Stabilita vo vode

Testovanie stability vo vode prebiehalo rovnako ako predchádzajúce s tým rozdielom, že miesto MeOH sme použili vodu. Nové navažky boli $m_{DDNP}=1,05$ mg a $m_{PIKNa}=1,09$ mg.

čas (hod)	DDNP	v %	PIKR	v %
0	1247734	100,00	2623388	100,00
1	1246619	99,91	2722193	103,77
2	1212817	97,20	2696380	102,78
3	1235904	99,05	2711246	103,35
4	1205140	96,59	2603864	99,26
5	1237967	99,22	2684360	102,32
6	1230959	98,66	2727098	103,95
7	1231257	98,68	2636715	100,51
8	1229991	98,58	2858875	108,98
9	1235277	99,00	2854260	108,80
10	1213488	97,26	3019125	115,09
11	1260738	101,04	2985177	113,79
12	1243324	99,65	2671849	101,85
13	1245606	99,83	2672479	101,87
14	1240673	99,43	2878852	109,74
15	1262220	101,16	2850175	108,64
16	1305878	104,66	2718176	103,61
17	1265494	101,42	2697226	102,81
18	1254129	100,51	2715015	103,49
19	1351686	108,33	2905148	110,74
20	1281841	102,73	2725200	103,88
21	1289616	103,36	2732868	104,17
22	1308865	104,90	2867692	109,31
23	1275094	102,19	2873035	109,52
24	1261805	101,13	2865868	109,24

TABUĽKA 30 - STABILITA DDNP A PIKNA VO VODE POČAS 24 HOD.



GRAF 6 ZÁVISLOTI PLOCHY PÍKU DDNP A PIKNA NA ČASE

Z grafu vyplýva, že DDNP je vo vode stabilné. Tejto vlastnosti sa využíva pri transporte prípadne skladovaní, kedy je DDNP ponorené vo vode čím sa znížia rizika nechceného vznietenia. Merania PikNa však neboli jednoznačné a je tu potrebná ďalšia štúdie primárne zameraná na vplyv vody na PikNa.

6.6.4.3. Stabilita za zvýšenej teploty a fotostabilita

Navážky 1,04 mg a 1,09 mg DDNP; 1,12 mg a 1,08 mg PikNa boli rozpustené v 1 MeOH každá zvlášť. Boli analyzované aby sme zistili plochy píkov ku ktorým budeme naše výsledky vzťahovať.

Analyzovaná látka	Plocha píku pre stabilitu pri 50°C	Plocha píku pre fotostabilitu
DDNP	1518979	1523483
PikNa	2614230	2598412

Následne sme jednu dvojicu látok uložili na okenný parapet, kde sme simulovali účinky slnečného žiarenia počas 24 hod. Druhá dvojica bola uložená v termostate pri kolóne počas 24 hod. analýzy stability vo vode pri 50 °C.

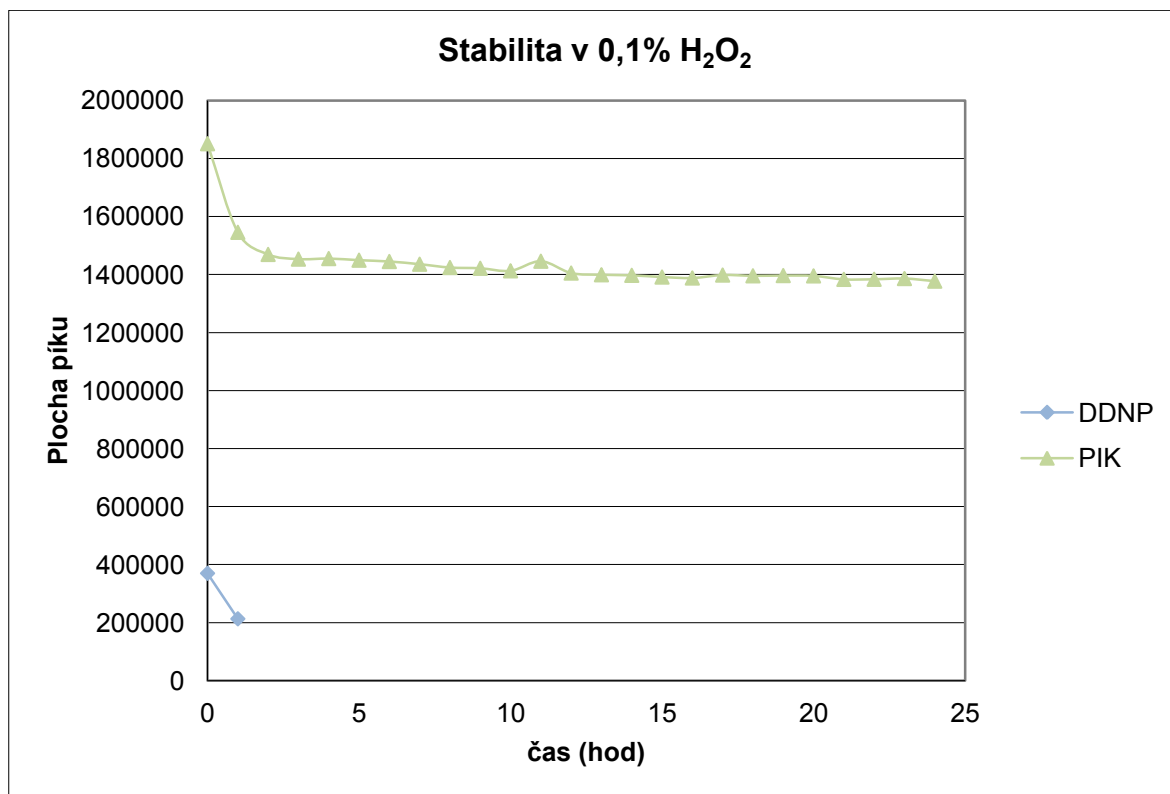
Stabilita pri 50 °C		
Analyzovaná látka	Plocha píku	Plocha píku v %
DDNP	1159422	76,32
PikNa	2553441	97,67

Fotostabilita		
Analyzovaná látka	Plocha píku	Plocha píku v %
DDNP	60297	3,96
PikNa	221499	8,52

Obidve látky, DDNP aj PikNa, nie sú stabilné na slnečnom svetle, dochádza k výraznému poklesu obsahu. PikNa je relatívne stabilný za zvýšenej teploty na rozdiel od DDNP, ktorého obsah pri teplote 50°C klesá na 76% pôvodného.

6.6.4.4. Vplyv oxidačných činidiel

Bol meraný vplyv oxidačných činidiel, presnejšie 0,1% a 0,01% H_2O_2 , na DDNP a PikNa počas 24 hodín. Pre testovanie boli navážky nasledovné: $m_{DDNP}=1,08$ mg a $m_{PikNa}=0,99$ mg. Vplyv silnejšieho peroxidu je znázornený na grafe č.7.



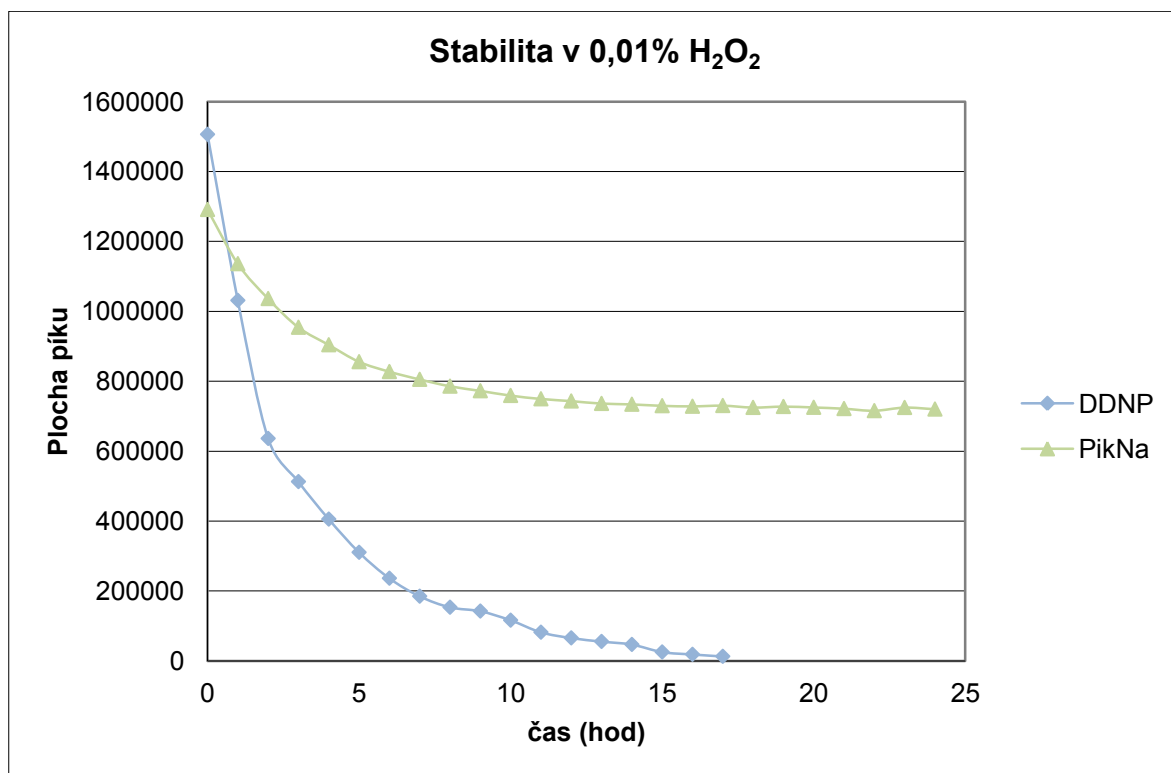
GRAF 7 ZÁVISLOTI PLOCHY PÍKU DDNP A PIKNA ROZPUSTENÝCH V 0,1% H_2O_2 NA ČASE

Z neho je vidno, že DDNP v prítomnosti H_2O_2 veľmi rýchlo reaguje. Z pôvodného množstva po 2 hodinách nie je v analyzovanej zmesi po ňom žiadna stopa. PikNa na druhej strane reaguje spočiatku rýchlejšie kedy dochádza k zníženiu pôvodnej koncentrácie z 100% na 79,38% počas prvých 2 hodín, následne počas ďalších 22 hodín klesá priemerne o 0,22% za hodinu.

Keďže DDNP sa nám rýchlo rozložil, bolo rozhodnuté, že vyskúšame stabilitu v 10x zriedenejšom roztoku H_2O_2 , 0,01%. Výsledky testovania sú v tabuľke č. 31 a grafe č.8.

čas (hod)	DDNP	%	PIK	%
0	1506206	100,00	1291218	100,00
1	1031185	68,46	1136172	87,99
2	636188	42,24	1036429	80,28
3	512724	34,04	954337	73,91
4	405445	26,91	904264	70,03
5	310496	20,61	855819	66,28
6	236346	15,69	827544	64,09
7	184933	12,28	805334	62,37
8	153384	10,18	785823	60,86
9	142366	9,45	772705	59,84
10	116318	7,72	759182	58,80
11	81955	5,44	749623	58,06
12	65605	4,36	743387	57,57
13	55481	3,68	736356	57,03
14	46942	3,12	734046	56,85
15	25412	1,69	729921	56,53
16	18616	1,24	728329	56,41
17	12877	0,85	730381	56,57
18			725007	56,15
19			727640	56,35
20			725253	56,17
21			721687	55,89
22			715767	55,43
23			724856	56,14
24			720256	55,78

TABUĽKA 31 - PLOCHY PÍKOV DDNP A PIKNA POČAS 24 HOD. PRI SKÚŠKE NA STABILITU V 0,01% H₂O₂

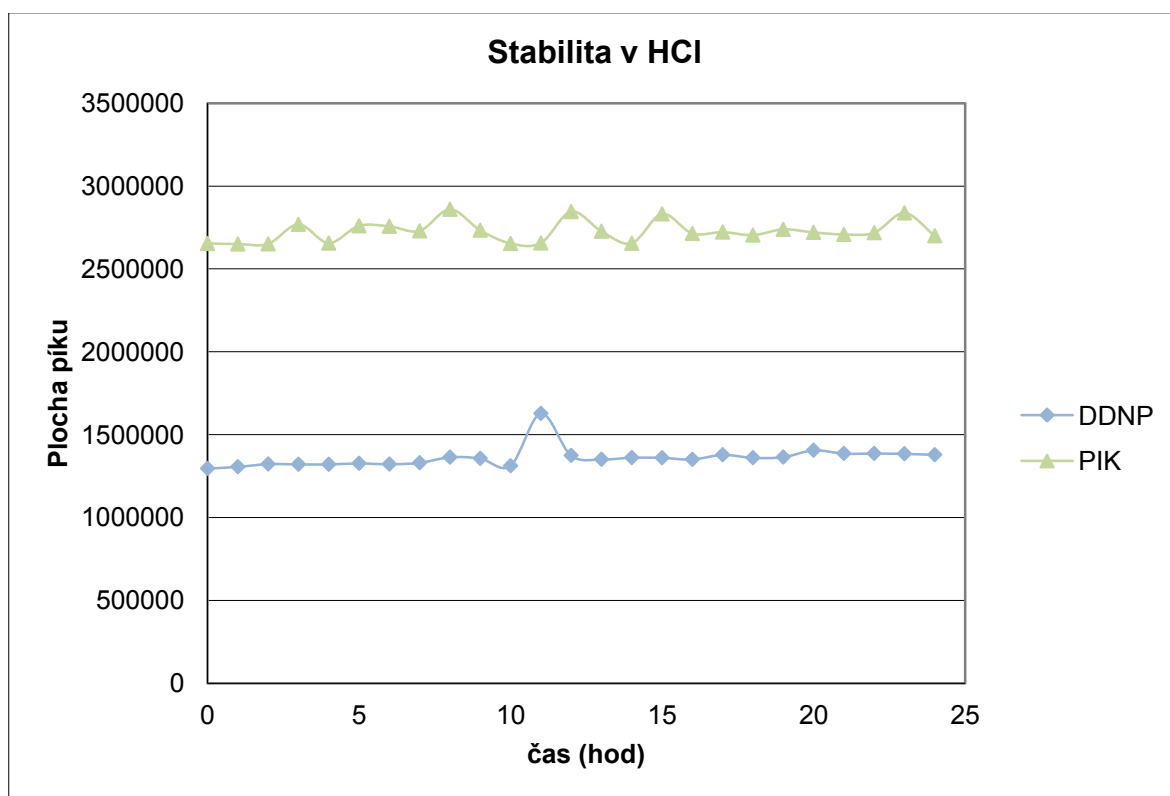


GRAF 8 ZÁVISLOSTI PLOCHY PÍKU DDNP A PIKNA ROZPUSTENÝCH V 0,01% H₂O₂ NA ČASE

Pôsobením zriedenejšie roztoku peroxidu je už jasnejšie vidieť postupnosť rozkladu oboch látok. DDNP sa úplne rozloží za 17 hodín. Obsah PikNa ale teraz postupne klesal prvých 12 hodín výraznejšie až potom došlo k zastaveniu úbytku. Ďalšie testovanie by bolo vhodné.

6.6.4.5. Vplyv kyslého prostredia

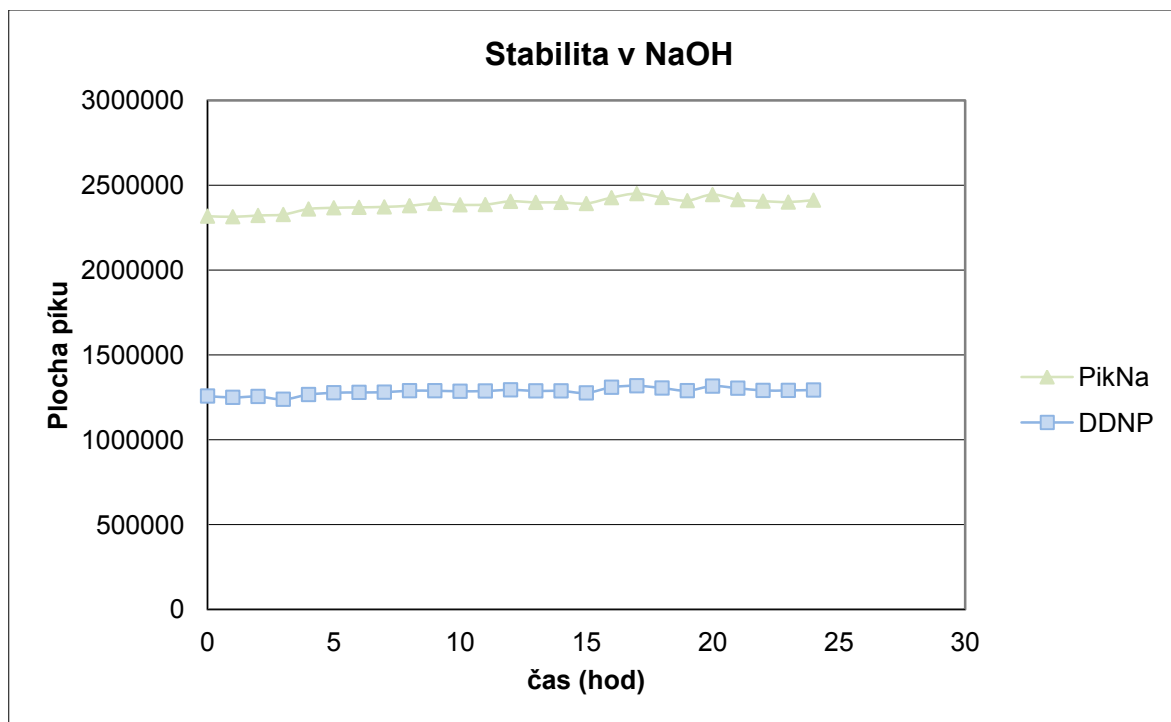
Testovanie kyslého prostredia bolo prevedené pôsobením kyseliny chlorovodíkovej o molárnej koncentrácii 0,1 M. Navážky 1,03 mg pre DDNP a 1,01 mg pre PikNa, obe rozpustené v 1 ml 0,1M HCl. Následne boli obe analyzované počas 24 hodín. Z výsledkov z grafu č. 9 je vidieť, že DDNP je stabilné a nedochádza ku kolísaniu hodnôt. PikNa však vykazuje nesúrode výsledky. Plochy píkov PikNa vykazujú fluktuáciu v rozmedzí 1 – 7%.



GRAF 9 ZÁVISLSTI PLOCHY PÍKOV DDNP A PIKNA V 0,1M HCL NA ČASE

6.6.4.7. Vplyv zásaditého prostredia

Stabilita v zásaditom prostredí hydroxidu sodného prebiehala navážením analyzovaných látok, $m_{DDNP}=1,05$ mg a $m_{PikNa}=1,01$ mg, a ich rozpustením v 0,1M NaOH. Opäť boli nastreknuté na kolónu v hodinových intervaloch počas 24 hodín. Z analýzy vyplynulo, že NaOH nemá veľký vplyv na hodnoty DDNP a PikNa. Zhrnuté výsledky sú v grafe č.10. Z neho je vidieť, že plochy píkov sa nezmenšujú, dokonca dochádza k malému navýšeniu zhruba o 2% v prípade DDNP a 4% v prípade PikNa.



GRAF 10 ZÁVISLOSTI PLOCHY PÍKU DDNP A PIKNA ROZPUSTENÝCH V NAOH NA ČASE

7. ZÁVER

Bola optimalizovaná a validovaná HPLC metóda pre analýzu diazodinitrofenolu a pikraminanu sodného.

Po vyskúšaní niekoľkých typov kolón a rôznych mobilných fázy boli nasledujúce podmienky zvolené za najvhodnejšie:

<i>Kolóna</i>	Ascentis® Express C18 10cm x 3mm; 2,7 μ m častice
<i>Dávkovanie</i>	5 μ l
<i>Detekcia</i>	UV, 220 nm
<i>Mobilná fáza</i>	0,085% H ₃ PO ₄ /ACN v pomere 70/30
<i>Typ elúcie</i>	Izokratická
<i>Prietok</i>	0,8 ml/min
<i>Teplota</i>	50 °C
<i>Čas analýzy</i>	4,5 min

Pri testovaní vhodnosti chromatografického systému bola účinnosť kolóny vyjadrená počtom teoretických priehradiek. Pre obe látky bola splnená podmienka viac ako 1500 ($N_{DDNP}=1521$; $N_{PikNa}=7120$). Symetrie oboch píkov boli vyjadrené v A_s . U DDNP bola 1,506 a pri PikNa 1,247. Rozlíšenie chromatografických píkov bolo až na základnú liniu s $R_s=5,546$.

Pri testovaní linerarity nebola ani u jednej látky vyhodená požiadavka na $r>0,9990$ ($r_{DDNP}=0,9985$ a $r_{PikNa}=0,9989$)

Testovanie robustnosti preukázalo vhodnosť teploty (50 °C) a zloženia mobilnej fázy (0,085% H₃PO₄/ACN v pomere 70/30)

Stabilitné testy dokázali jasný rozklad pôsobením slnečného žiarenia. K rozkladu dochádza aj pôsobením oxidačných činidiel (0,1% H₂O₂), zvýšenej teploty (50 °C). DDNP a PikNa boli stabilné v MeOH, HCl, NaOH a vo vode.

8. BIBLIOGRAFIA

1. **Braithwaite A., Smith F. J.** *Chromatographic methods*. s.l. : Springer, 1996. ISBN: 9780751401585.
2. **Whelan, W.J.** The Advent of Paper Chromatography. *The FASEB Journal*. 1995, Zv. 9, ISSN: 08926638.
3. **Janák J., Novák J.** Theoretical aspects of liquid chromatography. *Journal of chromatography library*. 1975, Zv. 3, ISSN: 03014770.
4. **Mikeš, O.** High-performance liquid chromatography of biopolymers and biooligomers. *Journal of chromatography library*. 1988, Zv. 41A, ISSN: 03014770.
5. **Miller, J.M.** *Chromatography: concepts and contrasts, 2nd ed.* New Jersey : John Wileys & Sons, Inc, 2005. ISBN: 0471472077.
6. **IUPAC.** International Commission. 1993.
7. **King J.W., Hill H.H., Milton L.L.** Analytical supercritical fluid chromatography and extraction. *Physical methods of chemistry*. s.l. : John Wiley & Sons, Inc., 1993.
8. **Klouda, P.** *Moderní analytické metody*. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. ISBN: 8086369072.
9. **IUPAC Recommendations.** Nomenclature for chromatography. *Pure & Appl Chem, vol 65. No.4*. 1993.
10. **Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W.** *Introducing to Modern Liquid Chromatography, 3rd ed.* New Jersey : John Wiley & Sons, Inc, 2010. ISBN: 9781118210390.
11. **Meyer, V.R.** *Practical High-Performance Liquid Chromatography, 5th ed.* Chichester : John Wiley & Sons, Ltd, 2010. ISBN: 9780470682173.
12. **Solich, P.** Pokroky v kapalinové chromatografii, přednáška z předmětu Speciální metody instrumentální analýzy. *Studijní materialy FaF UK*. [Online] 17. 1 2012.
13. **Sherma, J.** *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*. s.l. : CRC Press, 2010. ISBN: 9781420092608.
14. **Dong, M.W.** *Modern HPLC for practical scientists*. s.l. : John Wiley and Sons, 2006. ISBN: 9780471727897.
15. *Český lékopis*. Praha : Grada Publishing a.s., 2009. ISBN: 8594049240180.
16. **Bart, J.C.J.** *Plastics Additives: Advanced Industrial Analysis*. s.l. : IOS Press, 2006. ISBN: 9781586035334.

17. **Douša, M.** HPLC.cz. *Hodnocení linearity*. [Online] 24. 1 2011. [Dátum: 27. 3 2012.] <http://www.hplc.cz/Validace/linearita.html>.
18. **International Conference on Harmonization.** Q2A: Text on Validation of analytical Procedures. s.l. : US FDA Federal Register, 1995. Zv. Vol. 60.
19. **Yinon J., Zitrin S.** *Modern Methods and Applications in Analysis of Explosives*. s.l. : John Wiley and Sons, 1996. ISBN: 9780471965626.
20. **Ledgard, J.** *The Preparatory Manual of Explosives*. s.l. : Lulu.com, 2007. ISBN: 9780615142906.
21. **Dept. of the Army, United States Armed Forces.** *Military explosives*. s.l. : Headquarters, Dept. of the Army, 1989.
22. **Agrawal, J.P.** *High Energy Materials: Propellants, Explosives and Pyrotechnics*. s.l. : John Wiley & Sons, 2010. ISBN: 9783527326105.
23. **Scientific Committee on Consumer Safety.** OPINION on Picramic acid and sodium picramate. [Online] revizia 22.3.2011, 14. 12 2010. [Dátum: 28. 3 2012.] <http://alturl.com/yok3o>. SCCS/1227/10.
24. **Sigma-Aldrich Co. LLC.** Sigma-Aldrich, Inc. Web site. *Ascentis® Express C18 HPLC Column*. [Online] [Dátum: 3. 4 2012.] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/53814u?lang=en®ion=SK>.
25. **Vetchý D., Frýbortová K., Rabšíková M. a Haring A.** Testování stability léčivých přípravku. *Chemická listy 100*. 2006.

