

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



IDENTIFIKACE HLAVNÍCH DEGRADAČNÍCH PRODUKTŮ BUTAN-1,3-DIOLU

Rigorózna práca

Vedúci rigorózneho práce:

PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Autor:

Mgr. Jaroslav Kušnír

Hradec Králové, 2014

„Prehlasujem, že táto práca je mojím autorským dielom, ktoré som vypracoval samostatne. Všetka literatúra a zdroje, z ktorých som čerpal spracovanie, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

vlastnoručný podpis autora

Na tomto mieste by som rád poďakoval PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D. za odborné vedenie, trpezlivosť a pomoc pri vypracovaní rigorózneho práca. Ďalej by som rád poďakoval všetkým pracovníkom katedry za ochotu a pomoc a taktiež Doc. PharmDr. Petrovi Zimčíkovi, Ph.D. z Katedry farmaceutickej chémie a kontroly liečiv za interpretáciu NMR spektra.

Táto rigorózna práca vznikla za podpory grantu SVV-260-062.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát: Mgr. Jaroslav Kušnír

Konzultant: PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Názov rigorózneho práce: Identifikace hlavních degradačních produktů butan-1,3-diolu

Butan-1,3-diol obsahuje tri neznáme nečistoty, z čoho dve o relatívnej molekulovej hmotnosti 118 a jednu o relatívnej molekulovej hmotnosti 160. Hlavnou úlohou rigorózneho práce bola ich identifikácia. Vzhľadom k malému množstvu nečistôt bola použitá oxidácia peroxidom vodíka za účelom zvýšenia ich obsahu. Oxidáciou vznikli ďalšie dve nové látky - 3-hydroxybutanal a 4-hydroxybutan-2-on. Pri zvýšení teploty oxidácie na 70 °C vznikla kyselina octová ako ďalší rozkladný produkt.

Reakciou butan-1,3-diolu s 3-hydroxybutanalom vzniká látka o relatívnej molekulovej hmotnosti 160. Pokusmi sa potvrdilo, že spektrá nami pripravenej látky a nečistoty butan-1,3-diolu boli totožné a pomocou NMR a MS bola táto látka identifikovaná ako 1-(4-methyl-1,3-dioxan-2-yl)propan-2-ol.

Ďalšie dve látky o relatívnej molekulovej hmotnosti 118 sú pravdepodobne doprovodné látky s molekulovým vzorcom $C_6H_{14}O_2$. Ich hmotnostné spektrum bolo takmer totožné a ďalšia identifikácia ich štruktúry pomocou EI/CI-GC/MS nebola možná. Nečistoty nevznikajú oxidáciou (ani za iných stresových podmienok) a preto ich množstvo nebolo dostatočné pre identifikáciu ďalšími metódami ako napríklad NMR, IR.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Analysis

Candidate: Mgr. Jaroslav Kušnír

Consultant: PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Title of thesis: Identification of main decomposition products of butane-1,3-diol

Butane-1,3-diol contains three unknown impurities. The relative molecular mass of two of these compounds is 118 and 160 for the last one. The main aim of this work was the identification of these compounds. Due to the low amount of the impurities oxidation by hydrogen peroxide was employed in order to increase their content. As a result of oxidative decomposition two new compounds 3-hydroxybutanal and 4-hydroxybutan-2-on were formed. If the temperature of the oxidation increased to 70 °C acetic acid as a next degradation product was obtained.

The reaction of butane-1,3-diol and 3-hydroxybutanal resulted in a compound of a relative molecular mass 160. Our experiments confirmed that the spectra of our prepared compound and the impurity of butane-1,3-diol were identical. The compound was identified as 1-(4-methyl-1,3-dioxan-2-yl)propan-2-ol using NMR and MS.

The other two compounds of a molecular mass 118 are most likely related compound of the molecular formula $C_6H_{14}O_2$. Their mass spectra were nearly identical and further identification of the structure by means of EI/CI-GC/MS was not successful. The impurities do not arise from the oxidation (or under other stress conditions) and therefore their amount was insufficient for the identification by other techniques (e.g. NMR, IR).

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČASŤ	11
2.1	CHROMATOGRAFIA	12
2.2	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIA	15
2.2.1	Zdroj nosného plynu, nosný plyn	16
2.2.2	Regulátor prietoku	17
2.2.3	Nástreková hlava – injektor	17
2.2.4	Chromatografická kolóna	18
2.2.4.1	<u>Stacionárne fázy</u>	21
2.2.5	Termostat	22
2.2.6	Detektory v plynovej chromatografii	22
2.2.7	Vyhodnocovacie zariadenie	25
2.3	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIA / HMOTNOSTNÁ SPEKTROMETRIA (GC/MS)	26
2.3.1	Iontový zdroj	27
2.3.1.1	<u>Elektrónová ionizácia (EI)</u>	27
2.3.1.2	<u>Chemická ionizácia (CI)</u>	28
2.3.2	Hmotnostné analyzátory	30
2.3.2.1	<u>Kvadrupólový analyzátor</u>	31
2.3.3	Zber signálu	31
2.3.4	Detekcia signálu a spracovanie dát	32
2.4	INTERPRETÁCIA HMOTNOSTNÝCH SPEKTIER	33
2.4.1	Hmotnostné spektrum	33
2.4.2	Klasifikácia iónov	34
2.4.3	Fragmentácia iónov	35
2.4.3.1	<u>Základné typy fragmentácie</u>	35
2.4.4	Pravidlo párneho počtu elektrónov (Even-Electron Rule)	36
2.4.5	Obecný postup interpretácie EI spektier	37
2.4.5.1	<u>Určenie molekulovej hmotnosti (M_r)</u>	37
2.4.5.2	<u>Identifikácia $M+2$ prvkov</u>	37
2.4.5.3	<u>Dusíkové pravidlo</u>	38
2.4.5.4	<u>Odhad počtu uhlíku podľa pomeru $^{13}C/^{12}C$</u>	38
2.4.5.5	<u>Identifikácia iónov</u>	38
2.4.5.6	<u>Ďalšie ióny a ich logické straty</u>	39
2.4.6	Ring plus Double Bonds Rule (číslo nenasýtenosti)	39
2.4.7	Interpretácia hmotnostných spektier s použitím mäkkých ionizačných techník	40
2.5	ĎALŠIE METÓDY IDENTIFIKÁCIE NEZNÁMEJ ŠTRUKTÚRY	41
2.5.1	Absorpčná spektrometria vo viditeľnej a ultrafialovej oblasti	41
2.5.2	Luminiscenčná spektrometria vo viditeľnej a ultrafialovej oblasti	41
2.5.3	Infračervená (IR) spektrometria	42
2.5.4	Ramanová spektrometria	42
2.5.5	Mikrovlnná spektrometria	43
2.5.6	Nukleárna magnetická rezonančná spektrometria (NMR)	43
2.5.7	Spektrometria elektrónovej paramagnetickej rezonancie (EPR)	43
2.6	FYZIKÁLNO-CHEMICKÉ VLASTNOSTI BUTAN-1,3-DIOLU	45
3	CIEĽ PRÁCE	46
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	48
4.1	CHEMIKÁLIE A PRÍSTROJE	49
4.1.1	Chemikálie	49

4.1.2	Prístroje	49
4.1.3	Ďalšie pomôcky	50
4.2	PRÍPRAVA VZORIEK	51
4.2.1	Záťažové skúšky	51
4.2.2	Reakcia butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanal v rôznych reakčných prostrediach	51
4.2.3	Určenie molekulovej hmotnosti a štruktúry skúmanej nečistoty	52
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	53
5.1	ZÁŤAŽOVÉ SKÚŠKY	54
5.1.1	Záťažové skúšky s peroxidom vodíka	55
5.1.2	Porovnávanie výsledkov rozkladného produktu a kyseliny octovej	59
5.2	URČOVANIE MOLEKULOVEJ ŠTRUKTÚRY NEČISTOTY	62
5.2.1	Reakcia butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanal v rôznych reakčných prostrediach	66
5.2.1.1	<u>Methanol</u>	66
5.2.1.2	<u>Tetrahydrofurán</u>	67
5.2.1.3	<u>Acetonitril</u>	68
5.2.2	Určovanie molekulovej hmotnosti a štruktúry skúmanej nečistoty	70
6	ZÁVER	77
7	POUŽITÁ LITERATÚRA	79

1 ÚVOD

Chromatografia patrí medzi fyzikálno-chemické separačné metódy, ktorej podstatou je rozdelenie zložiek zmesi látky medzi pohyblivú a nepohyblivú fázu na základe ich rozdielnej afinity k nim – to vedie k separácii zložiek zmesi na jednotlivé komponenty. Tieto vlastnosti sa využívajú pri určení o akú látku sa jedná (kvalitu), pri zisťovaní koncentrácie látky vo vzorke (kvantita), ale aj napríklad pri zisťovaní čistoty skúmanej látky.

Jedna z chromatografických metód, ktorá má uplatnenie v analýze liečiv ako citlivá analytická metóda s vysokou separačnou účinnosťou, je plynová chromatografia (GC).

Využíva sa hlavne pri analýze plyných látok a látok prchavých, ktoré sú pri prevedení do plynného skupenstva stabilné. U látok, ktoré sú pri vysokých teplotách nestabilné alebo sú neprchavé, sa využíva metóda derivatizácie, aby ich bolo možné previezť na prchavé deriváty analyzovanej zlúčeniny pred ich samotnou analýzou.

Kombináciou plynovej chromatografie a hmotnostného spektrometra (GC/MS) sa docieli okrem vysokej separačnej schopnosti, kvantitatívneho hodnotenia aj schopnosť identifikácie analyzovanej zlúčeniny, nečistôt alebo vedľajších produktov výroby, prípadne rozkladných produktov pri záťažových skúškach.

Pri zisťovaní a overovaní štruktúry neznámej skúmanej látky je potreba mať náležite analytické znalosti, napríklad pri hodnotení výsledných hmotnostných spektier u hmotnostnej spektrometrie a následne si závery ešte overiť ďalšími analytickými metódami, napr. NMR.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 CHROMATOGRAFIA

Chromatografia je fyzikálno-chemická separačná metóda, ktorej podstatou je rozdeľovanie zložiek zmesi vzorky medzi dve fázy, a to fázou nepohyblivou (stacionárnou fázou) a pohyblivou (mobilnou fázou). Tieto dve fázy sa od seba odlišujú niektorou základnou fyzikálno-chemickou vlastnosťou, napr. polaritou. Spolu s pohybujúcou sa mobilnou fázou je sústavou tiež unášaná vzorka. Delené zložky vzorky (analytu) interagujú v rôznej miere so stacionárnou a mobilnou fázou. Analyty, ktoré sa pútajú viac k stacionárnej fáze, sa pohybujú pomalšie než analyty, ktoré sa k stacionárnej fáze pútajú menej. Na základe tohto princípu dochádza k rozdeľovaniu zložiek zmesi¹.

2.1.1 Rozdelenie chromatografických metód

Primárne sa dajú rozdeliť chromatografické metódy podľa charakteru mobilnej fázy, tj. na **plynovú chromatografiu** (GC), kde je mobilnou fázou inertný plyn a na **kvapalinovú chromatografiu** (LC), kde je mobilnou fázou kvapalina. Kvapalinová chromatografia môže byť realizovaná v plošnom usporiadaní alebo v kolónovom usporiadaní².

Rozdelenie podľa podstaty separačného procesu:

- **Adsorpčná chromatografia** (Adsorption chromatography)

Podstatou separácie je rozdielna adsorbovateľnosť delených látok na aktívny povrch adsorbentu. Ako sorbenty sa najčastejšie používajú silikagel (polárny kyslý sorbent) a oxid hlinitý (polárny bázičný sorbent) alebo aj napríklad aktívne uhlie (nepolárny sorbent).

- *Kvapalinová adsorpčná chromatografia* (LSC – Liquid-solid column chromatography)

- *Papierová chromatografia* (PC – Paper chromatography)

- *Tenkovrstvá chromatografia* (TLC – Thin-layer chromatography)

- *Plynová adsorpčná chromatografia* (GSC – Gas-solid chromatography)

Náplňové kolóny (Packed chromatography)

Kapilárne kolóny (OTC – Open tubular chromatography)^{2,3}

- **Iontovýmenná chromatografia** (IEC – Ion Exchange chromatography)

Ide ju realizovať iba ako kvapalinovú chromatografiu. Stacionárnou fázou sú iontomeniče (ketaxy alebo anexy).

- **Rozdeľovacia chromatografia** (Partition chromatography)

Je založená na rozdielnej rozpustnosti delených látok medzi kvapalnou stacionárnou fázou a mobilnou fázou, ktorá môže byť kvapalina alebo plyn. Takže je založená na rozdielnych hodnotách *rozdeľovacieho koeficientu* $K_D = c_s/c_m$ (c_s a c_m sú rovnovážne koncentrácie zložky v stacionárnej a v mobilnej fáze), pričom kvapalina použitá ako stacionárna fáza je zakotvená na vhodnom nosiči.

- *Kvapalinová rozdeľovacia chromatografia* (LLC – Liquid-liquid column chromatography)
- *Papierová chromatografia* (PC)
- *Tenkovrstvá chromatografia* (TLC)
- *Penová chromatografia* (FC – Foam chromatography)
- *Emulzná chromatografia* (EC – Emulsion chromatography)

V plynovej rozdeľovacej chromatografii sa jedná o separáciu v systéme kvapalina (zakotvená fáza) – plyn (GLC) a podstatou separačného procesu je rozdielna rozpustnosť delených látok unášaných nosným plynom v kvapalnej stacionárnej fáze.

- *Chromatografia plyn – kvapalina* (GLC – Gas-liquid chromatography)

Náplňové kolóny

Kapilárne kolóny (OTC)^{1,2,3}

- **Vylučovacia chromatografia** (SEC – Size exclusion chromatography)

Je závislá na rozdielnej priechodnosti molekuly látky kolónou naplnenou poréznym materiálom (gélom). Malé molekuly prenikajú do pórov všetkých veľkostí, väčšie molekuly iba do väčších pórov a veľké molekuly, ktoré presahujú priemer pórov, vychádzajú z kolóny bez akéhokoľvek zdržania. Separácia molekúl je teda závislá na rozmedzí veľkosti póru zvoleného gélu.

- *Gélová filtračná chromatografia alebo gélová chromatografia* (GFC – Gel filtration chromatography)
- *Gélová permeačná chromatografia* (GPC – Gel permeation chromatography)
- *Molekulové sitá* (Molecular sieves)^{2,3}

- **Afinitná chromatografia**

Je založená na špecifických interakciách obvykle neväzbovej povahy. Jeden z partnerov sa pevne chemicky naviaže ako ligand na vhodný nosič a tvorí tak spolu s ním stacionárnu fázu. Druhý z partnerov je obsiahnutý vo vzorke a za vhodných podmienok je na kolóne špecificky naviazaný neväzbovými interakciami práve na ten ligand. Po dôkladnom premytí kolóny vhodným roztokom (napr. fyziologickým roztokom) pre odstránenie všetkých zložiek nešpecificky (a teda veľmi slabo) zadržaných na kolóne, sa nami požadovaná látka eluje vhodne vybraným roztokom – eluačným činidlom¹.

2.2 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIA

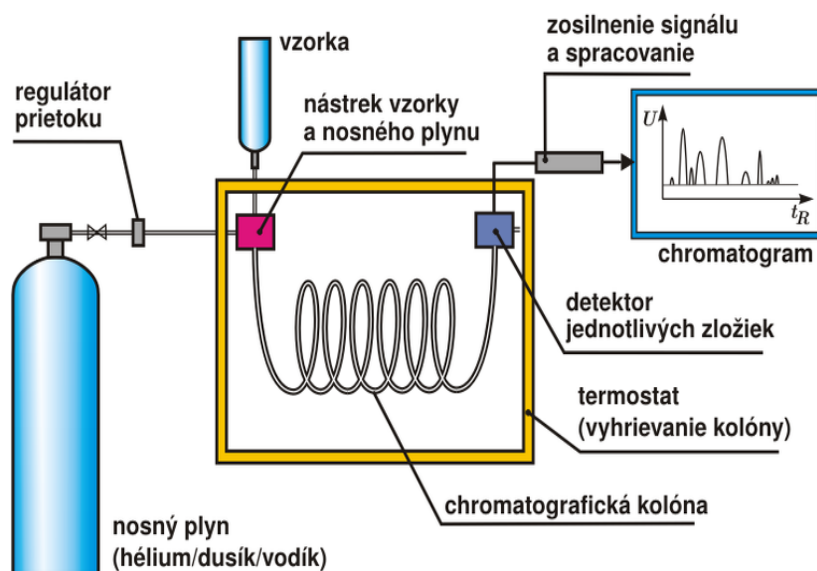
Plynová chromatografia (*Gas Chromatography* - GC) sa dá charakterizovať ako fyzikálna metóda delenia, pri ktorej sa separované zložky zmesi rozdeľujú medzi dve fázy – stacionárnu (nepohyblivú) a mobilnú fázu obtekajúcou fázou stacionárnu. Stacionárnou fázou môže byť buď povrchovo aktívna tuhá látka (adsorbent), potom ide o chromatografiu plyn-adsorbent (**GSC**), alebo vhodná kvapalina zakotvená na nosiči – chromatografia plyn-kvapalina (**GLC**). U plynovej chromatografie je teda vždy pohyblivou fázou fáza plynová⁴.

Plynová chromatografia sa využíva hlavne na analýzu prchavých látok, ktoré sa zahriatím prevedú na páry, pričom nedochádza k ich rozkladu. U látok, ktoré sa zvýšenou teplotou rozkladajú, je nutné pred GC analýzou podrobiť analyzované vzorky chemickou reakciou s vhodnými derivatizačnými činidlami (**derivatizácia**) za vzniku prchavých derivátov analyzovaných látok².

Schéma plynového chromatografu

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

- Zdroj nosného plynu
- Regulátor prietoku
- Nástreková hlava - injektor
- Chromatografická kolóna
- Termostat
- Detektor
- Vyhodnocovacie zariadenie



Obr. 1: Schéma plynového chromatografu⁵.

2.2.1 Zdroj nosného plynu, nosný plyn

Zdrojom nosného plynu je tlaková nádoba naplnená zvyčajne vodíkom, dusíkom, héliom alebo argónom⁶.

Nosný plyn

Hlavnou úlohou nosného plynu je preniesť vzorku kolónou. Je to *mobilná fáza*, ktorá má byť inertná, čiže nesmie chemicky reagovať so vzorkou. Druhou úlohou je poskytnúť vhodnú maticu detektoru pre meranie zložiek vzorky⁷.

Voľba nosného plynu závisí na typu detektoru, kolóny, aplikácii a na bezpečnostných požiadavkách (vodík je explozívny). Dôležitým kritériom pre jeho výber je takisto separačná schopnosť a rýchlosť prietoku. Vodík má nižšiu viskozitu, preto zaistí najrýchlejší prietok mobilnej fázy a tým pádom najkratší čas analýzy. Kvôli bezpečnosti je však v mnohých prípadoch volený nosný plyn hélium ako voľba optimálna⁸.

V Tab. 1 sú zobrazené vlastnosti vybraných nosných plynov pri 0 °C a 101,3 kPa a v Tab. 2 sú uvedené nosné plyny preferované pre rôzne detektory.

Plyn	Hustota [g/dm ³]	Viskozita [uPa s]
H ₂	0,09	8,44
He	0,178	18,6
N ₂	1,25	16,58
Ar	1,78	21,2

Tab. 1: Vlastnosti nosných plynov pri 0 °C a 101,3 kPa⁹.

Detektor	Nosný plyn
Tepelná vodivosť	Vodík, hélium
Plameňová ionizácia	Hélium, dusík alebo vodík
Elektrónový záchyt	Veľmi čistý dusík alebo argón, 5% methan

Tab. 2: Preferované nosné plyny u rôznych detektoroch⁴.

Ďalším dôležitým faktorom je **čistota** nosného plynu. Nečistoty, obzvlášť uhľovodíky, znižujú citlivosť a zhoršujú rozmedzie detekcie. Stopové množstvo vody a kyslíku môžu navyše rozkladať stacionárnu fázu, čo vedie k predčasnému znehodnoteniu kolóny⁸.

2.2.2 Regulátor prietoku

Kontrola prietoku u nosného plynu je podstatou pre účinnosť kolón a pre kvalitatívnu analýzu. Účinnosť kolón závisí na správnej lineárnej rýchlosti plynu, ktorá môže byť ľahko stanovená meniacim sa prietokovým pomerom až do dosiahnutia maximálnych hodnôt. Typické optimálne hodnoty sú: 75 až 90 mL/min pre ¼“ (6,35 mm) vonkajšieho priemeru – outside diameter (o.d.) náplňových kolón, 25 mL/min pre 1/8“ (3,18 mm) o.d. náplňových kolón a 0,75 mL/min pre 0,25 µm vnútorného priemeru – inside diameter (i.d.) kapilárnych kolón. Tieto hodnoty sú iba doporučené a preto optimálne hodnoty pre použité kolóny môžu byť stanovené experimentálne. Tiež to závisí aj od použitého nosného plynu, u ktorých sú trochu rozdielne optimálne prietoky.

Pre kvalitatívnu analýzu je podstatné mať konštantný prietokový pomer, aby retenčný čas mohol byť reprodukovateľný. Porovnanie retenčných časov je rýchla a ľahká technika pre identifikáciu zlúčenín. Treba mať na pamäti, že dve alebo viac zlúčenín môže mať rovnaký retenčný čas. Takže retenčné časy sú charakteristické pre látku, ale nie unikátne. Je samozrejmé, že dobré regulovanie prietoku je podstatné pre túto metódu identifikácie⁷.

2.2.3 Nástreková hlava – injektor

Injektor je vstupom analyzovanej látky do plynového chromatografu, kde začína prvá fáza chromatografického procesu. Nástrek látky sa najčastejšie robí pomocou špeciálnej injekčnej striekačky cez septum, ktoré oddeľuje vnútro injektoru od vonkajšieho priestoru. Súčasťou injektoru je sklenená vložka (*liner*), v ktorej dochádza vysokou teplotou k rýchlemu odpareniu vzorky a k správne premiešaniu pár vzorky s nosným plynom. Medzi injektor a kolónu je zaradený rozdeľovač toku (*splitter*), ktorý umožňuje viesť iba časť odparenej vzorky kolónou (*splitovací pomer*, *split ratio*). Táto technika sa používa pri vysokých koncentraciách vzorky. Technika nástreku bez splitu (*splitless injection*) sa používa pri stopovej analýze alebo pre analýzu zmesi látok, ktoré sa výrazne líšia v bode varu^{10,11}.

Objem vzorky pre analytickú prácu závisí na rozmeroch kolóny a na selektivite detektoru. Pre náplňové kolóny sa rozmedzie objemu vzorky pohybuje od 1 µl až do 20 µl. Kapilárne kolóny potrebujú omnoho menej vzorky – 0,01 µl až 1 µl¹¹.

Výber injektoru závisí podľa povahy analyzovanej vzorky.

Plyny alebo páry (spravidla sa dávajú plynosnými injekčnými striekačkami o objeme 1 až 10 ml cez gumovú zátku do odparovacej komôrky) – Head-space dávkovacie systémy

Head-space analýza je vynikajúca technika pre plynovú chromatografiu na analyzovanie prchavých látok. Sú dva typy injektorov:

Statické head-space dávkovacie systémy obsahujú komoru termostatu, do ktorej sa vkladajú uzavreté vialky obsahujúce pevné alebo kvapalné vzorky na vopred stanovenú dobu, potrebnú k ustáleniu rovnováhy prchavých zložiek vzorky medzi pevnou alebo kvapalnou fázou a plynnou fázou. Po dosiahnutí tejto rovnováhy je určené množstvo plynnej fázy z vialky dávkané do plynového chromatografu pomocou plynosnej striekačky¹².

Dynamické head-space: zatiaľ čo pri statickom head-space je odobraný iba podiel z uzatvoreného priestoru nad hladinou vzorky, pri dynamickom head-space je do priestoru nad vzorkou privádzaný inertný plyn, ktorý potom prechádza sorpčnou trubicou, v ktorej sú zachytené prchavé látky. Zachytené látky sú potom prevedené na chromatografickú kolónu. Vzorka sa môže aj zahrievať ale potom sa sorpčná kolóna musí chladiť^{12,13}.

Základným rozdielom medzi dynamickým a statickým head-space dávkovacím systémom je, že u dynamického head-space systému sa uvoľní viac prchavých látok zo vzorky, pričom u statického head-space sa po dosiahnutí fázovej rovnováhy sa už viac látky neuvoľní. Dynamický head-space systém je preto viac citlivejší.

Kvapaliny (dávajú sa injekčnými striekačkami o objeme 1 až 10 µl) – rôzne typy injektorov: Injektory „ON COLUMN“ – vzorka je vedená priamo do úzkej kapiláry špeciálnou ihlou. Je vhodná pre stopovú analýzu.

Injektory „SPLIT/SPLITLESS“ – dávkovanie do predvyhriateho dávkovacieho bloku.

Split mode – pre vyššie koncentrácie analytov. Časť vzorky sa ventiluje.

Splitless mode – pre nízke koncentrácie analytov. Robustnejší spôsob nástreku¹⁴.

2.2.4 Chromatografická kolóna

❖ **Náplňové kolóny** – sú trubice z nerezovej oceli alebo skla naplnené granulovaným adsorbentom pre GSC alebo nosičom so zakotvenou kvapalnou stacionárnou fázou pre GLC. Analytické náplňové kolóny majú vnútorný priemer 2 až 5 mm a dĺžku 0,5 až 5 m.²

❖ **Mikronáplňové kolóny** – sú to moderné účinné náplňové kolóny, ktoré majú malý priemer a obsahujú veľmi malé častice náplne (napríklad priemeru iba 10 µm aj menej). Preto je pri rovnakej dĺžke ako u bežnej náplňovej kolóny dosiahnutá vyššia účinnosť separácie⁶.

❖ **Kapilárne kolóny** – sú tenké kapiláry vyrobené z kremenného skla a kvôli pevnosti sú potiahnuté filmom polyimidu. Sú stočené do šrubovice o vnútornom priemere kapiláry nie viac ako 0,5 mm a dĺžke 10 až 100 m. Funkciu nosiča zastávajú vnútorné steny kapiláry, ktoré sú potiahnuté kvapalnou stacionárnou fázou^{2,10}.

- V kolónach **WCOT** (Wall Coated Open Tubular) je nosičom stacionárnej fázy vnútorná stena kapiláry.
- Kolóny **SCOT** (Support Coated Open Tubular) majú na vnútornej strane vrstvu nosiča so zakotvenou kvapalinou.
- Kolóny **PLOT** (Porous Layer Open Tubular) majú na vnútornej strane tenkú vrstvičku pórovitého materiálu (napríklad oxidu hlinitého), ktorá slúži ako adsorbent⁶.

Výber ideálnej kolóny pre danú analýzu do značnej miery závisí na štyroch faktoroch: polarita stacionárnej fázy, dĺžka kolóny, vnútorný priemer kolóny a hrúbka filmu fázy.

Stacionárna fáza:

Nepolárne fázy sú viac termostabilné ako polárne fázy. Na nepolárnych alebo stredne polárnych stacionárnych fázach je dobré deliť nepolárne zlúčeniny a zlúčeniny o strednej polarite. Pre delenie polárnych zlúčenín sa hodia polárne a stredne polárne fázy^{9,15}.

Dĺžka kolóny:

Štandardná dĺžka používaná pre väčšinu separácií je 25–30 m. To stačí na vysokú účinnosť s relatívne krátkym časom analýzy. 15 m kolóny sa používajú pre rýchle kontrolné analýzy, ale taktiež u látok s vysokou molekulárnou hmotnosťou. 60, 100 a 150 m kolóny sa používajú pre veľmi komplikované vzorky¹⁵.

Vnútorný priemer (ID) kolóny:

Vnútorný priemer kolóny je nepriamo úmerný jeho separačnej schopnosti. Čím menší priemer, tým vyššia účinnosť (a teda aj vyššie rozlíšenie), ale zároveň sa znižuje nosnosť (loading capacity)¹⁵.

Hrúbka filmu fázy:

Hrúbka filmu stacionárnej fázy v kapilárnej kolóne ovplyvňuje účinnosť, nosnosť, úroveň „krvácania“ a elučnú teplotu zmesi. Hrúbka vrstvy 0,25–0,32 μm je štandardná hrúbka umožňujúca kompromis medzi všetkými vlastnosťami¹⁵.

Fázový pomer (Phase ratio β):

β faktor definuje vzťah medzi vnútorným priemerom kolóny a hrúbkou stacionárnej fázy.

Hodnota sa vypočíta uvedeným vzorcom:

$$\beta = \frac{ID (\mu\text{m})}{4df (\mu\text{m})}$$

β - Fázový pomer
ID - Vnútorný priemer kolóny
df - Hrúbka filmu fázy^{15,16}

V Tab. 3 sú uvedené vypočítané hodnoty β faktoru, ktoré pomáhajú vybrať najvhodnejšiu kolónu pre vybranú analýzu. Z tabuľky sa dá ešte vyčítať, že hodnoty β sú tiež užitočné pri zmene kolóny s rozdielnym vnútorným priemerom a hrúbkou filmu, pretože kolóny s podobným fázovým pomerom, ako to je vidieť na označených hodnotách β faktoru, poskytujú veľmi podobné retenčné časy za rovnakých analytických podmienok¹⁷.

		ID (mm)			
		0,10	0,25	0,50	1,0
Hrúbka filmu (μm)	0,10	250	100	50	25
	0,25	625	250	125	63
	0,32	800	320	160	80
	0,53	1325	530	265	133

Tab. 3: Hodnoty β factoru¹⁶.

<u>Hodnota β</u>	<u>Použitie</u>
< 100	vysoko prchavé, nízko molekulárne zlúčeniny
100-400	široký sortiment zlúčenín, univerzálne analýzy
>400	vysokomolekulové zlúčeniny, stopové analýzy ¹⁷

2.2.4.1 Stacionárne fázy

GSC – stacionárna fáza (tuhý adsorbent) tvorí náplň alebo je nanosená ako porézna vrstva na vnútornom povrchu kapilárnej kolóny (PLOT).

Najčastejšie stacionárne fázy pre GSC:

- aktívne uhlie
- čistený silikagel
- oxid hlinitý
- molekulové sita [napr. $K_{12}(AlO_2)_{12}(SiO_2)_{12} \cdot x H_2O$]
- makro porézny polymérny sorbent⁹

GLC – kvapalná stacionárna fáza je zachytená na tuhom nosiči (náplňové kolóny, SCOT) alebo je nanosená na vnútornej stene kapiláry (WCOT).

Nosičmi stacionárnej fázy pre GLC sú zrnité materiály so špecifickým povrchom 0,4-1 m²/g najčastejšie na báze kremeliny. Nosič nesmie vykazovať adsorpčné vlastnosti⁹.

V Tab. 4 sú rozdelené kapilárne chromatografické kolóny podľa polarítou firmou Sigma-Aldrich a u vybraných kolón je napísané zloženie ich fázy.

	SPB-Octyl	Equity-1	SPB-1	Equity-5	SPB-5	SPB-20	Uiquity-1701	SPB-35	SPB-50	SPB-225	PAG	SUPELCOWAX 10	SP-2330	SP-2380	SP-2340	
Nepolárna kolóna																
Stredne polárna kolóna																
Polárna kolóna																
Vysoko polárna kolóna																

Tab. 4: Rozdelenie chromatografických kolón podľa polarítou¹⁷.

SPB-Octyl – viazaná fáza, poly(50%n-octyl/50%methylsiloxan)

SPB-20 – viazaná fáza, poly(20%diphenyl/80%dimethylsiloxan)

PAG – viazaná fáza, poly(alkylene glycol)

SUPELCOWAX 10 – viazaná fáza, poly(ethylene glycol)

SP-2330 – neviazaná fáza, poly(80%biscyanopropyl/20% cyanopropylphenyl siloxane)¹⁷

2.2.5 Termostat

Kolóna je umiestnená v peci, ktorá je temperovaná na určitú teplotu. Teplota kolóny by mala byť dostatočne vysoká, aby zložky vzorky prechádzali kolónou primeranou rýchlosťou. Nemala by byť však vyššia ako teplota varu vzorky. Treba vedieť, že kolóna pracuje v teplote, kde je vzorka v stave páry. U plynovej chromatografie teplota kolóny musí byť udržiavaná okolo hodnoty rosného bodu (*dew point*) vzorky, ale nie u jeho bodu varu.

Pokiaľ je teplota kolóny behom analýzy vzorky konštantná, jedná sa o isotermálnu analýzu. Pre analýzu multikomponentných zmesí látok s rozdielnymi bodmi varu je vhodné použiť teplotného gradientu, kde sa teplota kolóny behom analýzy bude meniť podľa vytvoreného teplotného programu. Výhodou použitého teplotného gradientu je zlepšenie tvarov chromatografických pík (zúženie signálov, vyššia citlivosť) a výrazne skrátenie doby analýzy^{7,10}.

2.2.6 Detektory v plynovej chromatografii

V plynovej chromatografii sa používa veľa detektorov, kde každý z nich má rozdielny typ citlivosti a selektivity a podľa toho môžu byť detektory rozdelené na:

- a). **Univerzálny detektor**, ktorý reaguje so všetkými zlúčeninami v mobilnej fázy s výnimkou nosného plynu.
- b). **Selektívny detektor**, ktorý reaguje iba na určité skupiny látok¹¹.

Požiadavky na detektor sú: rýchla odozva
vysoká citlivosť
selektivita
linearita odozvy
stabilita¹⁰

Teplota detektoru by mala byť vyššia ako je teplota plynu vychádzajúca z kolóny, aby sa zabránilo kondenzácií látok na stenách detektoru¹⁰.

V Tab. 5 sú uvedené základné charakteristiky vybraných detektorov používaných v GC.

Detektor	Selektivita	Približný detekčný limit	Lineárny rozsah
TCD	Reaguje, ak je teplotná vodivosť iná od nosného plynu. Univerzálny a neselektívny.	1 ng/ml	10 ⁵
FID	Organické zlúčeniny. Neselektívny, takmer univerzálny.	1 pg(C)/s	10 ⁷
ECD	Elektrónové zachytávanie zlúčenín ako sú napríklad halogény.	10 fg/s	10 ⁴
NPD, TID, AFID	Zlúčeniny N a P.	1 pg(N)/s 0,5 pg(P)/s	10 ⁴
FPD	Zlúčeniny P a S (N, As).	50 pg(S)/s 2 pg(P)/s	10 ³ 10 ⁴
PID	Aromatické zlúčeniny.	5 pg(C)/s	10 ⁷
ELCD	Halogény a S zlúčeniny.	1 pg(Cl)/s 5 pg(s)/s	10 ⁶ 10 ⁴
AED	Selektívne častice.	0,1-50 pg/s	10 ⁴
MSD	Látkovo selektívny, takmer univerzálny.	10 ⁻¹⁵ -10 ⁻¹² g/s	10 ⁶ -10 ⁸

Tab. 5: Súhrn niekoľko typických charakteristík bežných GC detektorov^{3,9}.

- ***Tepelne vodivostný detektor (TCD – Thermal conductivity detector)***

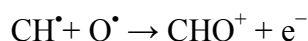
Princípom merania je rozdiel medzi tepelnou vodivosťou nosného plynu a analyzovanej látky².

- ***Hmotnostno-spektrometrický detektor (MSD – Mass spectrometry detector)***

Princípom je ionizácia neutrálneho atómu či molekuly za vzniku iónov a ich fragmentov, ktoré sú ďalej separované a detekované na základe pomeru m/z , kde m je hmotnosť a z je náboj iónu (viď kapitola 2.3)².

- ***Plameňovo-ionizačný detektor (FID – Flame ionization detector)***

Princíp detekcie pomocou FID je založený na zložitej chemiionizačnej reakcii organických látok v kyslíkovodíkovom plameni. Pri tejto reakcii sa z organických látok uvoľňujú ióny, ktoré sú následne detekované²:



V Tab. 6 sú napísané zlúčeniny, ktoré majú malú alebo žiadnu odpoveď v FID.

He	N ₂	H ₂ S	NO	CCl
Ar	O ₂	CS ₂	N ₂ O	SiCl ₄
Kr	CO	COS	NO ₂	CH ₃ SiCl ₃
Ne	CO ₂	SO ₂	N ₂ O ₃	SiF ₄
Xe	H ₂ O	SO ₃	NH ₃	SiHCl ₃
		HCN		

Tab. 6: Zlúčeniny s malou alebo žiadnou odpoveďou v FID³.

- **Detektor elektrónového záchyty (ECD – Electron capture detector)**

Princípom je ionizácia nosného plynu β žiarením za vzniku ionizačného prúdu, tj. konštantného prúdu pomalých elektrónov².



- **Termoionizačný detektor (TID – Thermionic detector)**

Plameňový ionizačný detektor so soľou alkalického kovu (AFID – Alkali flame ionization detector)

Dusíkovo-fosforový detektor (NPD – Nitrogen-phosphorus detector)

Princípom je ionizácia organických látok v kyslíkovodíkovom plameni, ktorý je vedený cez prsteneц solí alkalických zemín (CsBr, KCl, Rb₂SO₄). Detektor je selektívny predovšetkým na zlúčeniny obsahujúce vo svojej molekule dusík a fosfor².

- **Fotoionizačný detektor (PID – Photoionization detector)**

Princípom je ionizácia organických látok fotónom a následná detekcia uvoľnených elektrónov².

- **Plameňový fotometrický detektor (FPD – Flame photometric detector)**

Princíp je založený na aktivácií organických látok obsahujúcich fosfor alebo síru v kyslíkovodíkovom plameni. Aktivované látky emitujú žiarenie, ktoré je detekované².

- **Heliumionizačný detektor (HID – Helium ionization detector)**

- **Ultrazvukový detektor**

- *Elektrolytic (Hall) conductivity detector (ELCD)*
- *Atómový emisný detektor (AED – Atomic emission detector)*
- *Chemoluminiscenčný detektor³*

2.2.7 Vyhodnocovacie zariadenie

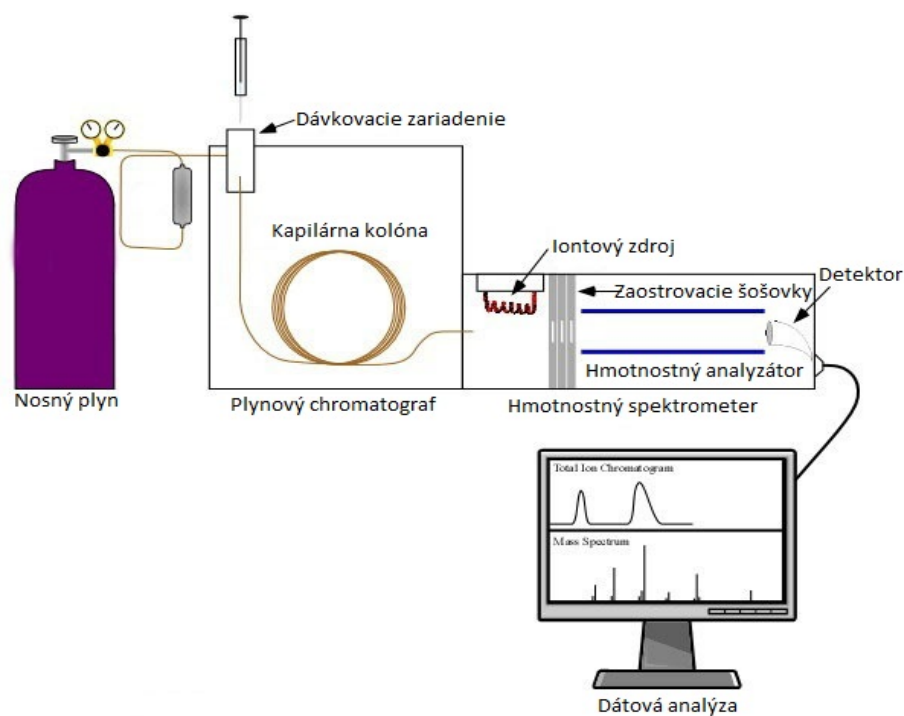
V súčasnej dobe sa v plynovej chromatografii spracúvajú údaje z plynového chromatogramu výhradne pomocou počítača so špeciálnym programom k tomu určeným, ktorý zároveň ovláda celý systém.

2.3 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIA / HMOTNOSTNÁ SPEKTROMETRIA (GC/MS)

Spojenie plynovej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie kombinuje silu vysokej schopnosti separácie zlúčenín s veľmi selektívnou a citlivou hmotnostnou detekciou. Toto umožňuje získať informácie o štruktúre neznámych látok^{3,18}.

Hmotnostná spektrometria sa zakladá na priamom meraní pomeru hmotnosti a elementárneho náboja m/z častíc analyzovanej látky. Tento pomer sa vyjadruje v atómových hmotnostných jednotkách ($1 \text{ u} = 1/12$ hmotnosti izotopu uhlíka ^{12}C)¹².

Na Obr. 2 je vyobrazená základná schéma spojenia plynovej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie.



Obr. 2: Schéma základného GC/MS systému¹⁹.

Princípom je teda najskôr separácia analyzovanej vzorky medzi dve nemiešateľné fázy v plynovej chromatografii, kde sú potom následne separované molekuly v hmotnostnom spektrometri ionizované iontovým zdrojom. Ionizáciou získavajú molekuly dostatok energie na to, aby boli fragmentované na nabitú časticu, usporiadanú zaostrovacími šošovkami a na základe ich m/z roztriedené v analyzátore a vyhodnotené detektorom.

2.3.1 Iontový zdroj

Na to, aby bola vzorka molekuly analyzovaná a detekovaná hmotnostnou spektrometriou, musí byť ionizovaná. V spojení GC/MS sa používa elektrónová ionizácia (EI) alebo chemická ionizácia (CI).

2.3.1.1 Elektrónová ionizácia (EI)

Elektrónová ionizácia patrí medzi tvrdé ionizačné techniky, pretože spôsobuje vysokú fragmentáciu molekuly. Fragmentáciou vznikajú neutrálne častice, radikály a nabité častice, z ktorých iba nabité častice vstupujú do hmotnostného analyzátoru štrbinou zaostrovacích šošoviek, kde sú zoradené podľa ich m/z . Vysoká miera fragmentácie spôsobuje vytvorenie viac fragmentov iónov, čím sa lepšie potvrdí identifikácia analytu. Na druhej strane, môže byť obtiažna detekcia molekulového iónu, ktorý je často cieľom analýzy MS v organickej chémii. Elektrónová ionizácia funguje tak, že prúd čistých analytov opúšťa plynový chromatogram cez lúče vysoko nabitých elektrónov (70 eV) v hmotnostnom spektrometri. Tieto elektróny sú vytvorené zahrievaním kovového vlákna na dostatočne vysokú teplotu (obvykle wolfrám) a sú priťahované k anóde prechádzajúc prúdom molekúl analytu. Takto dôjde k odtrhnutiu elektrónu z molekuly analytu a vznikne molekulový ión a nabité fragmenty.

Hodnota 70 eV bola zistená experimentálne a spôsobuje najviac reprodukovateľné spektrá a vo vysokom stupni fragmentácie. Táto hodnota ionizácie je vyššia ako ionizačná energia väčšiny organických molekúl (5–15 eV)^{19,20}.

V Tab. 7 sú znázornené potenciály ionizácie niektorých látok. Ionizačná energia E_{ion} je minimálna energia potrebná na uvoľnenie elektrónu; veličina charakteristická pre každú molekulu.

Zlúčenina	E_{ion} (eV)	Zlúčenina	E_{ion} (eV)
He	24,587	CH ₃ -CH ₃	11,65
Ar	15,759	CH ₂ =CH ₂	10,51
N ₂	14,533	C ₆ H ₆	9,24
O ₂	12,075	CH ₃ OH	10,85
H ₂ O	12,6	CH ₃ SH	9,44
CH ₄	12,7	CH ₃ NH ₂	9,01
SiH ₄	12,2	CH ₃ I	9,54
GeH ₄	10,53	Si(CH ₃) ₄	9,8

Tab. 7: Potenciály ionizácie niektorých látok²¹.

Elektrónová ionizácia je nerealizovateľná pri polárnych a chemicky nestálych zlúčeninách alebo pri zlúčeninách s vysokou molekulovou hmotnosťou¹².

Typy ionizačných reakcií:

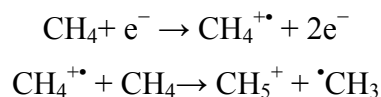
- a. Samotná molekula (nedetekovaná)
- b. Tvorba negatívneho iónu (nedetekovaný pomocou pozitívneho EIMS):
 $(A-B-C)^{-\bullet}$
 $(A-B)^{-} + C^{\bullet}$ a ostatné
- c. Elektrónová ionizácia: $(A-B-C)^{+\bullet} + 2e^{-}$
- d. Rozkladná ionizácia:
 $e^{-} + (A-B-C) \rightarrow A^{\bullet} + (B-C)^{+} + 2e^{-}$
 $(A-B)^{+} + C^{\bullet} + 2e^{-}$
 $(A-B)^{\bullet} + C^{+} + 2e^{-}$ a ostatné
- e. Rozkladná ionizácia s preskupením:
 $(A-C)^{+\bullet} + B + 2e^{-}$
 $(A-C) + B^{+\bullet} + 2e^{-}$
- f. Mnohonásobná ionizácia:
 $(A-B-C)^{2+} + 3e^{-}$
 $(A-B)^{+} + C^{+} + 3e^{-}$ a ostatné

Ióny detekované pozitívnou EIMS sú znázornené **tučným písmom**²⁰.

2.3.1.2 Chemická ionizácia (CI)

Na rozdiel od elektrónovej ionizácie, v ktorej sú molekuly ionizované prostredníctvom interakcie s vysokou energiou elektrónov, v chemickej ionizácii ionizácia závisí na zrážkach iónov a molekúl.

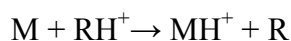
V **pozitívnej chemickej ionizácii** je vzorka ionizovaná reakciou s iónmi vytvorenými vo veľkom prebytku reagenčného plynu relatívne nízkej molekulovej hmotnosti, ako je metán, isobután alebo amoniak a tlaku 1 torr. Avšak niektoré ióny reagenčného plynu sú tvorené sami reakciou ión/molekula.



Iné sú tvorené rozkladom



V chemickej ionizácii je koncentrácia molekúl analytu menšia v porovnaní s molekulami reagenčného plynu. To znamená, že elektrónový lúč, ktorý má viac energie ako ten používaný u elektrónovej ionizácii (~200 eV) prednostne ionizuje reagenčný plyn. Molekuly analytu sú preto viac ionizované iónmi reagenčného plynu ako elektrónového lúča (prúdu). Väčšina iónov reagenčného plynu sú silnými darcami protónu a vznikajú protonizované molekuly, ktoré majú hmotnosť zvýšenú o 1 u oproti molekulovej hmotnosti pôvodnej zlúčeniny.



Táto chemická ionizácia je *protonizácia* a je najpoužívanejšia v chemickej ionizácii.

Chemická ionizácia sa často označuje ako mäkká ionizačná technika, pretože predá podstatne menej energie molekule analytu ako interakcia s elektrónmi vysokej energie. Tieto ióny preto menej fragmentujú ako u elektrónovej ionizácii. V dôsledku toho je chemická ionizácia užitočná pre určenie molekulovej hmotnosti zlúčeniny, ktorá sa ťažko zisťuje u EI²⁰.

V Tab. 8 sú znázornené reakčné plyny používané v chemickej ionizácii a ich charakteristiky.

Reakčný plyn	Afinita k protónu (kJ.mol ⁻¹)	Reakčný ión	Ión skúmanej látky
CH ₄	536	CH ₅ ⁺	MH ⁺
H ₂ O	724	H ₃ O ⁺	MH ⁺ , MH ₃ O ⁺
(CH ₃) ₃ CH	828	(CH ₃) ₃ C ⁺	MH ⁺
NH ₃	858	NH ₄ ⁺	MH ⁺ , MNH ₄ ⁺

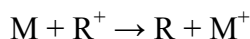
Tab. 8: Reakčné plyny používané v chemickej ionizácii a ich charakteristiky²¹.

Ďalšie ionizačné techniky v pozitívnej chemickej ionizácii²²:

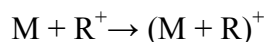
Odstránenie vodíka



Výmena náboja



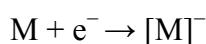
Tvorba zlúčeniny



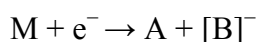
Negatívna chemická ionizácia (NCI) získala miesto predovšetkým v analýze životného prostredia vďaka svojej vysokej selektivitě a citlivosti pre celú radu závažných polutantov, ktoré obsahujú skupiny schopné zachytu elektrónu. Sú to predovšetkým halogenované látky, ale aj látky nitrované a kyslíkaté (deriváty poly aromatických uhl'ovodíkov, pesticídy).

Negatívne ióny pri chemickej ionizácii vznikajú interakciou molekuly s termálnymi elektrónmi, prípadne chemickou reakciou medzi iónom a molekulou analytu:

Rezonančný zachyt elektrónu



Disociačný zachyt elektrónu



Tvorba iónových párov

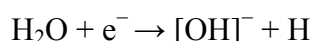


O tom, ktorý proces prebehne, rozhoduje energia elektrónu (70–250 eV) emitovaných z vlákna a redukované na potrebnú mieru zrážkami s neutrálnymi molekulami reakčného plynu (obvykle metánu). Výsledkom je ionizácia reakčného plynu alebo strata časti energie elektrónu²³.

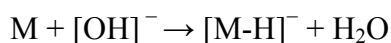
Fragmentáciu vzniknutých iónov môže podstatne ovplyvňovať okrem tlaku v iontovom zdroji (0,1–1 torr), druhu reakčného plynu a elektrickom poli iontového zdroja aj teplota iontového zdroja.

Proces zachytu elektrónu je dej konkurenčný, kde najviac negatívnych iónov vytvoria látky s najvyššou elektrónovou afinitou a s najvyššou pravdepodobnosťou zrážky.

Za prítomnosti vody môže z molekuly analytu vznikáť ión deprotonovaný na úkor molekulárneho iónu²³:

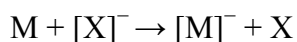


Prenos protónu

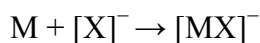


Ďalšie záporne nabité ióny môžu vznikáť²³:

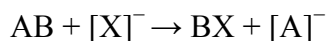
Výmenou náboja



Nukleofilnou adíciou



Nukleofilnou substitúciou



2.3.2 Hmotnostné analyzátory

Hmotnostný analyzátor slúži k rozdeleniu iónov podľa ich pomeru m/z. Rozdiely výkonnosti analyzátorov závisia od dvoch parametrov:

- od *hmotnostného rozsahu* (od rozsahu, v ktorom sa môžu určovať veličiny m/z)
- od *rozlišovacej schopnosti*^{12,24}

Hmotnostný analyzátor je umiestnený za iontovým zdrojom (neutrálne molekuly sú už prevedené na ióny) a pred detektorom (pred detekciou sa musia ióny rozdeliť podľa m/z).

Separácia iónov podľa pomeru m/z sa dá dosiahnuť na základe rôznych fyzikálnych princípov:

1. zakrivenie dráhy letu iónov v magnetickom alebo elektrickom poli – **magnetické analyzátory**
2. rôzna stabilita oscilácie iónov v dvoj- alebo trojrozsmernej kombinácii jednosmerného a vysokofrekvenčného napätia – **kvadrupóly a iónové pastí**
3. rôzna doba letu iónov v oblasti bez poľa – **analyzátor doby letu – TOF**
4. rôzna frekvencia harmonických oscilácií v **Orbitrapu**
5. rôzne absorpcie energie pri cykloidálnom pohybe iónov v kombinovanom magnetickom a elektrickom poli – **iónová cyklotrónová rezonancia – ICR**²⁴

Separácia iónov v analyzátore prebieha za vysokého vákua (cca 10^3 – 10^{11} Pa)²⁴.

2.3.2.1 Kvadrupólový analyzátor

Zariadenie pozostáva zo štyroch paralelných tyčí hyperbolického alebo kruhového prierezu vytvárajúce hyperbolické kvadrupólové pole. Tyče v diagonále sú navzájom spojené a pripojené k zdrojom jednosmerného a rádiofrekvenčného napätia. Výsledné napätie má konštantnú zložku a zložku, ktorá sa mení. Ióny vzniknuté v iontovom zdroji sa prenášajú a rozdeľujú zmenou napätia na tyčiach pri stálom pomere konštantnej a meniacej sa zložky napätia.

Operačná línia daná pomerom U/V umožňuje vybrať oblasť stabilných dráh pre zvolený pomer U/V , ktorá udáva, pre ktoré hodnoty pomeru m/z je filter priepustný. Hodnotou pomeru U/V sa dá ovplyvňovať rozlíšenie a citlivosť filtru (pre $U=0$ je priepustnosť 100 %, rozlíšenie 0).

Väčšina kvadrupólových analyzátorov pracuje v hmotnostnom rozsahu od 1 u do 2000 u a niektoré až do rozsahu 4000 u. Nevýhodou je teda diskriminácia iónov s vyššou molekulovou hmotnosťou^{12,23}.

2.3.3 Zber signálu

Existujú tri základne spôsoby:

Režim úplného spektra: zmeranie hmotnostného spektra v celom študovanom rozsahu m/z. Výsledky sú kvalitatívne a na identifikáciu možno použiť referenčné knižnice spektier.

Selektívny záznam jedného alebo viac iónov (SIM, Selected Ion Monitoring): meriame iba závislosť signálu vybraného iónu na čase (alebo viac iónov)

Selektívny záznam jednej alebo viac iónových reakcií (SRM, Selected Reaction Monitoring): zaznamenáva sa konkrétny monomolekulový alebo bimolekulový rozpad zvoleného prekursorového iónu analyzovanej látky. Metóda je najvhodnejšia pre kvantitatívne štúdie s použitím vnútorných štandardov. Tento typ analýzy sa môže vykonať iba na zariadeniach s analyzátorom s tromi kvadrupólmi za sebou, analyzátorom typu iónová past' alebo typu cyklotrónová rezonancia^{12,24}.

SIM a SRM sú vhodné predovšetkým pre stopovú analýzu, kde sa vlastne nejedná o meranie hmotnostných spektier, ale iba o záznam signálu odpovedajúci nami vybranému a známemu iónu alebo produkovanému fragmentovanému iónu²⁴.

2.3.4 Detekcia signálu a spracovanie dát

Rozdelené ióny analyzátorom sa konvertujú na elektrické signály detekčným systémom, fotonásobičom alebo elektrónovým násobičom. Tieto signály sa pred spätnou konverziou na digitálne signály zosilňujú pre spracovanie údajov, čím umožňujú rozličné funkcie, ako napríklad kalibráciu, rekonštrukciu spektier atď.

Všetky fyzikálne parametre potrebné na fungovanie zariadenia ako celku riadi počítač¹².

2.4 INTERPRETÁCIA HMOTNOSTNÝCH SPEKTIER

Využitie informácií o obecných zákonitostiach fragmentácie iónov rôznych tried zlúčenín umožňuje interpretovať hmotnostné spektrum danej zlúčeniny a na základe tohto spektra určiť štruktúru neznámej zlúčeniny.

Hmotnostné spektrum obvykle zobrazuje hmotnosť parentného iónu a hmotnosti produktových iónov vznikajúcich po ionizácii a fragmentácii parentného iónu.

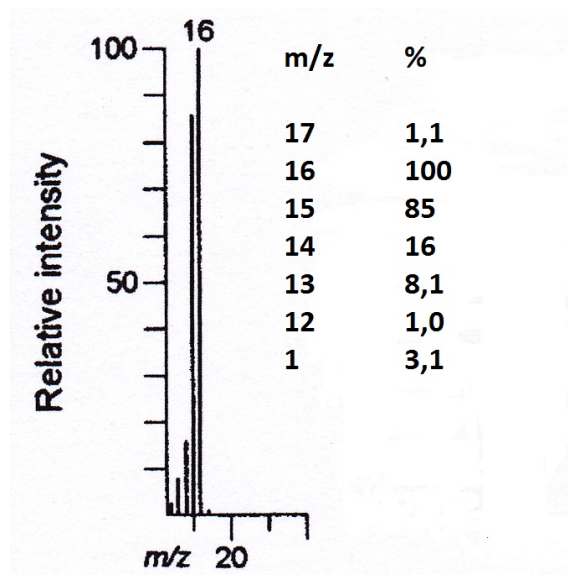
Naučiť sa interpretovať štruktúru jednotlivých látok na základe elektrónovo-ionizačných (EI) hmotnostných spektier je omnoho ľahšie ako z iných typov spektier²¹.

2.4.1 Hmotnostné spektrum

Hmotnostné spektrá sú vždy uvádzané v normalizovanom tvare. To znamená, že najintenzívnejšej hodnote m/z spektra je priradená relatívna intenzita 100 % a intenzity ostatných hodnôt m/z sa dopočítajú. Okrem grafickej formy sa spektrum uvádza aj v tabulárnej forme (presne uvedené intenzity, ale málo prehľadné pre interpretáciu), ako to je znázornené na Obr. 3²⁵.

Pri použití väčšiny ionizačných techník vznikajú ióny s jedným elementárnym nábojom a preto hodnota na ose x odpovedá priamo hmotnosti iónu. To však neplatí v prípade vzniku viacnásobne nabitých iónov²⁶.

Relatívny výskyt iónov v zázname spektra závisí na ich stabilite²⁷.



Obr. 3: Hmotnostné spektrum²⁰. Osa y znázorňuje relatívnu intenzitu v %, osa x znázorňuje pomer hmotnosti a náboja m/z ²¹.

V hmotnostnom spektre je zaznamenaný každý dopadajúci ión. Preto v prípade existencie prirodzených izotopov prvkov obsiahnutých v molekule je daný ión prítomný niekoľkými hmotnosťami v závislosti na hmotnosti izotopov, ako to ukazuje Tab. 9²⁶.

Zastúpenie izotopov bežných organických prvkov							
Prvok	“M“		“M+1“		“M+2“		Typ prvku
	m/z	%	m/z	%	m/z	%	
H	1	100	2	0,015	—	—	“M“
C	12	100	13	1,1	—	—	“M+1“
N	14	100	15	0,37	—	—	“M+1“
O	16	100	17	0,04	18	0,2	“M+2“
F	19	100	—	—	—	—	“M“
Si	28	100	29	5,1	30	3,4	“M+2“
P	31	100	—	—	—	—	“M“
S	32	100	33	0,79	34	4,4	“M+2“
Cl	35	100	—	—	37	32	“M+2“
Br	79	100	—	—	81	97,3	“M+2“
I	127	100	—	—	—	—	“M“

Tab. 9: Zastúpenie izotopov bežných organických zlúčenín²⁷.

2.4.2 Klasifikácia iónov

Podoba nameraného spektra výrazne závisí na spôsobe ionizácie, preto je vždy nutné uvádzať akým spôsobom a za akých podmienok bola molekula ionizovaná. V prípade elektrónovej ionizácie (EI) predstavuje ión s najväčšou hmotnosťou molekulárny ión radikál M^+ , v prípade chemickej ionizácie (CI) ión $[M+H]^+$ alebo $[M-H]^-$. Do úvahy sa neberú izotopické píky²⁶.

OE⁺ ióny (Odd Elektron Ion) – obsahujú **nepárny počet elektrónov**, sú reaktívne, nestabilné.

EE⁺ ióny (Even Electron Ion) – obsahujú **párny počet elektrónov** a sú všeobecne viac stabilné²⁷.

Poradie stability molekulárnych iónov M^+ :

aromatické zlúčeniny > konjugované olefiny > cyklické látky > sulfidy > nerozvetvené uhľovodíky > ketóny > amíny > estery > étery > karboxylové kyseliny > rozvetvené uhľovodíky > alkoholy²⁵

2.4.3 Fragmentácia iónov

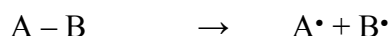
Je dôležité, aby procesy ionizácie a fragmentácie prebiehali pri nízkom tlaku plynnej fázy, kedy sa zabráni vzájomným zrážkam iónov a molekúl. Fragmentácie iónov prebiehajú ako monomolekulové reakcie²¹.

Stevenson-Audierovo pravidlo: pri monomolekulárnom rozpade iónu $OE^{+\bullet}$ $[AB]^{+\bullet}$ môžu teoreticky vzniknúť dve série iónu a radikálu: $[A]^+$ a B^\bullet alebo A^\bullet a $[B]^+$. Vznikne prevažne ión s nižšou ionizačnou energiou, presnejšie pomer intenzít iónov v spektre sa bude riadiť pomerom ich ionizačných energií $[A]^+ : [B]^+ = IE(A) : IE(B)$.

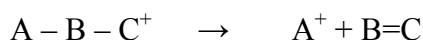
Platí aj pre ióny s EE^+ ²⁵.

Základné spôsoby štiepenia väzieb:

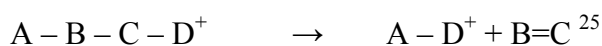
1. **homolytické štiepenie** – z dvojelektrónovej väzby získajú oba fragmenty po jednom elektróne.



2. **heterolytické štiepenie** – z dvojelektrónovej väzby získa oba elektróny jeden fragmentovaný ión.



3. **prešmykové reakcie** – štiepenie najmenej dvoch väzieb a vznik novej väzby. Dôjde k prenosu určitej skupiny na iné miesto molekuly.



Analyty sú ionizované podľa toho aké vlastnia elektróny:

n-elektróny (voľný elektrónový pár – heteroatómy N, S, O, halogény) >

π -konjugované elektróny (aromáty) >

π -nekonjugované elektróny (alkény) >>

σ -elektróny (alkány, C-C väzba) >

σ -elektróny (alkány, C-H väzba)²⁷

2.4.3.1 Základné typy fragmentácie

Priame štiepenie σ väzby:

Stratou jedného elektrónu z jednoduchej väzby dôjde k jej výraznému oslabeniu, čo často vedie priamo k fragmentácii. Pre nasýtené uhl'ovodíky je to energeticky najmenej náročný proces.

Štiepenie bude prednostne dochádzať v mieste rozvetvenia, pretože stabilita vznikajúcich iónov je v poradí: terciárny > sekundárny > primárny. To umožňuje určiť polohu rozvetvenia.

α -štiepenie (iniciácia radikálovým centrom)

Hnacou silou je snaha nepárového elektrónu vytvoriť elektrónový pár. Nepárny elektrón je donorom pre vytvorenie novej väzby so susedným atómom, čo je doprevádzané štiepením inej väzby na tomto atóme. Náboj ostáva na rovnakom mieste, radikál migruje.

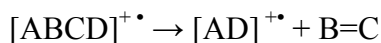
Schopnosť radikálových centier iniciovať reakcie je zhodná s ich schopnosťou byť elektrónovým donorom: N > S, O, π , R[•] > Cl > Br > I

i-štiepenie (iniciácia nábojovým centrom)

Hnacou silou je príťažlivosť elektrónového páru kladným nábojovým centrom. Je menej časté v porovnaní s α -štiepením.

McLaffertyho prešmyk(β -štiepenie s prešmykom vodíka)

V prešmykovej reakcii dochádza k vytvoreniu novej väzby na iný atóm a zániku inej väzby a následnému uvoľneniu neutrálneho fragmentu (dôjde k prešmyku časti molekuly).



Pre uskutočnenie tohto prešmyku je potreba splniť tri základné podmienky:

1. ión s nepárnym počtom elektrónov
2. zlúčenina s dvojitou väzbou
3. prítomnosť γ -vodíka²⁵

2.4.4 Pravidlo párneho počtu elektrónov (Even-Electron Rule)

Je to pravidlo, ktoré uvádza, že z iónov s párnym počtom elektrónov prednostne vznikajú opäť fragmenty iónov s párnym počtom elektrónov. K vzniku kation-radikálov sa vyžaduje energeticky veľmi nevýhodné rozdelenie elektrónového páru.



Fragmentáciou iónov s nepárnym počtom elektrónov môžu vznikať opäť ióny s nepárnym počtom alebo s párnym počtom elektrónov.

Všeobecne sú ióny s párnym počtom elektrónov stabilnejšie ako s nepárnym a preto je v spektre väčšina iónov s párnym počtom elektrónov²⁵.

2.4.5 Obecný postup interpretácie EI spektier

- a). Určenie M_r a overenie pravidiel pre $M^{+\bullet}$:
 1. Najvyšší m/z , 2. $OE^{+\bullet}$, 3. Logické neutrálne straty (zakázané straty 4–14, 21–25).
- b). Určenie M+2 prvkov – najskôr Cl+Br, potom S+Si a nakoniec odhad O.
- c). Dusíkové pravidlo.
- d). Odhad počtu uhlíku podľa pomeru $^{13}C/^{12}C$ (aj pre fragmenty).
- e). Určenie aromatickej série m/z 26–27, 38–39, 50–52, 63–65, 75–78, 91 (izotopový ión) a 92.
- f). Určenie alifatickej série – 15, 29, 43, 57, 71, 85, 99 atď.
- g). Nájdenie iónov s nepárnym počtom elektrónov, identifikácia.
- h). Série iónov, logické straty.
- i). Sumarizácia všetkých informácií, dopočet hmotnosti, návrh štruktúry (zváženie všetkých potenciálnych možností!).
- j). Spätná kontrola návrhu štruktúry, overenie meraním za rovnakých podmienok²⁵.

2.4.5.1 Určenie molekulovej hmotnosti (M_r)

Pre určenie iónu $M^{+\bullet}$ platí:

1. Ión s najvyššou hodnotou m/z v spektre. Izotopické píky sa neberú v úvahu.

Ión s najvyššou hmotnosťou nájdený v EI spektre však nemusí byť vždy iónom molekulárnym. Ak je molekula málo stabilná (ak je excitačná energia príliš vysoká), nemusí byť molekulárny ión v spektre prítomný.
2. Musí to byť ión s nepárnym počtom elektrónov $OE^{+\bullet}$ (Odd Elektron)
3. Ión $M^{+\bullet}$ obvykle poskytuje logické straty menších neutrálnych molekúl alebo radikálov, napr. 15 (methyl), 18 (voda), 28 (ethylen alebo CO) a podobne. Nesmú sa vyskytovať tzv. zakázané straty z molekulárneho iónu (4–14 a 21–25). Tieto straty sú vysoko nepravdepodobné a ich prítomnosť ukazuje na nesprávne určenie molekulárneho iónu²⁵.

2.4.5.2 Identifikácia M+2 prvkov

Pokiaľ hmotnostné spektrum neobsahuje izotopické píky M+2 s intenzitou väčšou ako 25 % (vid' Tab. 9), dá sa spoľahlivo vylúčiť prítomnosť Cl a Br.

$^{35}\text{Cl} : ^{37}\text{Cl} = \text{M} : \text{M}+2 = 100 : 32$ (približne 3:1)

$^{79}\text{Br} : ^{81}\text{Br} = \text{M} : \text{M}+2 = 100 : 97,3$ (približne 1:1)²⁷

2.4.5.3 Dusíkové pravidlo

Toto pravidlo vychádza z toho, že dusík je jediný z bežných organických prvkov, ktorý má párne atómové číslo a nepárnu väzbovosť.

Pravidlo platí pre bežné organické prvky (C, H, N, O, F, Si, P, S, Cl, Br, I)

Základná formulácia platí pre M_r a OE^{++} :

Nepárna molekulová hmotnosť M_r = nepárny počet dusíku v molekule

Párna molekulová hmotnosť M_r = párny počet dusíku v molekule alebo nula

Pre ióny EE^+ je to presne naopak:

Nepárna hodnota m/z znamená párny počet dusíkov alebo žiadny; párna hodnota m/z znamená nepárny počet dusíkov²⁵.

Dusíkové pravidlo je zjednodušene znázornené v Tab. 10.

Počet dusíkov	m/z nepárna	m/z párna
0, 2, 4, ... (párny počet)	EE^+	OE^{++}
1, 3, 5, ... (nepárny počet)	OE^{++}	EE^+

Tab. 10: Dusíkové pravidlo²⁵.

2.4.5.4 Odhad počtu uhlíku podľa pomeru $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

Pre odhad počtu uhlíku v molekule je charakteristická prítomnosť ^{13}C (1,1 %) vedľa ^{12}C , pretože existencia prirodzených izotopov prvku v molekule udáva, že daný ión je prítomný na niekoľkých hmotnostiach v závislosti na hmotnosti izotopov²⁶.

2.4.5.5 Identifikácia iónov

Charakteristická je prítomnosť niektorých iónov z nízkej oblasti spektra. Logická strata m/z 15, 29, 43, 57 atď. je typická pre nasýtené uhl'ovodíkové ióny, strata 27, 41, 55 atď. odpovedá nenasýtenému reťazci alebo cyklickej štruktúre, u prítomnosti kyslíka sú typické ióny 31, 45 atď., pre amíny a ďalšie dusíkaté látky sú typické straty 30, 40 atď.²⁶.

V Tab. 11 sú znázornené vybrané série funkčných skupín v porovnaní s alkylovou sériou (koeficient).

Funkčná skupina	Vzorec	Koeficient	m/z séria
Alkyl	$[C_nH_{2n+1}]^+$	0	15, 29, 43, ...
Nitril	$[C_nH_{2n-2}N]^+$	-3	40, 54, 68, ...
Alkenyl, cykloalkenyl	$[C_nH_{2n-1}]^+$	-2	27, 41, 55, ...
Aldehydy, ketóny	$[C_nH_{2n-1}O]^+$	0	29, 43, 57, ...
Amíny	$[C_nH_{2n+2}N]^+$	+1	30, 44, 58, ...
Alkoholy, étery	$[C_nH_{2n+1}O]^+$	+2	31, 45, 59, ...
Kyseliny a estery	$[C_nH_{2n-1}O_2]^+$	+2	45, 59, 73, ...
Thioly, sulfidy	$[C_nH_{2n+1}S]^+$	+4	33, 47, 61, ...
Chloralkyly	$[C_nH_{2n}Cl]^+$	-8	35, 49, 63, ...

Tab. 11: Vybrané funkčné skupiny a ich logické straty m/z²⁵.

2.4.5.6 Ďalšie ióny a ich logické straty

Fluór a jód:

- sú monoizotopické

Prítomnosť jódu sa dá poznať podľa straty 127 (I^{*}) – výnimočne 128 (HI). Obvykle je podozrenie o prítomnosti jódu dopredu známa vďaka informáciám o vzorke.

Fluór a jeho väzba na uhlík je pomerne pevná. Na jeho prítomnosť ukazuje strata m/z 20 (HF).

Fluórované látky podliehajú rozsiahlej fragmentácii.

Prefluórované látky majú rozsiahle fragmentácie, často bez molekulárneho iónu. Sú pozorované straty 31 (CF), 50 (CF₂), 69 (CF₃)²⁵.

2.4.6 Ring plus Double Bonds Rule (číslo nenasýtenosti)

Udáva počet násobných väzieb alebo kruhov, pričom sa vychádza z predpokladu, že uhlík je štvorväzbový, dusík je trojväzbový, kyslík a síra sú dvojväzbové a vodík a halogén sú jednoväzbové.

$$R+db = x - \frac{1}{2} y + \frac{1}{2} z + 1$$

x = počet atómov uhlíku v molekule

y = počet atómov vodíka a halogénov

z = počet atómov dusíka

Počet dvojväzbových atómov (O, S, ...) sa vo výpočte neprejavuje²⁶.

2.4.7 Interpretácia hmotnostných spektier s použitím mäkkých ionizačných techník

Chemickou ionizáciou vznikajú molekulárne ióny v tvare $[M+H]^+$ alebo $[M-H]^-$. Nie sú to kation-radikálové ióny, takže nevznikajú ióny s nepárnym počtom elektrónov OE^+ . Preto sa pri interpretácii hmotnostných spektier riadime pravidlami iónov s párnym počtom elektrónov EE^+ . Sú stálejšie a stabilnejšie ako OE^+ .

Keďže mechanizmus vzniku iónov môže byť odlišný ako pri elektrónovej ionizácii, nedajú sa preto uplatniť všetky spomínané pravidlá.

Hmotnosť molekulového iónu je na rozdiel od reálnej hmotnosti navýšená o hodnotu 1 pokiaľ sa jedná o pozitívnu chemickú ionizáciu alebo znížená o hodnotu 1 pri negatívnej chemickej ionizácii.

2.5 ĎALŠIE METÓDY IDENTIFIKÁCIE NEZNÁMEJ ŠTRUKTÚRY

Medzi metódy identifikácie neznámych molekúl patria okrem už spomínanej hmotnostnej spektrometrie aj ďalšie metódy, ako napríklad:

2.5.1 Absorpčná spektrometria vo viditeľnej a ultrafialovej oblasti

Absorpčné spektrá v UV oblasti (200–400 nm) a vo viditeľnej oblasti (400–760 nm) sa nazývajú elektrónové spektrá. Elektromagnetické žiarenie týchto vlnových dĺžok spôsobuje prechod elektrónov do vyšších energetických hladín. Excitáciou podliehajú najmä elektróny.

V UV oblasti absorbujú liečivá obsahujúce skupiny s dvojnými alebo trojnými väzbami, tzv. chromofory.

Vo viditeľnej oblasti absorbujú liečiva, ktoré majú v molekule niekoľko konjugovaných väzieb.

Poloha a intenzita elektrónových absorpčných pásov v spektre (tj. maxima a minima pri určitých vlnových dĺžok) je závislá na štruktúre analyzovaného liečiva, najmä typu a počtu chromoforov v molekule. Pre dôkaz totožnosti sa musia zhodovať odčítané hodnoty spektra analyzovanej látky s hodnotami UV spektra štandardu².

2.5.2 Luminiscenčná spektrometria vo viditeľnej a ultrafialovej oblasti

Fotoluminiscencia je proces, pri ktorom chemická látka absorbuje fotón vhodnej vlnovej dĺžky (primárne elektromagnetické žiarenie). Takto sa excituje do vyššieho energetického stavu. Po určitej dobe dochádza k opätovnému vyžiareniu fotónu (sekundárne žiarenie) a návratu molekuly na základnú energetickú hladinu. Ak látka emituje žiarenie po ukončení excitácie 10^{-8} až 10^{-4} s, hovorí sa o **fluorescencii**, ak emisia trvá 10^{-4} až 10^1 s a dlhšie, hovorí sa o **fosforescencii**.

Luminiscencia organických molekúl sa vyskytuje väčšinou pri molekulách látok s konjugovanými dvojitými väzbami (najmä pri aromatických zlúčeninách) a látkach s rigidnou planárnou multicyklickou štruktúrou. Skupiny v molekule, na ktorých dochádza k luminiscencii (fluorescencii) sa nazývajú luminofory. Molekuly látok, ktoré obsahujú luminofory, sú schopné fluorescencie a nazývajú sa fluorofory^{28,29}.

2.5.3 Infračervená (IR) spektrometria

Infračervené žiarenie (vlnočty $13000\text{--}10\text{ cm}^{-1}$) nemá dostatočnú energiu, aby pri interakcii s molekulou zmenilo jej elektrónový stav – mení sa iba jej **vibračný a rotačný stav**. Pri absorpcii IR žiarenia molekulami dochádza k zvýšeniu ich E_{VIB} (v plynovej fáze aj E_{ROT}). IR spektrá poskytujú informácie o vibračnom pohybe molekuly, ktoré je možné využiť pri identifikácii látok a určovaní ich štruktúry.

V IR spektrách sledujeme závislosť transmitácie alebo absorpcie na vlnočete absorbovaného žiarenia. Spektrum je pásové a pásy odpovedajú rôznym typom vibračných prechodov. IR spektrum sa rozdeľuje na dve oblasti:

Oblasť charakteristických skupinových vibrácií - $4000\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$. oblasť sa využíva pre identifikáciu funkčných skupín v molekule.

Oblasť odtlačku palca: $1000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Tu dochádza k deformačnej vibrácii ovplyvnenej štruktúrou molekuly a umožňuje identifikovať konkrétnu látku³⁰.

2.5.4 Ramanová spektrometria

Ramanové spektrá, rovnako ako infračervené spektrá poskytujú informácie o vibračných a rotačných pohyboch polyatomických častíc. Frekvencia normálnych vibračných módov závisí na hmotnostiach atómov a na sile väzby medzi nimi. Identifikačné možnosti Ramanovej spektrometrie sú zrovnateľné s potenciálom infračervenej spektrometrie. Rozdielom oboch techník je v intenzite spektrálnych línii. V Ramanových spektrách sú obzvlášť intenzívne pásy viacnásobných symetrických väzieb, to znamená, že najintenzívnejšie pásy sú pre symetrické vibrácie.

Z hľadiska kvalitatívnej informácie je možné porovnávať merané spektrá čistých látok s knižnicami spektier a tak identifikovať látky. Ramanové spektrum je pre identifikáciu výborným „odtlačkom palca“, ak sú hlavne dodržané podmienky, že Ramanové spektrá boli získané pre rovnaký fyzikálny stav látky. V porovnaní s infračerveným spektrom je Ramanové spektrum jednoduchšie a prehľadnejšie³¹.

2.5.5 Mikrovlnná spektrometria

Elektromagnetické vlnenie o vlnovej dĺžke 0,1–5 cm sa nazýva mikrovlnným žiarením. Absorbovaná energia odpovedá rotačným prechodom na vyššie energetické hladiny. Zo spektrálnych údajov sa dajú vypočítať momenty zotrvačnosti a z nich geometrické údaje o molekulách. Metóda sa dá použiť iba u látok s malou molekulovou hmotnosťou³².

2.5.6 Nukleárna magnetická rezonančná spektrometria (NMR)

Spektrometria NMR je založená na absorpcii vysokofrekvenčného žiarenia vzorkou, ktorá je umiestnená v magnetickom poli. V súčasnosti je najdôležitejšou metódou pre určovanie štruktúry organických látok, ktoré obsahujú jadra s nenulovým spinom, ktorý predstavuje vlastný vnútorný moment hybnosti. NMR teda študuje jadrá s jadrovým kvantovým číslom $I = 1/2$. Jadro rotuje okolo vlastnej osy a vytvára okolo seba magnetické pole. Ak sa jadro ocitne vo vonkajšom magnetickom poli, jeho magnetické momenty môžu zaujímať iba dve orientácie, o ktorých hovoríme ako o spinových stavoch α a β . Spinový stav α je zhodný s orientáciou vonkajšieho magnetického poľa a spinový stav β smeruje proti tomuto poľu. Oba stavy s rôznou orientáciou magnetického momentu voči vonkajšiemu poľu sa líšia svojou energiou, pričom viac jadier sa nachádza v stave α o nižšej energii. Čím väčšia je intenzita vonkajšieho poľa, tým väčší je rozdiel medzi stavmi α a β . Ak sa ocitne napríklad vzorka obsahujúce vodíkové atómy vo vonkajšom magnetickom poli a dodá sa elektromagnetické vlnenie o vhodnej frekvencii (oblasť rádiových vln), protóny sa excitujú zo stavu α do stavu β . Každý druh vodíkových atómov absorbuje energiu pri mierne odlišnej frekvencii, v závislosti na svojom chemickom okolí. Informácie, ktoré poskytuje NMR o jadre ^1H sú cenné pre široké zastúpenie vodíka v anorganických a organických molekulách i iónoch. Informácie o jadre ^{13}C sú významné pre štúdium organických molekúl. Získané informácie sú dvojakého druhu: informácia o štruktúre látky a informácia o priestorovom usporiadaní^{29 32}.

2.5.7 Spektrometria elektrónovej paramagnetickej rezonancie (EPR)

Elektrónová paramagnetická rezonancia je založená na absorpcii mikrovlnného žiarenia vzorkou umiestnenou v magnetickom poli.

Nespárené elektróny v zlúčeninách (radikáloch) vykazujú magnetický moment. V magnetickom poli o indukcii B sa rozštiepia energetické hladiny magnetického momentu na hladinu α a hladinu β , podobne ako v NMR. Rozdiel v energii hladín je úmerný indukcii magnetického poľa. Ak je v blízkosti nespáreného elektrónu jadro s magnetickým momentom, dochádza k ďalšiemu štiepeniu energetických hladín. Pôsobením elektromagnetického žiarenia v mikrovlnnej oblasti môže nastať absorpcia žiarenia.

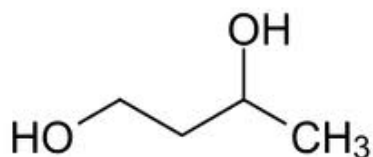
Metóda sa používa na štúdium štruktúry radikálov, predovšetkým organických, na štúdium procesov štiepenia molekúl a vzniku i zániku radikálov²⁹.

2.6 FYZIKÁLNO-CHEMICKÉ VLASTNOSTI BUTAN-1,3-DIOLU

Synonymá: 1,3-butandiol, 1,3-Butylene glycol, β-butylene glycol

Chemický názov	Butan-1,3-diol
C.A.S číslo	107-88-0
Chemický vzorec	C ₄ H ₁₀ O ₂ / CH ₃ CHOHCH ₂ CH ₂ OH

Chemická štruktúra



Molekulová hmotnosť	90,12
---------------------	-------

Popis bezfarebná, bez zápachu, hygroskopická, viskózna tekutina

Použitie rozpúšťadlo

Fyzikálne vlastnosti

Rozpustnosť neobmedzene miešateľný s vodou, acetónom, etanolom a čiastočne rozpustný v étere. Je nerozpustný v olejoch. Rozpúšťa väčšinu silíc a syntetické aróma

Hustota 1,004–1,006

Teplota tuhnutia -50 °C

Teplota varu 207,5 °C

Teplota samovznietenia 394 °C^{33,34}

Butan-1,3-diol pôsobí lokálne dehydratačne. Má aj baktericídny účinok a spektrum jeho pôsobenia zahrňuje aj zárodky významné pre lokálnu antiseptiku. Je často používaný ako pomocná látka bez dráždivého pôsobenia.

Aj pri jeho použití ako rozpúšťadla u injekčných prípravkov nebola zistená žiadna neznášanlivosť³⁵.

3 CIEĽ PRÁCE

Rigorózna práca je pokračovaním mojej diplomovej práce³⁶ a jej cieľom je:

- podrobiť oxidáciou butan-1,3-diol a pozorovať rozkladné produkty
- zistiť molekulovú štruktúru rozkladných produktov
- zistiť molekulovú štruktúru pozorovaných nečistôt alebo vedľajších produktov pri výrobe butan-1,3-diolu.

4 EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

4.1 CHEMIKÁLIE A PRÍSTROJE

4.1.1 Chemikálie

Butan-1,3-diol - Sigma Aldrich, ČR

Methanol - Lichrosolv Merck, ČR

Chloroform - Penta, ČR

Peroxid vodíka - Penta, ČR

Čistená voda

3-hydroxybutanal - Sigma Aldrich, ČR

Kyselina octová - Penta, ČR

Acetonitril - Sigma Aldrich, ČR

Kyselina para-toluensulfonová - Sigma Aldrich, ČR

Tetrahydrofurán - Balex, ČR

Ether - Lachema, ČR

Chloroform - Penta, ČR

Acetón - Penta, ČR

Toluén - Penta, ČR

4.1.2 Prístroje

Shimadzu Gas Chromatograph GC-2010 s FID

Shimadzu Gas Chromatograph GCMS-QP2010 Plus

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

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

PC program: GCMS solution Version 2.50 SU3, Shimadzu

GC solution Version 2.30.00 SU7, Shimadzu

Analytické váhy AND, Japonsko

Vákuová odparka BUCHI R-114

Magnetická miešačka

¹H NMR a ¹³C NMR spektrá - Varian Mercury Vx BB 300

TLC - dosky Merck Kieselgel 60 F254

Stĺpcová chromatografia – stacionárna fáza Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm)

4.1.3 Ďalšie pomôcky

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

4.2 PRÍPRAVA VZORIEK

4.2.1 Zát'azové skúšky

POSTUP:

Vzorka butan-1,3-diolu a 3%, 10% a 20% peroxidu vodíka a vody

Asi 1,0 g butan-1,3-diolu sa zmiešal a doplnil 3% peroxidom vodíku do 10 ml odmernej banky po risku. Vzorka sa vystavila zát'azovej skúške. Po prebehnutí reakcie sa z roztoku odobralo 0,5 ml vzorky do 10 ml odmernej banke a vzorka sa nariedila methanolom po risku. Takýmto spôsobom sa postupovalo aj pri príprave vzorky butan-1,3-diolu s 10% a 20% peroxidom vodíka a vodou.

Vzorka 0,05% kyseliny octovej

0,5 ml kyseliny octovej sa v 10 ml odmernej banke nariedila methanolom po risku. Z takto pripravenej vzorky sa ešte odobralo 0,1 ml vzorky a nariedilo sa v 10 ml odmernej banke methanolom po risku.

Vzorka butan-1,3-diolu, 10% peroxidu vodíka a kyseliny octovej

Postupovalo sa rovnako ako pri príprave vzorky butan-1,3-diolu a 10% peroxidu vodíka, ale ešte sa do roztoku pridalo 0,5 ml pripravenej vzorky 0,05% kyseliny octovej. Po zát'azovej skúške sa odobralo 0,5 ml roztoku a nariedilo methanolom v 10 ml odmernej banke po risku.

4.2.2 Reakcia butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanal v rôznych reakčných prostrediach

VZORKA (*roztok butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanal v prostredí methanolu s koncentrovanou kyselinou sírovou*)

POSTUP: Do vialky sa naváži asi 0,1 g butan-1,3-diolu a asi 0,1 g 3-hydroxybutanal (ekvimolárna zmes). Pridá sa 5 ml rozpúšťadla methanolu a pár kvapiek (1 až 3) koncentrovanej kyseliny sírovej (0,0008 g). Celá zmes sa nechá 1 hodinu zahrievať na magnetickej miešačke pri teplote 60 °C.

VZORKA (*roztok butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanal v prostredí methanolu a acetonitrilu s kyselinou para-toluensulfonovou a koncentrovanou kyselinou sírovou*)

POSTUP: Do vialky sa naváži asi 0,1 g butan-1,3-diolu a asi 0,1 g 3-hydroxybutanal (ekvimolárna zmes). Pridá sa 2,5 ml rozpúšťadla methanolu, 2,5 ml rozpúšťadla acetonitrilu

s kyselinou para-toluensulfonovou a pár kvapiek (1 až 3) koncentrovanej kyseliny sírovej (0,0008 g). Celá zmes sa nechá 1 hodinu zahrievať na magnetickej miešačke pri teplote 60 °C.

Reakčné prostredie

Kyseliny para-toluensulfonová v acetonitrile

Naváži sa 0,1100 g kyseliny para-toluensulfonovej do 25 ml odmernej banky a doplní acetonitrilom po risku.

VZORKA (*roztok butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanalú v prostredí tetrahydrofuránu a kyseliny para-toluensulfonovej*)

POSTUP: Do vialky sa naváži asi 0,12 g butan-1,3-diolu a 0,083 g 3-hydroxybutanalú – butan-1,3-diol je v nadbytku. Pridá sa 5 ml pripraveného rozpúšťadla tetrahydrofuránu s kyselinou para-toluensulfonovou. Celá zmes sa nechá zreagovať pri obvyčajnej teplote alebo sa nechá 1 hodinu zahrievať na magnetickej miešačke pri teplote 60 °C.

Reakčné prostredie

Kyselina para-toluensulfonová v tetrahydrofuráne

POSTUP: Naváži sa 0,1100 g kyseliny para-toluensulfonovej do 25 ml odmernej banky a doplní tetrahydrofuránom po risku.

VZORKA (*roztok butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanalú v prostredí acetonitrilu a koncentrovanej kyseliny sírovej*)

POSTUP: Do vialky sa naváži asi 0,12 g butan-1,3-diolu a 0,083 g 3-hydroxybutanalú – butan-1,3-diol je v nadbytku. Pridá sa 5 ml rozpúšťadla acetonitrilu. Celá zmes sa nechá zreagovať pri obvyčajnej teplote alebo sa nechá 15 minút zahrievať na magnetickej miešačke pri teplote 60 °C.

4.2.3 Určenie molekulovej hmotnosti a štruktúry skúmanej nečistoty

VZORKA(*roztok produktu 1-(4-methyl-1,3-dioxan-2-yl)propan-2-olu v rozpúšťadle*)

POSTUP: 37,5 mg produktu sa rozpustilo v methanole v 50 ml odmernej banke. Koncentrácia takto pripraveného roztoku bola 0,75 mg/ml.

VZORKA(*roztok butan-1,3-diolu v rozpúšťadle*)

POSTUP: do 25 ml odmernej banky sa naváži 37,5 mg butan-1,3-diolu a rozpustí v methanole. Takto sa pripraví roztok o koncentracii 1,5 mg/ml.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 ZÁŤAŽOVÉ SKÚŠKY

Chromatografické podmienky:

GC

Teplota injektoru	200 °C
Nosný plyn	He
Tlak	185,4 kPa
Rýchlosť	98,3 cm/sek
Split	1:3

Kolóna:

Supelcowax 10

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

Teplotný program

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

MS

Teplota iontového zdroja 200 °C

Záťažové skúšky s peroxidom vodíka:

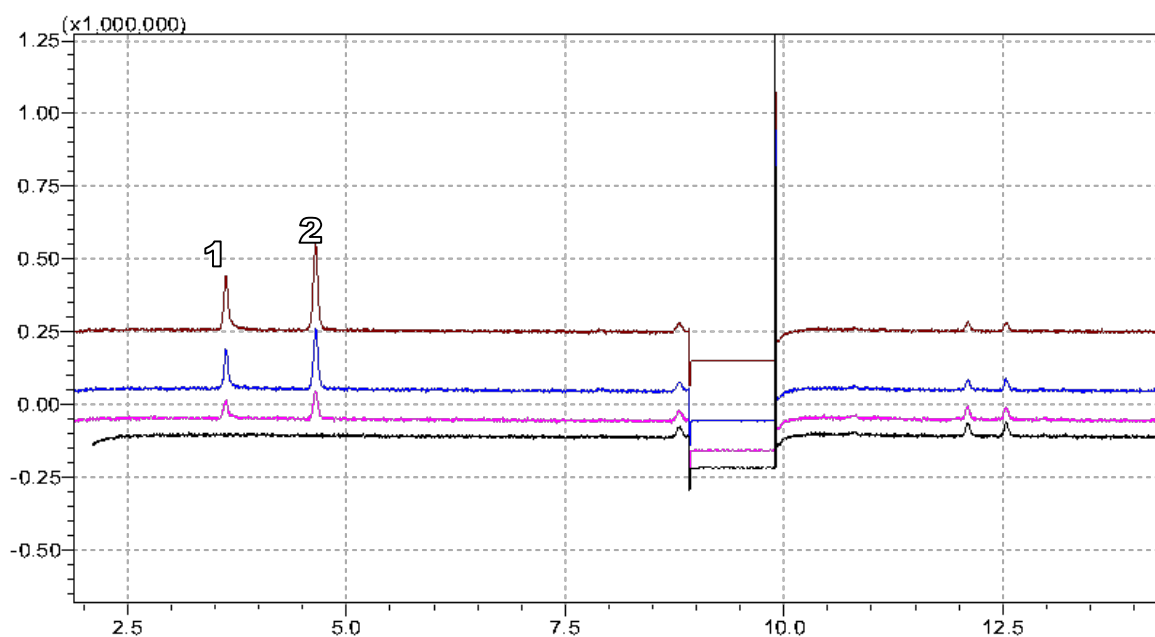
	Obr. 4, 7, 8	Obr. 9	Obr. 10, 11, 12
Rozmedzie detektoru	70–300 m/z	50–300 m/z	70–400 m/z (59–400 m/z)
Napätie na detektore zvýšené o	+0,4 kV	+0,25 kV	+0,4 kV

Porovnanie výsledkov rozkladného produktu a kyseliny octovej:

Rozmedzie detektoru	50–400 m/z
Napätie na detektore zvýšené o	+0,4 kV

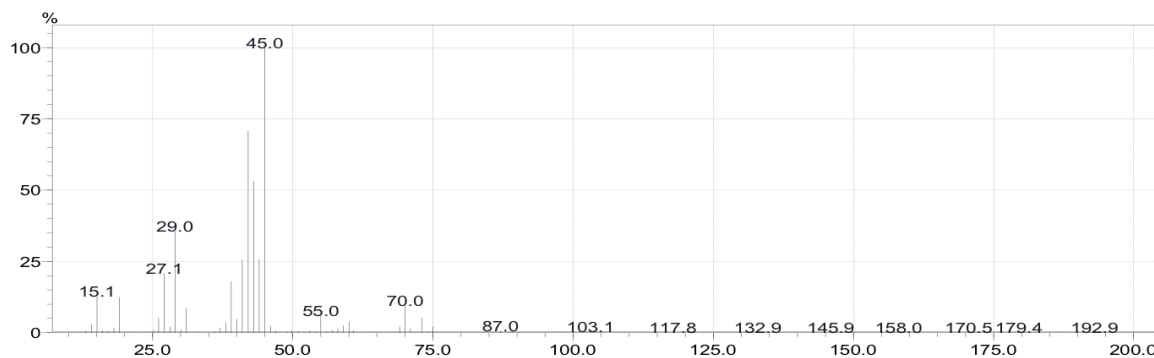
5.1.1 Zát'azové skúšky s peroxidom vodíka

Na Obr. 4 sú znázornené chromatogramy butan-1,3-diolu pri zát'azovej skúške oxidáciou s 3%, 10%, 20% peroxidom vodíka pri laboratórnej teplote pomocou ionizačného plynu isobutánu, pri tlaku 80 kPa a napätia na detektore zvýšeného o 0,4 kV. Vzorka s vodou bola použitá na porovnanie, že píky vznikajú oxidáciou a nie iným procesom, napr. hydrolyzou.

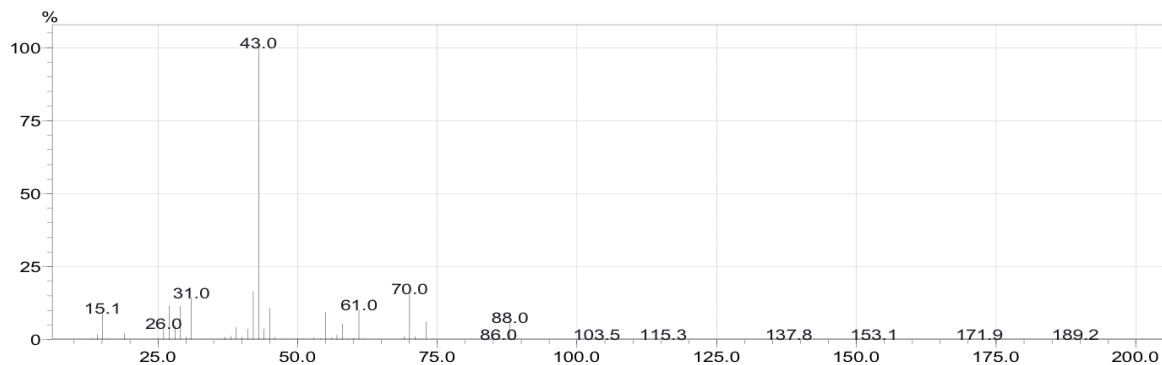


Obr. 4: Zát'azová skúška butan-1,3-diolu s **vodou** a **3%**, **10%**, **20%** peroxidom vodíka za laboratórnej teploty (CI, isobutan, 80 kPa, +0,4 kV).

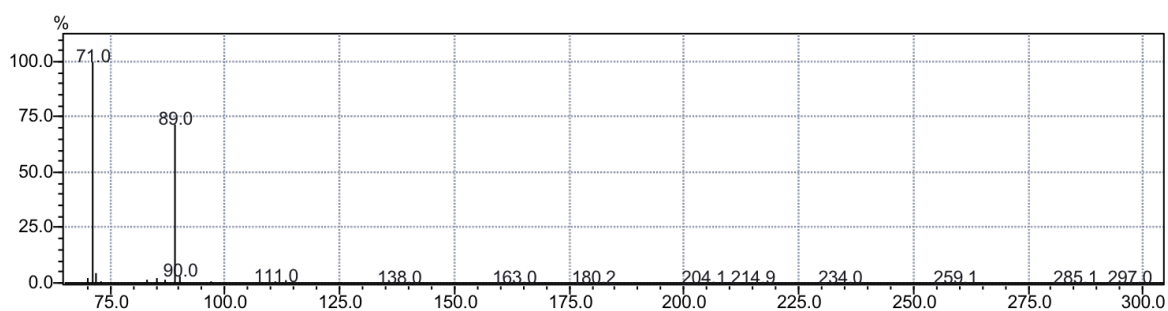
Vznikajú dve látky (pík 1 a 2), ktoré sú rozkladným produktom pôsobením peroxidu vodíka. Na Obr. 5 a 6 sú vidieť ich EI spektrá pre určenie ich štruktúry a na Obr. 7 a 8 sú ich CI spektrá pre potvrdenie molekulového iónu.



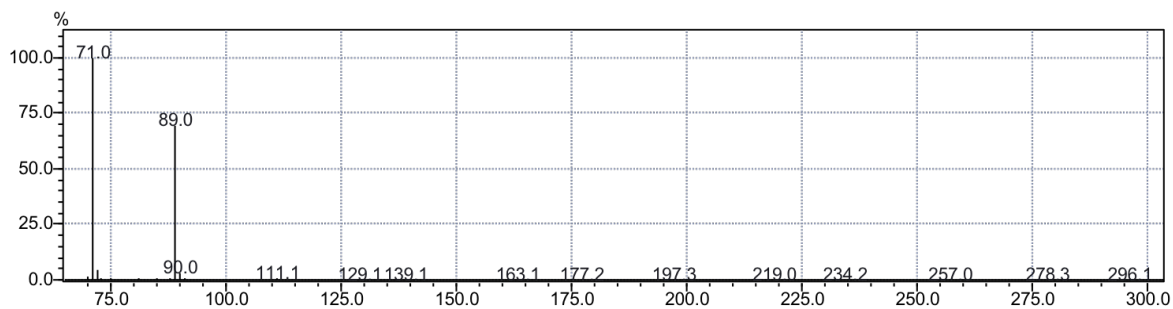
Obr. 5: EI spektrum látky 1 z Obr. 4.



Obr. 6: EI spektrum látky 2 z Obr. 4.



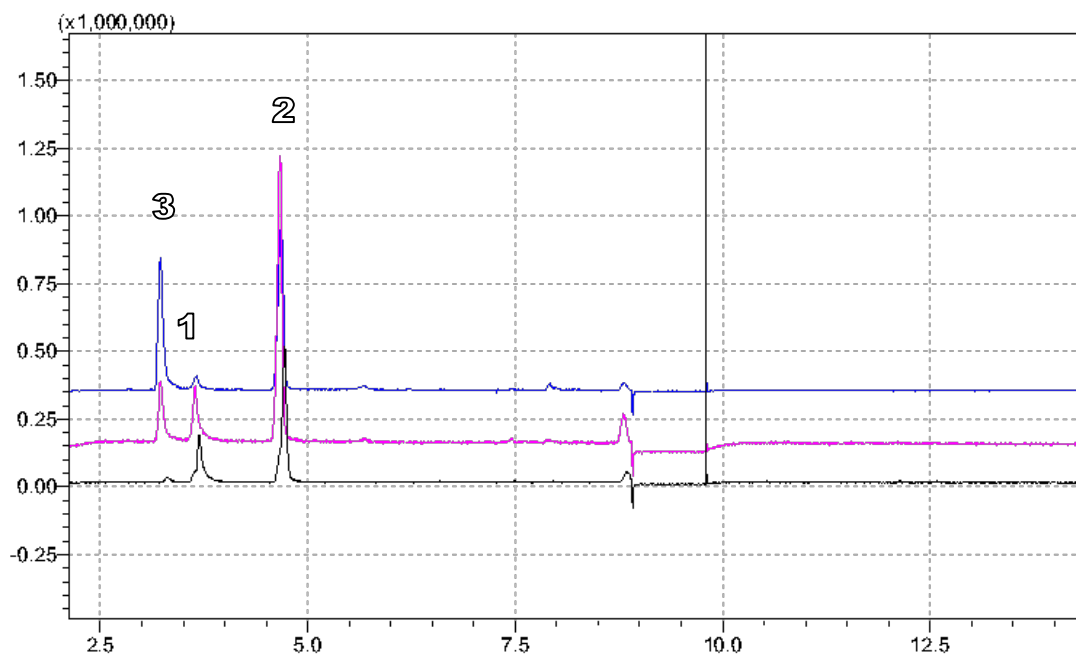
Obr. 7: Hmotnostné spektrum látky 1 z Obr. 4 (CI, isobutan, 80 kPa, +0,4 kV).



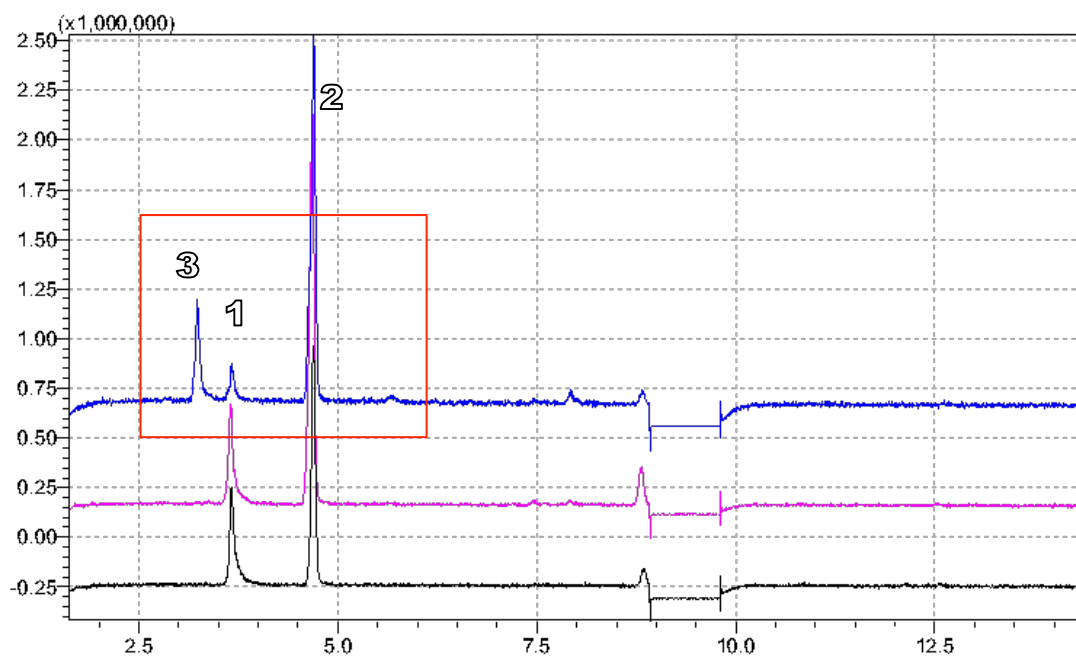
Obr. 8: Hmotnostné spektrum látky 2 z Obr. 4 (CI, isobutan, 80 kPa, +0,4 kV).

Obe vzniknuté látky majú nižšiu molekulovú hmotnosť ako má parentná látka. Z toho je zrejmé, že by sa mohlo jednať o oxidáciu OH- skupiny butan-1,3-diolu. Pomocou EI spektier a knižnici spektier boli látky určené ako aldehyd a ketón. Chemickou ionizáciou sme potvrdili ich molekulový ión a na základe kombinácie EI a CI spektier boli štruktúry identifikované ako 3-hydroxybutanal (látka 1) a 4-hydroxybutan-2-on (látka 2).

Po zvýšení teploty na 70 °C sa v priebehu času (72, 168 a 240 hodín) na chromatograme (Obr. 9 a 10) objavila látka 3. Z chromatogramov je vidieť, že dochádza k poklesu plochy píku 1 a teda látka 3 vzniká pravdepodobne ďalšou oxidáciou látky 1.

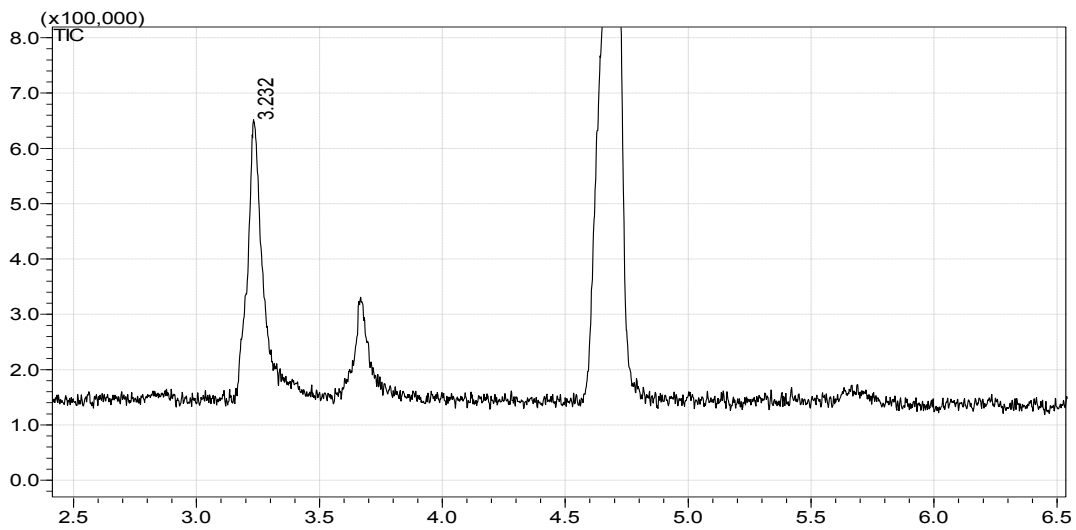


Obr. 9: Zátěžová skúška butan-1,3-diolu s 10% peroxidom vodíka pri teplote 70 °C a časoch 72 h, 168 h a 240 h (CI, methan, 300 kPa, +0,25 kV).

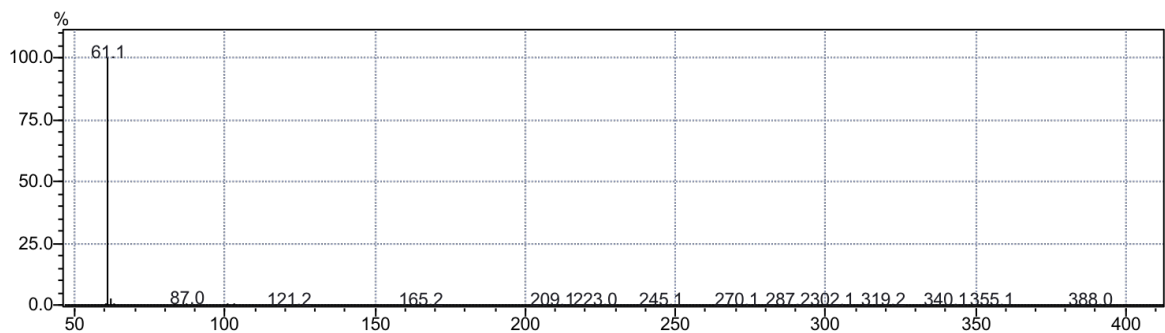


Obr. 10: Zátěžová skúška butan-1,3-diolu s 10% peroxidom vodíka pri teplote 70 °C o časoch 72 h, 168 h a 240 h (CI, isobutan, 80 kPa, +0,4kV).

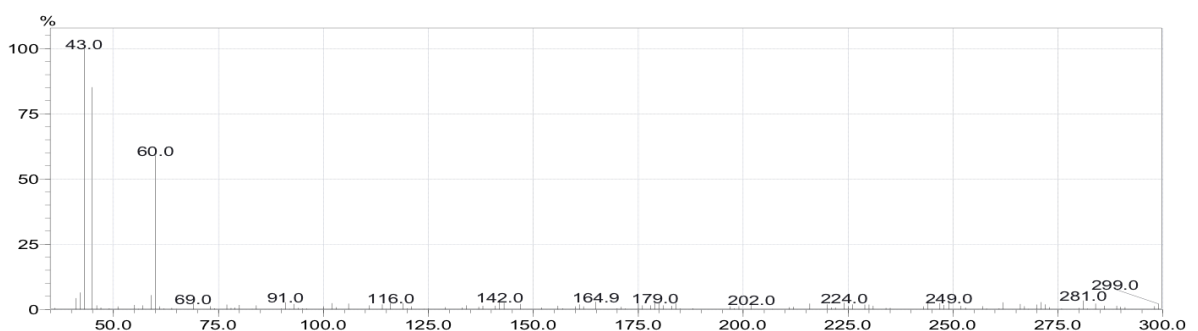
Na Obr. 11 je znázornená časť chromatogramu z Obr. 10, kde novovzniknutá látka má retenčný čas 3,2 a následne na Obr. 12 a 13 sú jej CI a EI spektrá.



Obr. 11: Časť chromatogramu pri záťažovej skúške butan-1,3-diolu s 10% peroxidom vodíka pri teplote 70 °C a čase 240 h (CI, isobutan, 80 kPa, +0,4 kV).



Obr. 12: Hmotnostné spektrum látky s retenčným časom 3,2 z Obr. 11 (CI, isobutan, 80 kPa, +0,4 kV).

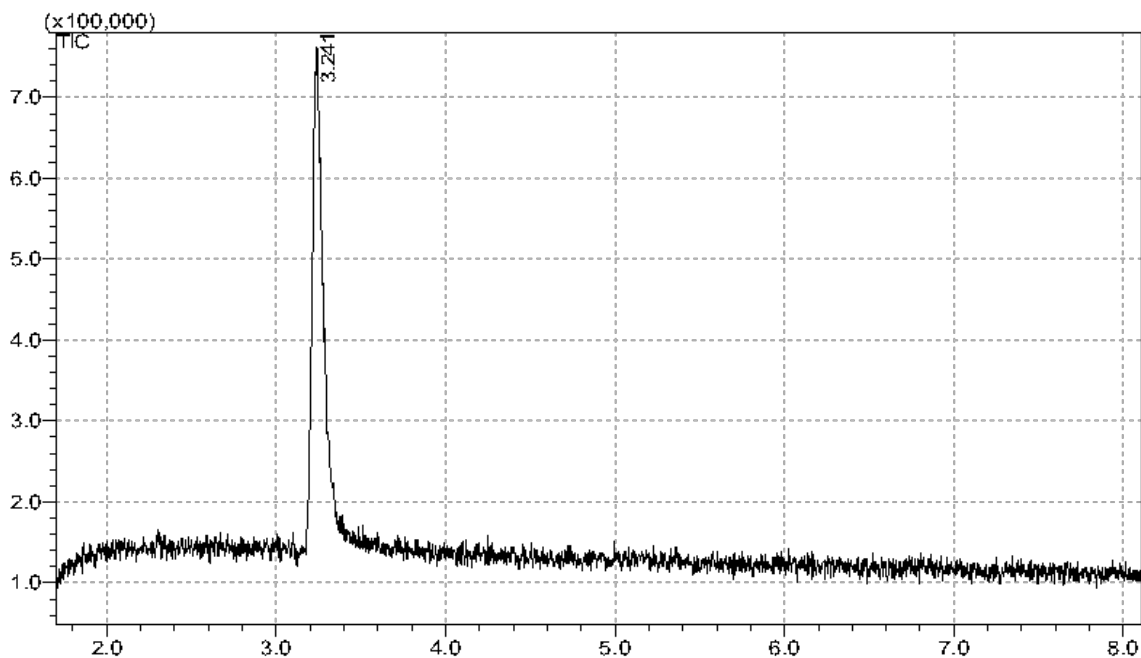


Obr. 13: EI spektrum látky s retenčným časom 3,2 z Obr. 11

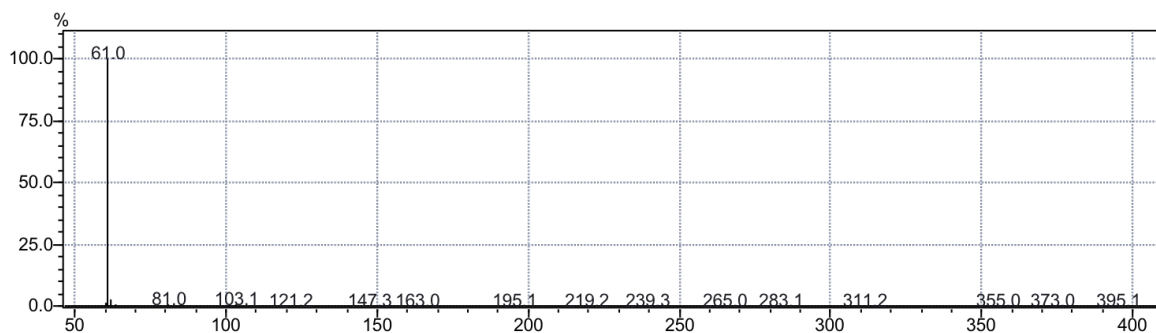
Z hmotnostného spektra sledovanej látky 3 na Obr. 12 je vidieť, že m/z odpovedá hodnote 61 ($M+H$)⁺. Pravdepodobne je táto látka kyselina octová, čo sa ešte overilo pomocou elektrónovej ionizácie (Obr. 13), ktorá bola urobená dodatočne. Pre potvrdenie tejto hypotézy sa ďalej pokračovalo s pokusmi s kyselinou octovou.

5.1.2 Porovnávanie výsledkov rozkladného produktu a kyseliny octovej

Pík s retenčným časom 3,2 na chromatograme (Obr. 14) znázorňuje 0,05% kyselinu octovú. Na Obr. 15 je jeho hmotnostné spektrum.

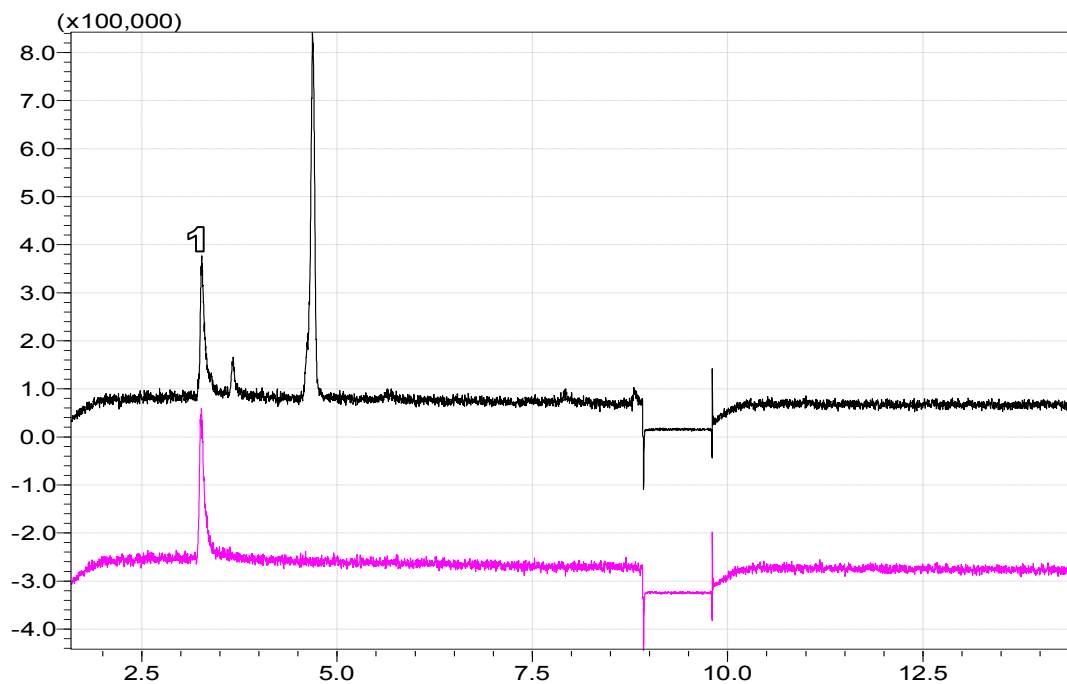


Obr. 14: Chromatogram 0,05% kyseliny octovej pri 70 °C a čase 240 h (CI, isobutan, 80 kPa, +0,4 kV).



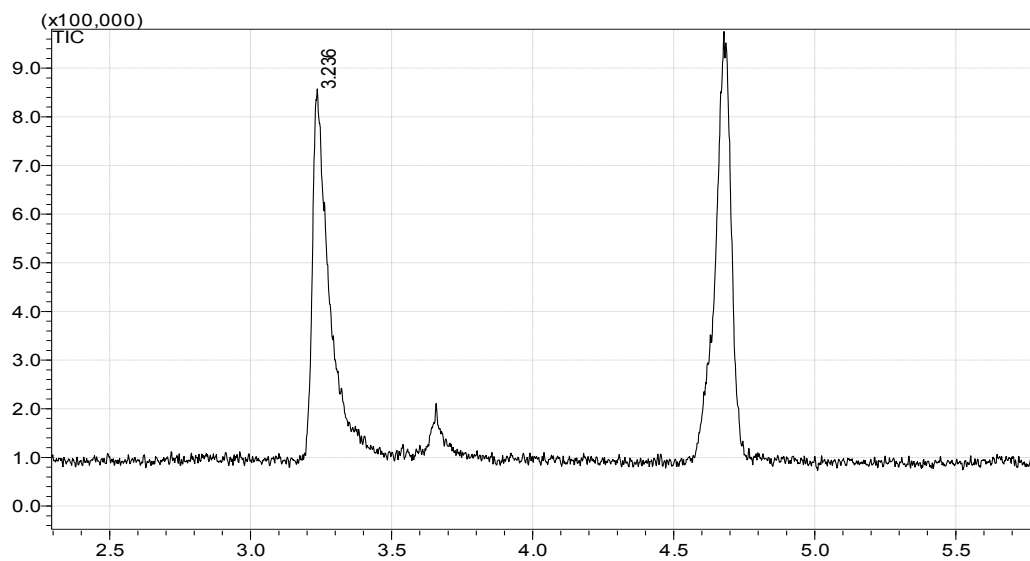
Obr. 15: Hmotnostné spektrum 0,05% kyseliny octovej z Obr. 14 (CI, isobutan, 80 kPa, +0,4 kV).

Pri porovnaní chromatogramu zaťaženého butan-1,3-diolu a chromatogramu kyseliny octovej, ako je vidieť na Obr. 16, je látka 1 totožná s píkcom kyseliny octovej.

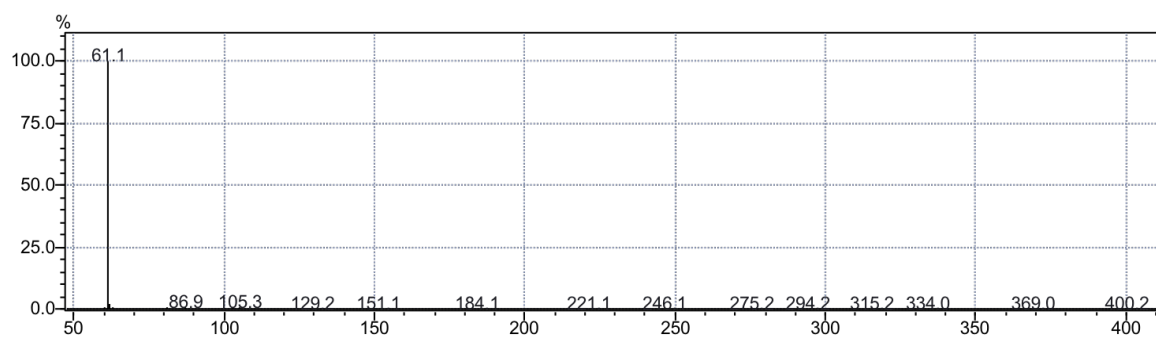


Obr. 16: Porovnanie chromatogramu zat'azeneho butan-1,3-diolu s 10% peroxidom vodíka pri teplote 70 °C a čase 240 h a chromatogramu 0,05% kyseliny octovej pri teplote 70 °C a čase 240 h (CI, isobutan, 80 kPa, +0,4 kV).

Ďalším experimentom sa butan-1,3-diol zahrieval s 10% peroxidom vodíka a 0,05% kyselinou octovou pri teplote 70 °C a čase 240 hodín aby sa potvrdilo, že sa novovzniknutý pík kyseliny octovej zväčšil a nevykazoval známky prekrytia dvoch píkov po pridaní 0,05% kyseliny octovej. Výsledný chromatogram na Obr. 17 nám znázorňuje pík s retenčným časom 3,2 prisluhujúci kyseline octovej. Na Obr. 18 je znázornené jeho hmotnostné spektrum pomocou chemickej ionizácie, kde m/z odpovedá hodnote 61 ($M+H$)⁺.



Obr. 17: Chromatogram butan-1,3-diolu s 10% peroxidom vodíka a 0,05% kyselinou octovou pri teplote 70 °C zahrievabého 240 hodín (CI, isobutan, 80 kPa, +0,4 kV).

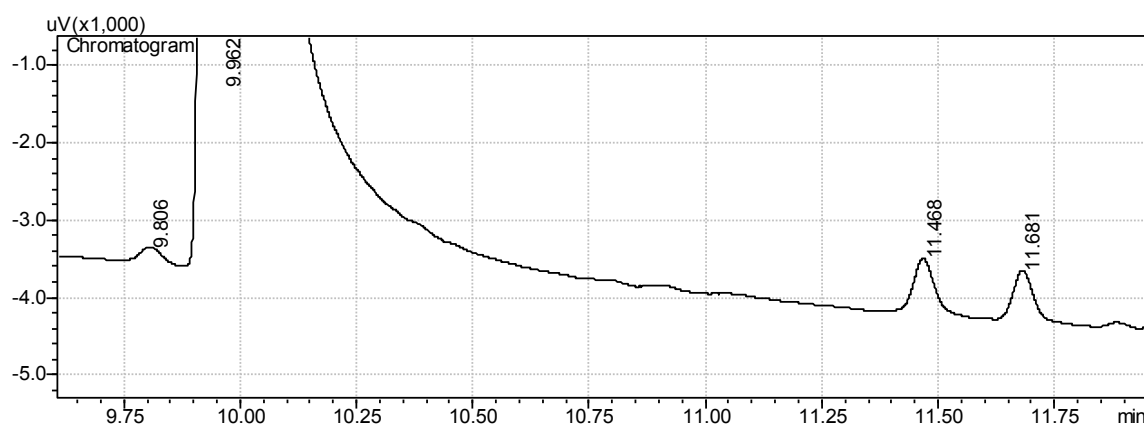


Obr. 18: Hmotnostné spektrum látky s retenčným časom 3,2 z Obr 17 (CI, isobutan, 80 kPa, +0,4 kV).

Pri porovnaní retenčných časov a hmotnostných spektier na Obr. 11 až 18 sa potvrdila téza, že oxidáciou butan-1,3-diolu peroxidom vodíka a následným zahrievaním (70 °C, 240 h) vzniká molekula kyseliny octovej.

5.2 URČOVANIE MOLEKULOVEJ ŠTRUKTÚRY NEČISTOTY s relatívnou molekulovou hmotnosťou 160

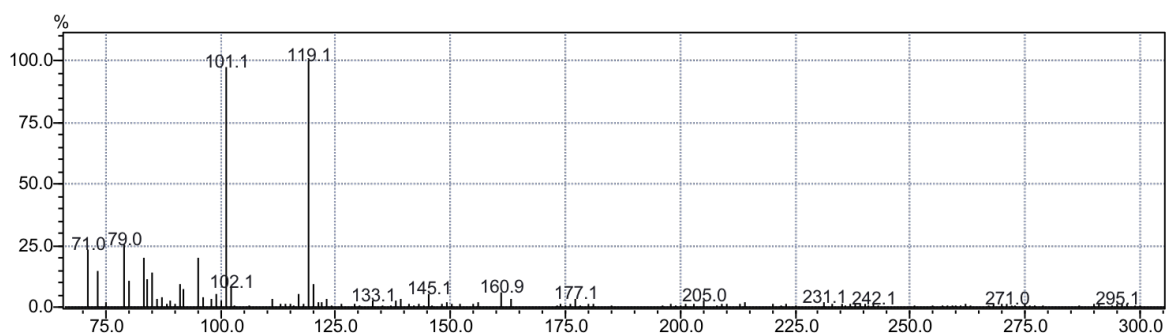
Pri riešení diplomovej práce³⁶ sa zistilo, že pri analýze butan-1,3-diolu GC/FID sa vyskytujú okrem samotnej zlúčeniny ešte ďalšie tri látky, ktoré predstavujú vedľajšie produkty výroby, prípadne rozkladné produkty (nečistoty). Chromatogram butan-1,3-diolu a jeho nečistôt je znázornený na Obr. 19. Po určení ich molekulovej hmotnosti, čo bolo náplňou diplomovej práce, je hlavnou úlohou rigorózneho zistenia ich molekulovú štruktúru.



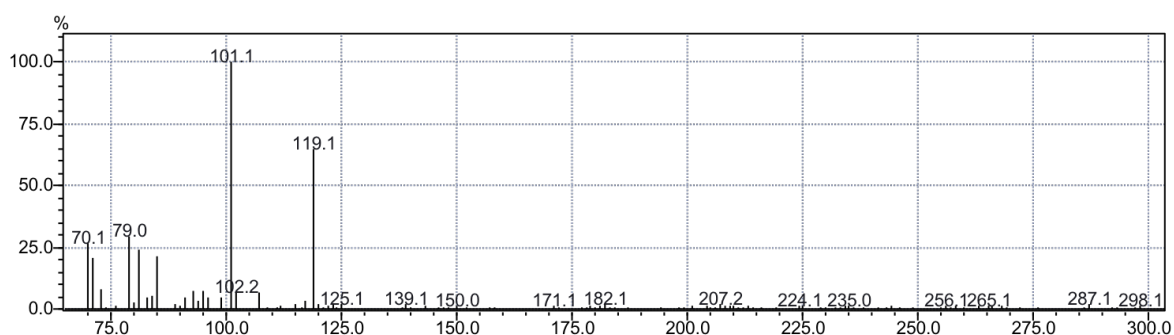
Obr. 19: Chromatogram butan-1,3-diolu a nečistôt (GC/FID)³⁵.

Píky s retenčnými časmi 11,4 a 11,6 na Obr. 19 majú m/z 119 ($M+H$)⁺, ako to je vidieť na Obr. 20 a 21. Tieto dve látky sú pravdepodobne izoméry a nevznikajú v priebehu záťažových skúšok, ako sa to zistilo v diplomovej práci Kláry Špalovej³⁷. S najväčšou pravdepodobnosťou sa bude jednať o príbuzné látky so sumárnym vzorcom $C_6H_{14}O_2$ a ich štruktúra bude odvodená od butan-1,3-diolu.

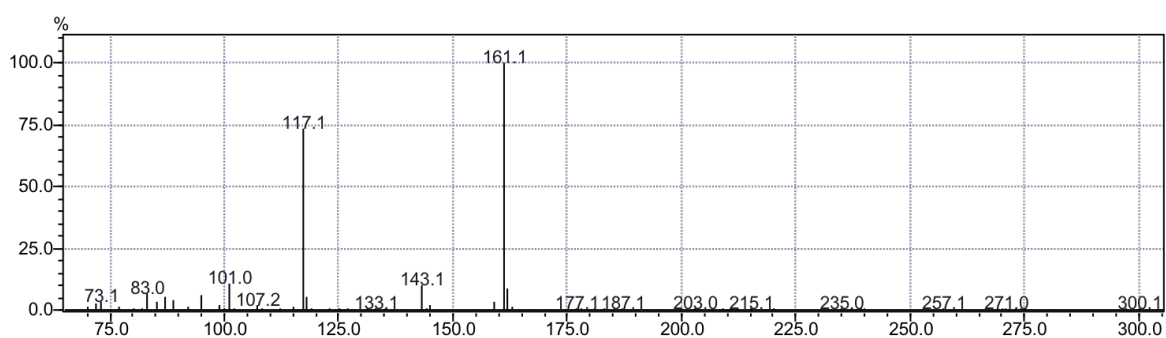
Pík s retenčným časom 9,8 z Obr. 19 je predmetom nášho skúmania. Z riešenia diplomovej práce³⁶ sa zistilo, že má m/z 161 ($M+H$)⁺, ako to je vidieť aj na hmotnostnom spektre z Obr. 22. Je to nečistota, ktorá pravdepodobne vzniká reakciou jedného z rozkladných produktov (3-hydroxybutanal) so samotným butan-1,3-diolom. Toto tvrdenie sme sa pokúšali overiť v ďalších krokoch riešenia rigorózneho zistenia ich molekulovú štruktúru.



Obr. 20: Hmotnostné spektrum látky s retenčným časom 11,4 z Obr. 19 (CI, isobutan, 80 kPa, +0,4 kV).



Obr. 21: Hmotnostné spektrum látky s retenčným časom 11,6 z Obr. 19 (CI, isobutan, 80 kPa, +0,4 kV).

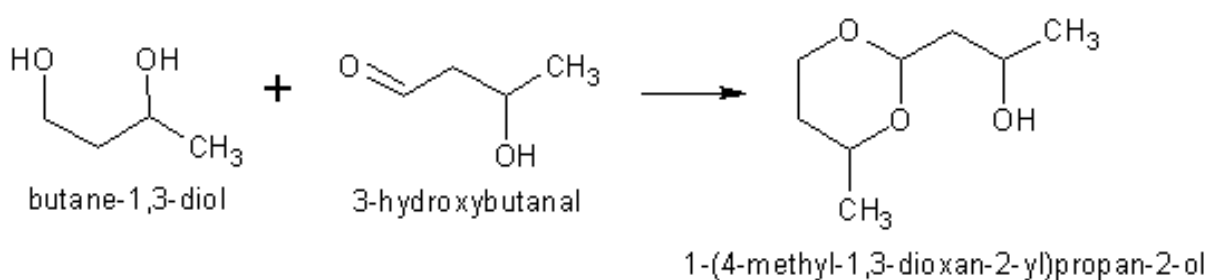


Obr. 22: Hmotnostné spektrum látky s retenčným časom 9,8 z Obr. 19 (CI, isobutan, 80 kPa, +0,4 kV).

Aldehyd 3-hydroxybutanal je jeden z rozkladných produktov butan-1,3-diolu vznikajúci oxidáciou primárnej alkoholickkej skupiny. Práve jeho reakciou s butan-1,3-diolom vzniká pravdepodobne skúmaná nečistota. Rôznymi pokusmi sme sa toto tvrdenie snažili dokázať a potvrdiť tézu vzniku látky s retenčným časom 9,8 z Obr. 19.

Reakcia:

- predpokladaná reakcia 1,3-butandiolu a 3-hydroxybutanal so vznikom výsledného produktu



Jeden z prvých krokov overenia hypotézy je zistenie najlepších podmienok reakcie butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanal so vznikom čo najväčšieho nárastu skúmanej nečistoty.

Chromatografické podmienky: GC/FID

Injektor

Nosný plyn	H ₂
Teplota injektora	250 °C
Rýchlosť nástreku	150,0 cm/sek
Split	1:5

Kolóna:

Supelcowax	
Dĺžka	30,0 m
Priemer	0,53 mm ID
Hrúbka filmu	0,50 µm

Teplotný program:

Reakcia butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanal v rôznych reakčných prostrediach

Gradient °C/min	Teplota (°C)	Čas (min.)
–	110,0	4,50
20,0	210,0	5,50

Určovanie molekulovej hmotnosti a štruktúry skúmanej nečistoty

Gradient °C/min	Teplota (°C)	Čas (min.)
–	90,0	4,50
5,0	200,0	3,50

Detektor

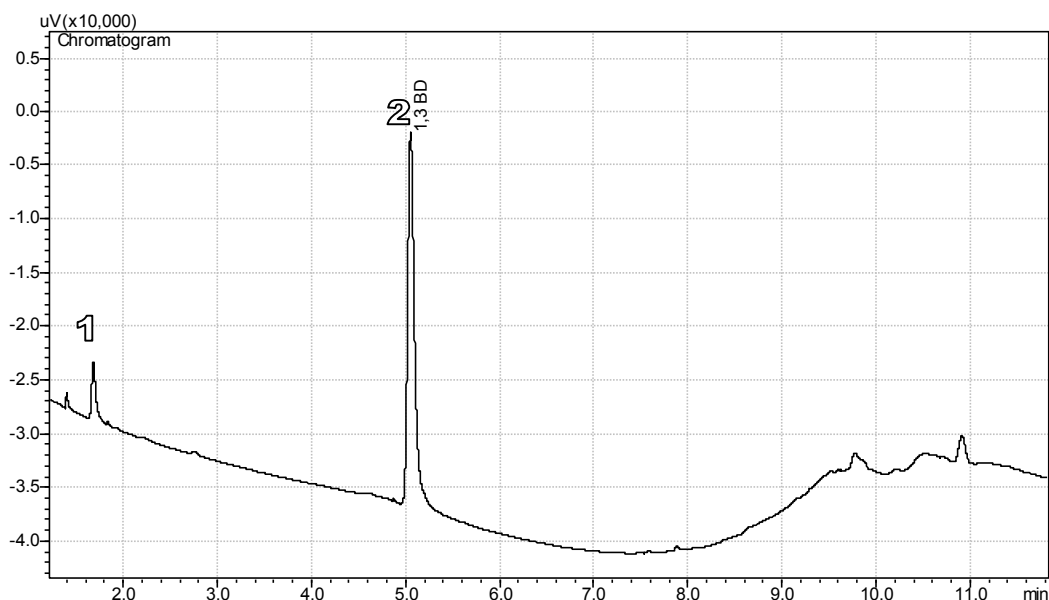
Teplota	300 °C
---------	--------

5.2.1 Reakcia butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanal v rôznych reakčných prostrediach

5.2.1.1 Methanol

Na Obr. 23 je vidieť chromatogram po reakcii butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanal v prostredí methanolu s kyselinou sírovou zahrievaného 1 h pri 60 °C. Pík 1 predstavuje 3-hydroxybutanal a pík 2 predstavuje butan-1,3-diol.

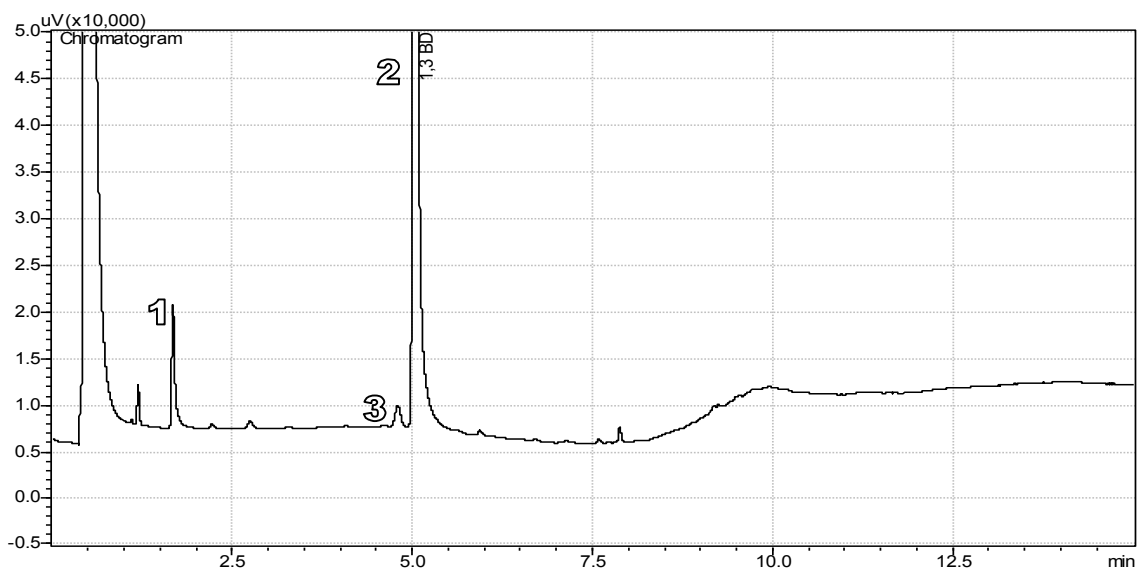
Z chromatogramu je vidieť, že sa skúmaná látka v tomto reakčnom prostredí neobjavila.



Obr. 23: Chromatogram reakcie butan-1,3-diolu (pík 2) a 3-hydroxybutanal (pík 1) v prostredí methanolu s koncentrovanou kyselinou sírovou zahrievaného 1 h pri 60 °C.

Po zmene kyseliny sírovej na kyselinu para-toluensulfónovú, ako katalyzátor priebehu reakcie, sa zlepšilo reakčné prostredie. Toto prostredie však ešte stále nie je optimálne, keďže nezreagovalo väčšie množstvo 3-hydroxybutanal s butan-1,3-diolom, čo by viedlo k nárastu skúmanej látky 3 na Obr. 24.

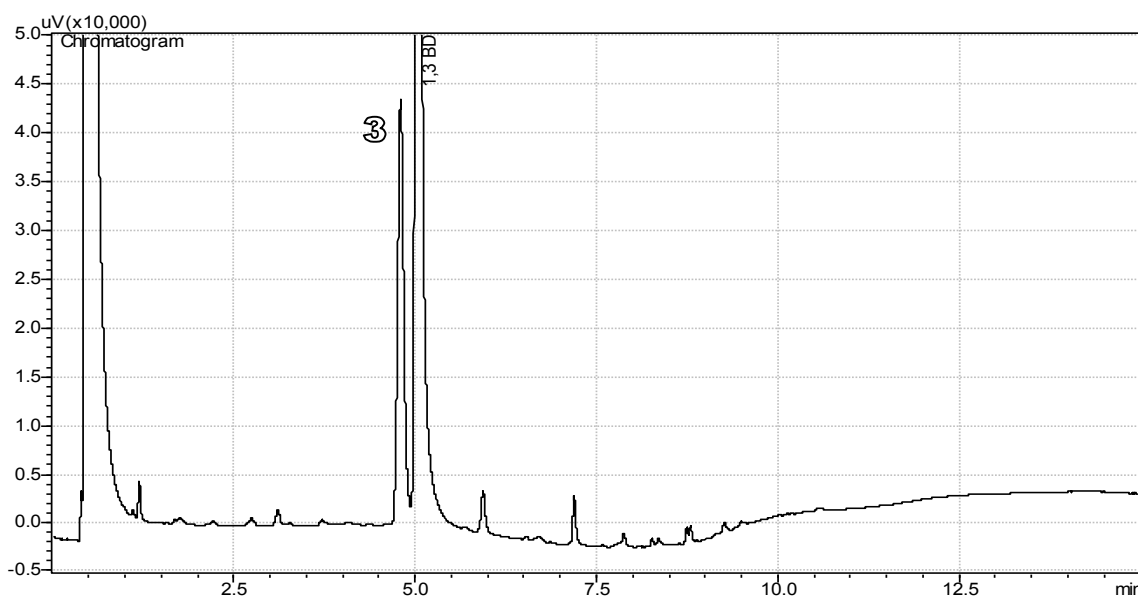
Už po prvých pokusoch sme dospeli k záveru, že naša hypotéza vzniku nečistoty bude pravdepodobne správna.



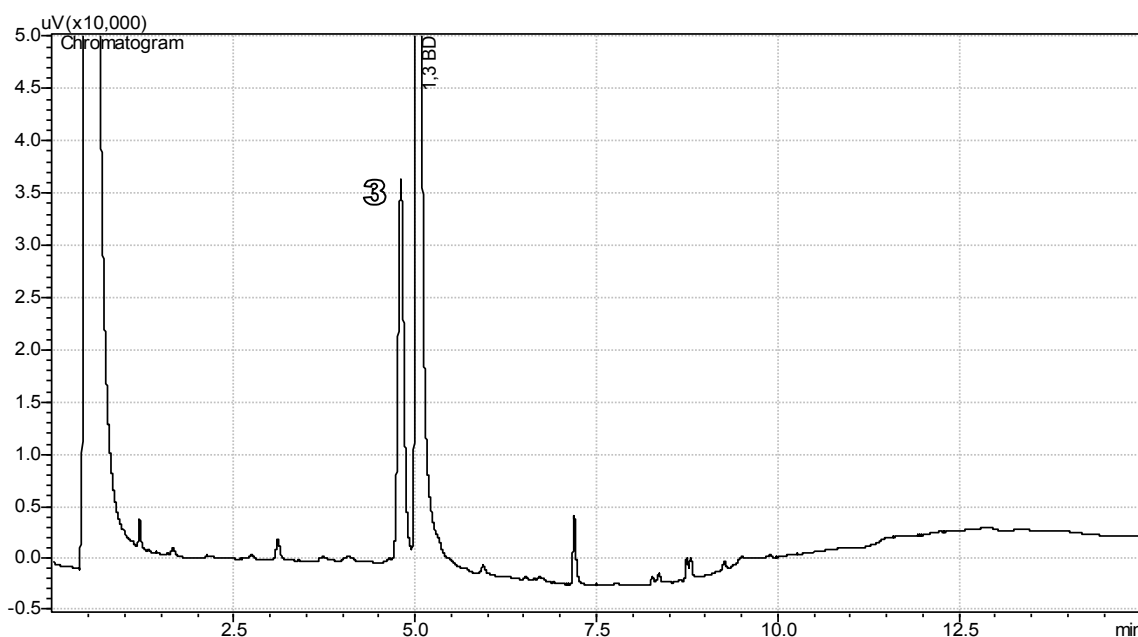
Obr. 24: Chromatogram reakcie butan-1,3-diolu (pík 2) a 3-hydroxybutanalu (pík 1) v prostredí acetonitrilu, koncentrovanej kyseliny sírovej a kyseliny para-toluensulfónovej v methanole zahrievaného 1 h pri 60 °C. Pík 3 predstavuje skúmanú látku.

5.2.1.2 Tetrahydrofurán

Pri ďalších pokusoch sa zmenilo reakčné prostredie na tetrahydrofurán a reakcia sa urobila ako za zvýšenej tak aj pri laboratórnej teplote, ako to je vidieť na Obr. 25 a 26. Došlo k nárastu skúmanej látky 3.



Obr. 25: Chromatogram butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanalu v prostredí tetrahydrofuránu a kyseliny para-toluensulfónovej zahrievaného 1 h pri 60 °C. Pík 3 predstavuje skúmanú látku.



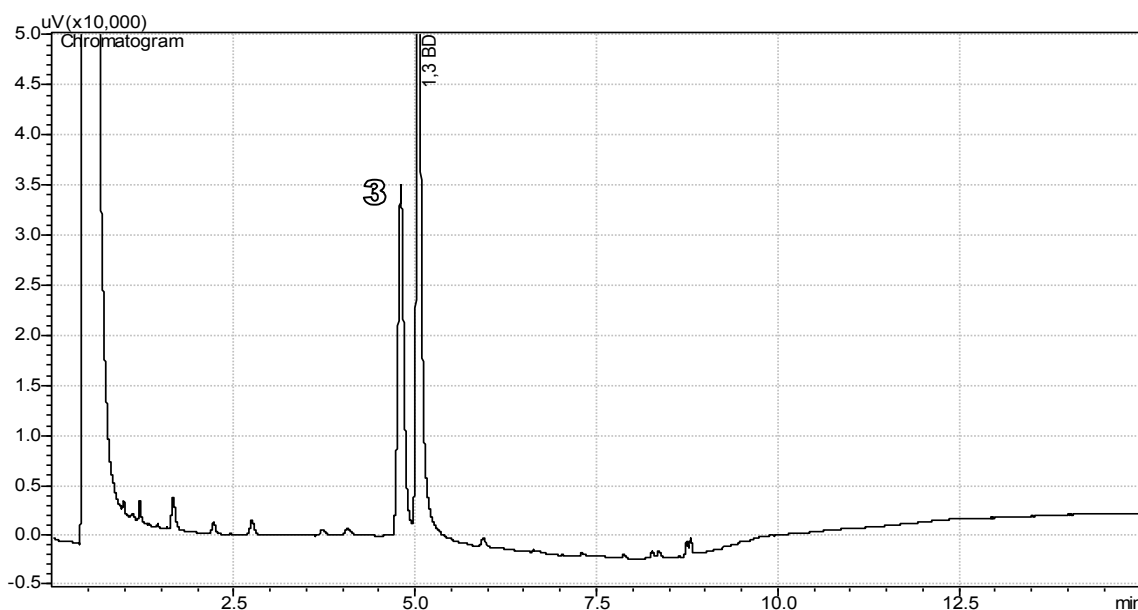
Obr. 26: Chromatogram butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanal v prostredí tetrahydrofuránu, kyseliny para-toluensulfónovej bez zahrievania. Pík 3 predstavuje skúmanú látku.

Dospelo sa k záveru, že na to aby prebehla reakcia medzi butan-1,3-diolom a 3-hydroxybutanalom v reakčnom prostredí tetrahydrofuránu a vznikla tak skúmaná látka 3 z Obr. 25 a 26 stačí laboratórna teplota. Pri reakcii vzniklo dostatočné množstvo skúmanej nečistoty, ale pokračovalo sa ďalej s pokusmi pri ďalšej zmene reakčného prostredia.

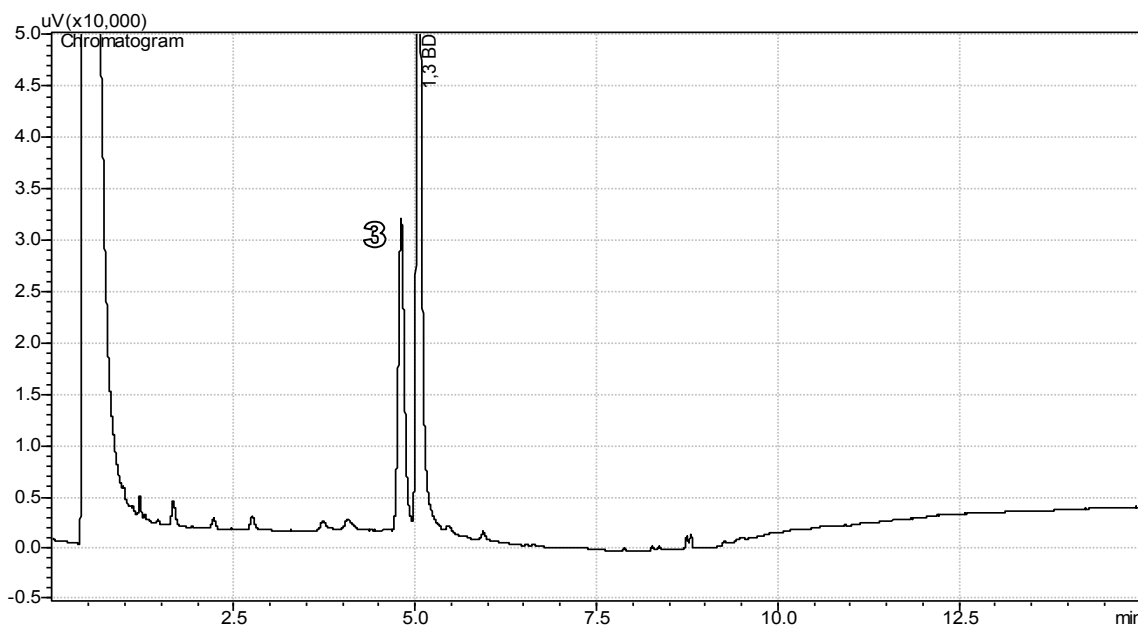
5.2.1.3 Acetonitril

Obr. 27 a 28 znázorňujú chromatogramy reakcie butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanal v prostredí acetonitrilu a kyseliny sírovej pri laboratórnej teplote, kde reakcia prebehla okamžite a pri teplote 60 °C. Pík 3 znázorňuje výsledný reakčný produkt, teda našu skúmanú látku.

Na to, aby vznikla skúmaná látka v reakčnom prostredí acetonitrilu nie je potrebné ďalšie zahrievanie a reakcia prebehla už pri laboratórnej teplote. Z chromatogramov (Obr. 27 a 28) je vidieť, že pri reakcii nevzniklo toľko nečistôt ako v reakčnom prostredí tetrahydrofuránu.

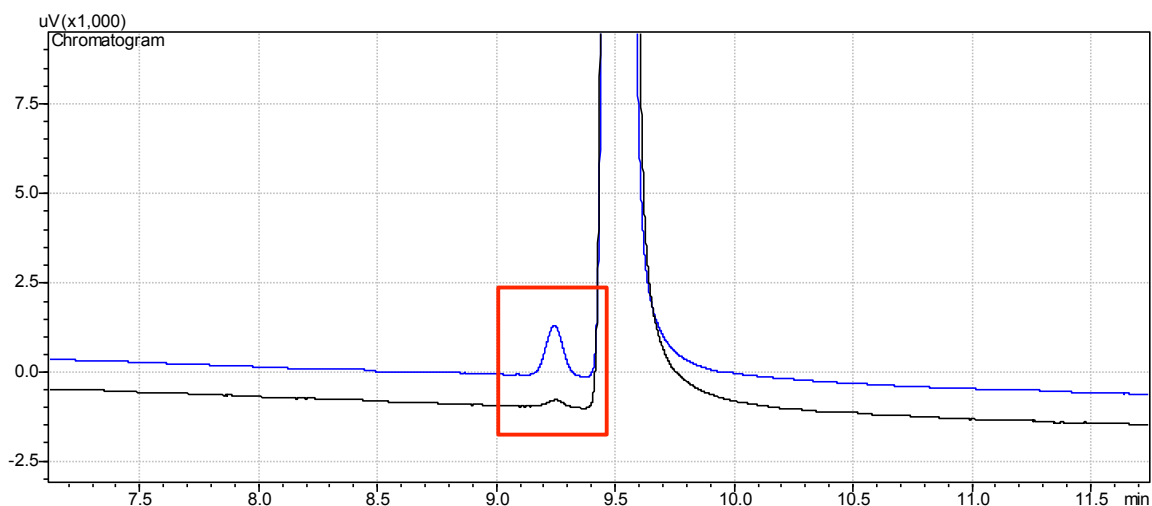


Obr. 27: Chromatogram butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanal v prostredí acetonitrilu a kyseliny sírovej pri laboratórnej teplote. Pík 3 predstavuje skúmanú látku.



Obr. 28: Chromatogram butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanal v prostredí acetonitrilu a kyseliny sírovej pri teplote 60 °C zahrievaného 15 min. Pík 3 predstavuje skúmanú látku.

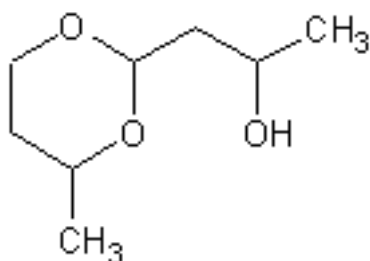
Pri hľadaní najlepšieho reakčného prostredia reakcie butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanal sa dospelo k záveru, že ako najlepšie a najjednoduchšie reakčné prostredie na vznik výsledného produktu je prostredie acetonitrilu a koncentrovanej kyseliny sírovej za laboratórnej teploty. Pri porovnaní reakčného prostredia tetrahydrofuránu



Obr. 31: Porovnanie chromatogramu *samotného butan-1,3-diolu* a chromatogramu *butan-1,3-diolu a 1% 1-(4-methyl-1,3-dioxan-2-yl)propan-2-olu* (GC/FID).

Samotný produkt 1-(4-methyl-1,3-dioxan-2-yl)propan-2-ol sa podrobil ďalšiemu meraniu pomocou GC/MS. Na Obr. 32 až 37 sú znázornené hmotnostné spektrá pri porovnaní skúmanej látky a výsledného produktu 1-(4-methyl-1,3-dioxan-2-yl)propan-2-olu a taktiež porovnané hmotnostné spektrá pomocou elektrónovej ionizácie (EI) a chemickej ionizácie (CI) s ionizačným plynom metanolom alebo isobutánom. Z hmotnostných spektier je zjavné, že najlepšie hmotnostné spektrum je pomocou chemickej ionizácie s ionizačným plynom isobutánom. Nepochádza k tak veľkej fragmentácii molekulového iónu ako pri elektrónovej ionizácii. Molekulový ión pri chemickej ionizácii má hodnotu m/z 161 ($M+H$)⁺.

Okrem toho sa potvrdilo to, že spektrá nečistoty butan-1,3-diolu a nami pripravenej látky sú totožné a na základe NMR a MS bola nečistota v butan-1,3-diolu identifikovaná ako 1-(4-methyl-1,3-dioxan-2-yl)propan-2-ol.



Chromatografické podmienky:

ELEKTRÓNOVÁ IONIZÁCIA

GC

Teplota injektoru	240 °C
Nosný plyn	He
Tlak	175,5 kPa
Rýchlosť	75 cm/s
Split	1:3

Kolóna

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

Teplotný program

Obr. 32

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

Obr. 33

Gradient °C/min	Teplota (°C)	Čas (min.)
–	110,0	4,50
15,0	180,0	5,00

MS

Teplota iontového zdroja	<u>Obr. 32</u> 210 °C	<u>Obr. 33</u> 200 °C
Rozmedzie detektoru	10–200 m/z	10–350 m/z

Chromatografické podmienky:

CHEMICKÁ IONIZÁCIA

<u>GC</u>	<u>Obr. 34, 36</u>	<u>Obr. 35, 37</u>
Teplota injektora	200 °C	200 °C
Nosný plyn	He	
Tlak	185,4 kPa	132,1 kPa
Rýchlosť	98,3 cm/s	80 cm/s
Split	1:3	1:3

Kolóna:

Supelcowax 10

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

Teplotný program

Obr. 34, 36

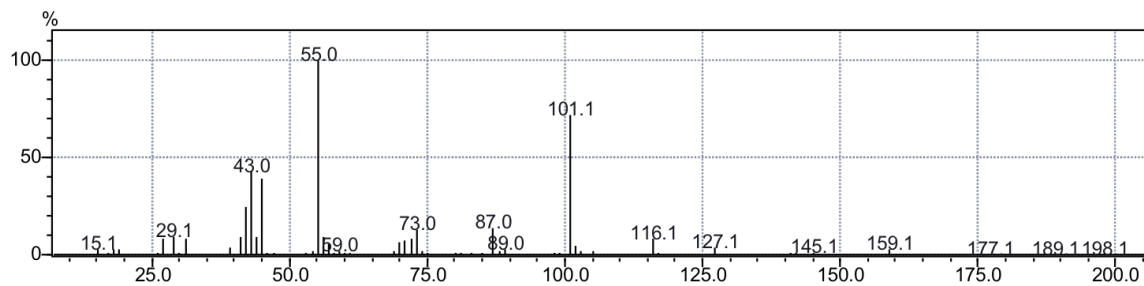
Gradient °C/min	Teplota (°C)	Čas (min.)
–	110,0	4,50
5,0	150,0	2,00

Obr. 35, 37

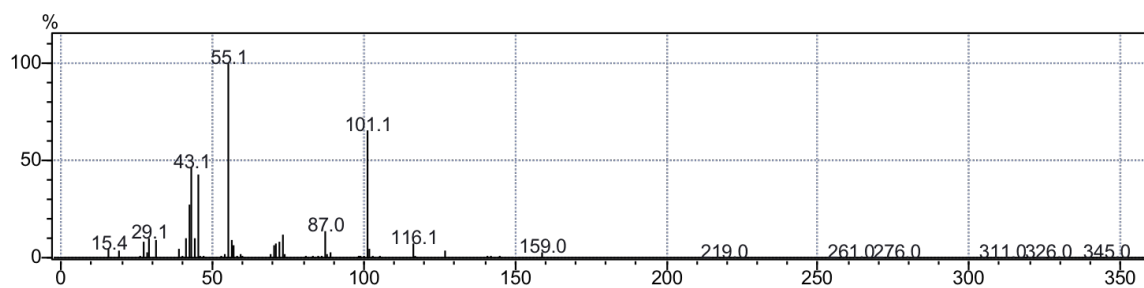
Gradient °C/min	Teplota (°C)	Čas (min.)
–	110,0	4,50
15,0	150,0	6,00

<u>MS</u>	<u>Obr. 34</u>	<u>Obr. 35</u>	<u>Obr. 36</u>	<u>Obr. 37</u>
Teplota iontového zdroja	200 °C	200 °C	200 °C	200 °C
Rozmedzie detektoru	50–300 m/z	50–330 m/z	70–400 m/z	70–330 m/z
Napätie na detektore zvýšené o	+0,25 kV	+0,3 kV	+0,4 kV	+0,3 kV

ELEKTRÓNOVÁ IONIZÁCIA

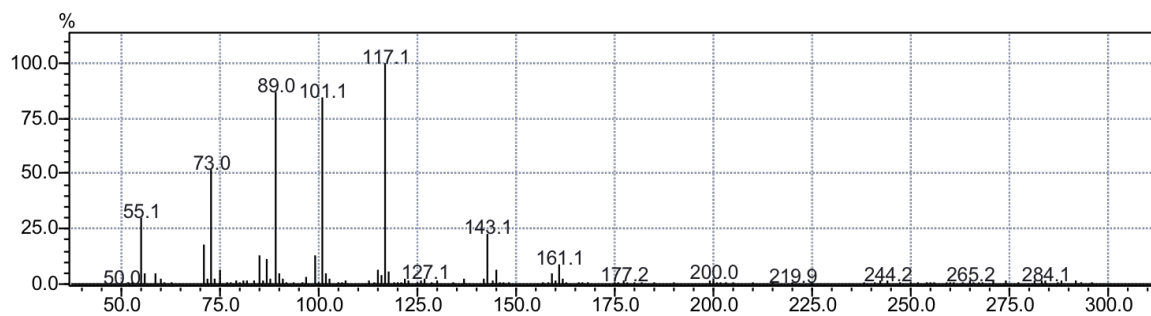


Obr. 32: EI spektrum. Skúmaná nečistota butan-1,3-diolu bez pridania produktu.

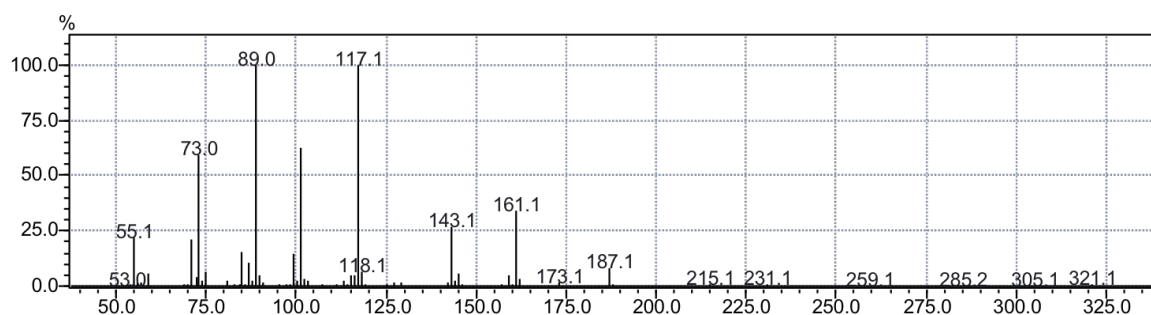


Obr. 33: EI spektrum. 100% 1-(4-methyl-1,3-dioxan-2-yl)propan-2-olu (0,75 mg/ml).

CHEMICKÁ IONIZÁCIA – ionizačný plyn methan

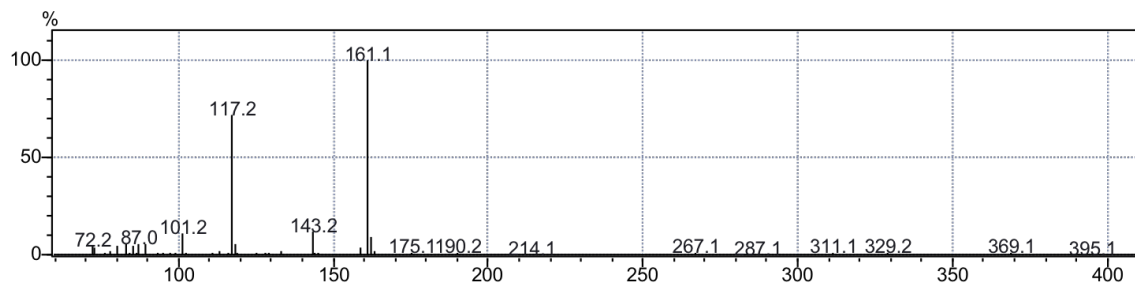


Obr. 34: CI spektrum. Skúmaná nečistota butan-1,3-diolu bez pridania produktu (300 kPa, +0,25 kV).

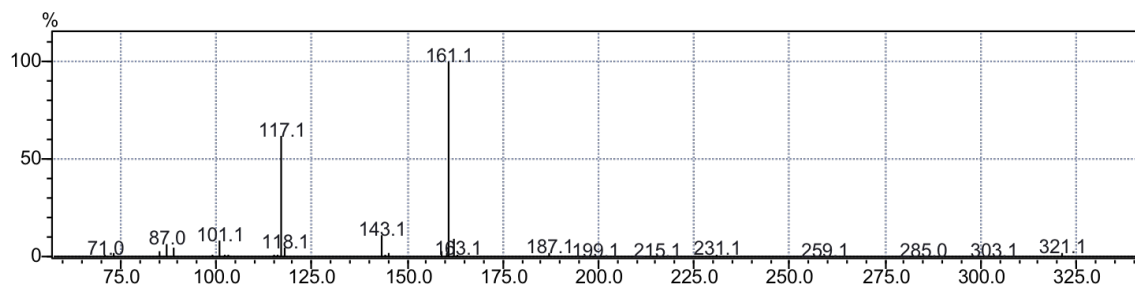


Obr. 35: CI spektrum. 100% 1-(4-methyl-1,3-dioxan-2-yl)propan-2-ol - 0,75 mg/ml (300 kPa, +0,3 kV).

CHEMICKÁ IONIZÁCIA – ionizačný plyn isobutan



Obr. 36: CI spektrum. Skúmaná nečistota butan-1,3-diolu bez pridania produktu (80 kPa, +0,4 kV).



Obr. 37: CI spektrum. 100% 1-(4-methyl-1,3-dioxan-2-yl)propan-2-ol - 0,75 mg/ml (80 kPa, + 0,3 kV).

6 ZÁVER

Butan-1,3-diol obsahuje tri neznáme nečistoty. Hlavnou úlohou rigorózneho práce bolo určenie ich molekulovej štruktúry.

Vzhľadom na to, že nečistôt bolo v látke málo (na úrovni 0,1 %), bolo potreba zvýšiť ich podiel a tak sa butan-1,3-diol podrobil záťažovej skúške oxidáciou peroxidom vodíka. Pri tomto pokuse však vznikali dva nové píky. Jedná sa o oxidačné produkty alkoholických skupín butan-1,3-diolu - aldehyd (3-hydroxybutanal) a ketón (4-hydroxybutan-2-on). Štruktúra bola potvrdená na základe EI a CI spektier a porovnaním EI spektier s knižnicou spektier. Pri následnom zvyšovaní teploty sa objavil ďalší pík s hodnotou m/z 61 $(M+H)^+$ pri použití chemickej ionizácie. S využitím chemickej a elektrónovej ionizácie, na základe porovnania hmotnostného spektra samotnej kyseliny octovej s hmotnostným spektrom vzorky skúmaného rozkladného produktu a taktiež zhodou ich retenčných časov, bol rozkladný produkt identifikovaný ako kyselina octová.

Dve neznáme látky o relatívnej molekulovej hmotnosti 118, ktoré boli zistené analýzou butan-1,3-diolu v diplomovej práci, nevznikajú oxidáciou (ani za iných stresových podmienok) a teda sa nejedná o rozkladné produkty ale o príbuzné látky. Na základe MS sme sa o nich dozvedeli, že sa s najväčšou pravdepodobnosťou jedná o izoméne dioly so sumárnym vzorcom $C_6H_{14}O_2$. Vzhľadom k tomu, že hmotnostné spektrá oboch látok sú takmer identické, nedá sa z nich odvodiť presná štruktúra. Keďže sme nevedeli vyrobiť väčšie množstvo látky, na určenie ich štruktúry sa nedali použiť ďalšie techniky pre identifikáciu.

U ďalšej neznámej látky sa z jej CI-MS spektra a hodnoty m/z 161 $(M+H)^+$ dospelo k hypotéze, že by mohla vzniknúť reakciou butan-1,3-diolu s 3-hydroxybutanalom.

Ako najlepšie prostredie pre reakciu butan-1,3-diolu a 3-hydroxybutanalu sa ukázalo prostredie acetonitrilu a koncentrovanej kyseliny sírovej za laboratórnej teploty.

Pre potvrdenie výslednej molekuly sa porovnávali píky nečistoty v samotnom butan-1,3-diolu a reakčného produktu butan-1,3-diolu s 3-hydroxybutanalom a to ako pomocou elektrónovej ionizácie tak aj chemickej ionizácie.

Z nameraných výsledkov a potvrdením molekuly pomocou NMR sa dospelo k záveru, že skúmaná nečistota je 1-(4-methyl-1,3-dioxan-2-yl)propan-2-ol.

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

-
- ¹Chromatografie, Wikiskripta [online] 2013 [cit. 2013-11-30]. Dostupné na <<http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Chromatografie&oldid=221806>>
- ²Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2006
- ³Grob, R., L., Barry, E., F.: Modern practice of gas chromatography 4th ed., Wiley-Interscience, New Jersey 2004
- ⁴Pospíšil, M.: Instrumentální metody výzkumu a analýzy I, Vydavatelství ČVUT, Praha 1993
- ⁵Schéma GC, Wikipedia [online] 2011 [cit. 2013-12-07]. Dostupné na <<http://sk.wikipedia.org/wiki/Súbor:SchemaGC.png>>
- ⁶Plynová chromatografie, Ústav konzervace potravin, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha [online] 2012 [cit. 2013-12-07]. Dostupné na <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/gc/GC.pdf>
- ⁷McNair, Harold M., Miller, James M.: Basic Gas Chromatography, John Wiley&Sons, Inc., New York 1998
- ⁸Plynová chromatografie, Aplikační list: Speciální plyny, Linde Gas a.s. [online] 2019 [cit. 2013-12-07]. Dostupné na <http://www.linde-gas.cz/internet.lg.lg.cze/cs/images/PlynovaChromatogr_4_6_200979_15729.pdf>
- ⁹Koplík, R.: Plynová chromatografie, Ústav analýzy potravin a výživy, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha [online] 2012 [cit. 2013-12-07] Dostupné na <http://web.vscht.cz/~koplikr/%c4%8c%c3%a1stA6_3.pdf>
- ¹⁰Literák J., Plynová chromatografie, Ústav chemie, Masaryková univerzita [online] 2009 [cit. 2013-12-07]. Dostupné na <http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf>
- ¹¹Yuwono, M., Indrayanto, G.: Gas Chromatography System Instrumentation, Airlangga University, Surabaya, Indonesia, edited in Encyclopedia of chromatography by Jack Cazes 2004
- ¹²Vestník: Slovenský liekopis, prvé vydanie (SL 1), Obzor, Bratislava 2005
- ¹³Štěrba, K., a kol.: Moderní postupy využívané při přípravě vzorků pro stanovení alkoholu, esterů a kyselin v pivu, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická [online] 2010 [cit. 2013-12-07]. Dostupné na <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_603-610.pdf>
- ¹⁴Balíková, M.: Plynová chromatografie: Aplikace v toxikologii, 1. LF UK, Praha [online] 2006 [cit. 2013-12-07]. Dostupné na <<http://www.lf1.cuni.cz/Data/files/Toxikologie/GC%20aplikace%20v%20toxikologii.ppt>>
- ¹⁵Selecting a GC Column, Labhut [online] 2013 [cit. 2013-12-07]. Dostupné na <<http://www.labhut.com/education-centre/compatibility-guides/gc-columns/selecting-gc-column.html>>
- ¹⁶Phase ratio, SGE Analytical Science [online] 2013 [cit. 2013-12-07]. Dostupné na <<http://www.sge.com/support/training/columns/effect-of-film-thickness/phase-ratio->>>
- ¹⁷GC Column Selection Guide, Sigma-Aldrich Co. [online] 2010 [cit. 2013-12-07]. Dostupné na <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/General_Information/t407133.Par.0001.File.tmp/t407133.pdf>
- ¹⁸Kašer P., Syslová K., Použití GC/MS spektrometrie, Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická [online] 2008 [cit. 2013-12-20]. Dostupné na <<http://www.vscht.cz/kot/resources/studijni-materialy/lab/c.pdf>>

-
- ¹⁹ Dunnivant, F. M., Ginsbach, J. W.: Gas Chromatography, Liquid Chromatography, Capillary Electrophoresis – Mass Spectrometry: A Basic Introduction, Chemistry Department, Whitman Collage [online] 2011 [cit. 2013-12-20]. Dostupné na <http://people.whitman.edu/%7Edunnivfm/C_MS_Ebook/Prelim/index.html>
- ²⁰ Smith, R. Martin: Understanding Mass Spectra: A Basic Approach – 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New Jersey 2004
- ²¹ Kuruc, J.: Hmotnostná spektrometria, Katedra jadrovej chémie, Prírodovedecká fakulta. Univerzita Komenského, Bratislava [online] 2007 [cit. 2013-12-20] dostupné na <<http://bio.host.sk/HS.pdf>>
- ²² Hübschmann, H., J.: Handbook of GC/MS, Wiley-VCH, Weinheim 2009
- ²³ Vrešťál, J. a kol.: Hmotnostní spektrometrie, Vydavatelství MU, Brno 1998
- ²⁴ Holčapek M.: Hmotnostní analyzátory, Katedra analytické chemie, Fakulta chemických technologií, Univerzita Pardubice [online] 2013 [cit. 2013-12-20]. Dostupné na <http://holcapek.upce.cz/teaching/03_HmotnostniAnalyzatory.pdf>
- ²⁵ Holčapek M.: Prednášky: Interpretace spekter, Katedra analytické chemie, Fakulta chemických technologií, Univerzita Pardubice [online] 2013 [cit. 2014-01-31]. Dostupné na <<http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>>
- ²⁶ Zachař, P., Sýkora, D.: Pravidla interpretace MS, Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha [online] 2007 [cit. 2014-01-31]. Dostupné na <http://www.vscht.cz/anl/cach2/MS/pravidla_interpretace_MS_2007.pdf>
- ²⁷ Šimek, P.: Základy interpretace hmotnostních spekter 1, Biologické centrum AV ČR, České Budejovice [online] 2007 [cit. 2014-01-31]. Dostupné na <http://alfa.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/2012_EKOTECH_SimekP_6-MS1.pdf>
- ²⁸ Vojtylová, T.: Diplomová práce, Ústav chémie, Prírodovedecká fakulta, Masaryková univerzita [online] 2008 [cit. 2014-02-01]. Dostupné na http://is.muni.cz/th/106007/prif_m/diplomova_praca_Vojtylova.pdf
- ²⁹ Koller, L.: Analytická chémie, Technická univerzita v Košiciach [online] 2012 [cit. 2014-02-01]. Dostupné na <http://bio.host.sk/analit.pdf>
- ³⁰ Milde, D.: Vibrační spektrometrie, Katedra analytické chemie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci [online] 2012 [cit. 2014-02-01]. Dostupné na <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/06-im-ir-1351625867.pdf>
- ³¹ Dendisová, M. a kol.: Ramanová spektrometrie, Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická [online] 2013 [cit. 2014-02-01]. Dostupné na <http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>
- ³² Waisser, K., Pour, M.: Organická chemie II, Karolinum, Praha 2000
- ³³ International Labour Organization, Butane-1,3-diol [online] 1997 [cit. 2014-01-05]. Dostupné na <http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=en&p_card_id=1182>
- ³⁴ Institut of medicine of the national academies: Food Chemical Codex 5, 2004
- ³⁵ SPC Otobacid N [online] 2014 [cit. 2014-01-05]. Dostupné na <<http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0084700&tab=texts>>
- ³⁶ Kušník, J.: Diplomová práce, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2010

³⁷ Špalová, K.: Diplomová práce, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2008