

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

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Využití separačních metod v analýze léčiv II
Employment of separation methods in the field of drug analysis II

Hradce Králové 2009

Markéta Ferebauerová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány.

Markéta Ferebauerová

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce, PharmDr. Radimu Kučerovi Ph.D., za odborné vedení, trpělivost a pomoc při vypracování mé diplomové práce.

Obsah

1.	Úvod	5
2.	Teoretická část	6
2.1.	Plynová chromatografie	6
2.1.1.	Princip chromatografického dělení	6
2.1.2.	Základní chromatografická data	7
2.1.3.	Vlastní provedení plynové chromatografie	9
2.1.4.	Hlavní součásti plynového chromatografu	10
2.1.5.	Využití plynové chromatografie	13
2.2.	Validace analytické metody	16
2.2.1.	Selektivita	16
2.2.2.	Linearita	16
2.2.3.	Přesnost	17
2.2.4.	Správnost	17
2.2.5.	Robustnost	17
2.3.	Vlastnosti používaných látek	18
2.3.1.	1,3-butandiol	18
2.3.2.	Glycerol	19
3.	Cíl práce	21
4.	Experimentální část	22
4.1.	Použitý materiál, pomůcky, přístroje a chemikálie	22
4.1.1.	Splitovací poměr	23
4.1.2.	Selektivita	24
4.1.3.	Linearita	24
4.1.4.	Přesnost	25
4.1.5.	Správnost	26
4.1.6.	Robustnost	27
5.	Výsledky a diskuse	29
5.1.	Splitovací poměr	29
5.2.	Selektivita	29
5.3.	Linearita	33
5.4.	Přesnost	34
5.5.	Správnost	39
5.6.	Robustnost	41
5.6.1.	Změna retenčních časů	41
5.6.2.	Změna rozlišení	46
5.6.3.	Změna tailing faktoru	47
5.6.4.	Změna počtu teoretických pater	49
5.6.5.	Změna poměru plochy pod píkem zkoumané látky ku ploše pod píkem standardu	50
5.6.6.	Stabilita	51
6.	Závěr	54
7.	Seznam použité literatury	55

1. Úvod

Plynová chromatografie je jednou z nejčastěji používaných analytických metod. Je to vysoce účinná separační metoda, která slouží k analýze plyných látek a látek kapalných a pevných, které lze bez rozkladu převést do plynného stavu. V analýze léčiv má plynová chromatografie nezastupitelné místo.

Validací analytické metody rozumíme ověření účinnosti metody, pokud dojde ke změně chromatografických podmínek. Během validační studie sledujeme tyto parametry: selektivitu, linearitu, správnost, přesnost, detekční limit, kvantifikační limit a robustnost.

2. Teoretická část

2.1. Plynová chromatografie

Je to separační analytická metoda. Slouží k oddělení analyzovaných složek směsi i jejich kvalitativnímu i kvantitativnímu vyhodnocení. Plynová chromatografie je jednou z nejdůležitějších a nejpoužívanějších chromatografických metod. Mezi její výhody patří jednoduchost provedení, vysoká citlivost a vysoká separační účinnost. Touto metodou lze stanovit nejen plynné látky, ale i pevné a kapalné látky, které lze bez rozkladu převést do plynného stavu.^{1,2,3,4}

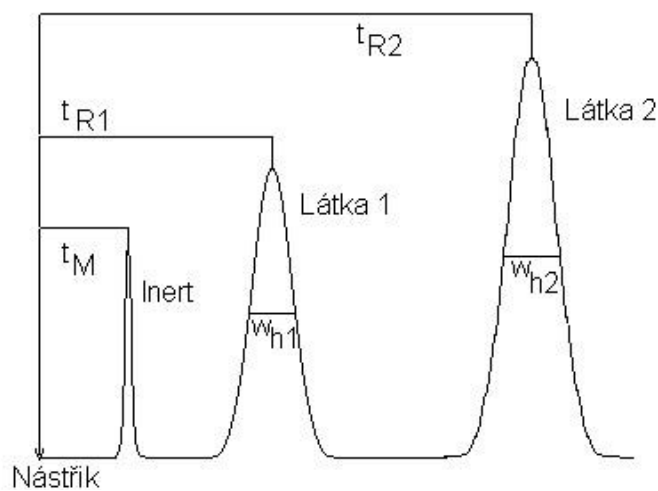
2.1.1. Princip chromatografického dělení

Principem je mnohonásobné ustavování rovnováhy mezi složkami analyzované směsi a dvěma navzájem nemísitelnými fázemi. Tyto fáze nazýváme stacionární a mobilní. Stacionární neboli nepohyblivá fáze zadržuje analyt. Mobilní fáze, pohyblivá fáze neboli nosný plyn jednotlivé složky analyzované směsi vymývá ze stacionární fáze a unáší je směrem k detektoru.³

Při analýze se v chromatografickém systému ustavuje dynamická rovnováha mezi vratnou sorpcí na stacionární fázi a desorpcí do mobilní fáze. Rychlost postupu látky systémem závisí na sorpční rovnováze. Čím pevněji je látka vázána na stacionární fázi, tím pomaleji se v chromatografickém systému pohybuje a tím později je detekována.^{1,6}

2.1.2. Základní chromatografická data

Hlavní kvalitativní charakteristikou plynové chromatografie je retenční čas, hlavní kvantitativní charakteristikou je potom plocha pod píkem či výška chromatografického píku. Všechny tyto charakteristiky se dají vyčíst z chromatogramu. Pro příklad je uveden vzorový chromatogram na Obrázku 1.



Obrázek 1: Vzorový chromatogram pro vysvětlení základních chromatografických dat

t_M -mrtvý čas

t_{R1} -retenční čas látky 1

t_{R2} -retenční čas látky 2

w_{h1} -šířka píku pro látku 1 v polovině výšky

w_{h2} -šířka píku pro látku 2 v polovině výšky

Retenční čas t_R

Udává dobu, kterou setrvá analyt v separačním systému.^{3,5} Odečítá se z chromatogramu nebo se vypočítá podle vzorce:

$$t_R = \frac{L}{u}$$

L - délka kolony v cm

u - rychlost průtoku obilní fáze kolonou v cm/s

Mrtvý čas t_M

Je čas, který udává, jak dlouho chromatografickým systémem prochází mobilní fáze.^{3,5}

Redukovaný retenční čas t'_R

Je to čistý čas, který analyt setrvá v chromatografickém systému. Vypočítá se podle vzorce:

$$t'_R = t_R - t_M$$

t_R - retenční čas analytu

t_M - mrtvý čas⁵

Zdánlivý počet teoretických pater N

Celou délku chromatografického systému je možné rozložit na větší počet úseků, které se označují jako teoretická patra. Teoretická patra odpovídají počtu ustavení rovnováhy v systému. Počet teoretických pater tedy vyjadřuje účinnost chromatografické kolony. Čím větší je počet teoretických pater, tím více je kolona účinná. Vypočte se podle vzorce:

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

t_R - retenční čas analytu

w_h - šířka chromatografického píku v polovině jeho výšky^{3,5,6}

2.1.3. Vlastní provedení plynové chromatografie

Roztok vzorku je vstříknut do nástřikového prostoru, který je vyhříván. Vzorek se ihned odpaří a je nosným plynem unášen na kolonu. Celá kolona je termostatována, aby nedošlo ke zpětnému zkapalnění vzorku. Jednotlivé součásti vzorku jsou na koloně sorbovány na stacionární fázi. Poté jsou nosným plynem desorbovány a unášeny směrem k detektoru. Látky, které jsou na kolonu sorbovány málo, doputují k detektoru jako první. Mají krátký eluční čas. Naproti tomu látky, které jsou sorbovány pevněji, vystupují z kolony později.¹

2.1.4. Hlavní součásti plynového chromatografu

Regulátory průtoku a tlaku

Je to elektronické zařízení, kterým se dá nastavit průtok a tlak nosného plynu v injektoru i na koloně. Toto zařízení zajistí konstantní průtok nosného plynu kolonou a detektorem.^{3,5,7}

Injektor

Injektor slouží k nástřiku vzorku. Vzorek, který vstupuje na kolonu, musí mít co nejmenší objem. Vzorek vstupující na kolonu musí být v plynném stavu. Vzorek se ale nesmí během odpaření rozložit. K odpaření vzorku a jeho smíchání s nosným plynem dochází v tzv. lineru. Liner také slouží k zachycení netěkavých látek.⁶ Vzorek poté vstupuje do kolony.⁷

Kolona

Kolona je trubice, ve které je umístěna stacionární fáze. V plynové chromatografii rozeznáváme kolony náplňové a kapilární. Náplňové kolony jsou trubice z nerezové oceli nebo skla, ve kterých je granulovaný adsorbent nebo nosič se zakotvenou kapalnou stacionární fází. Tyto kolony jsou obvykle dlouhé do 5 m a jejich vnitřní průměr bývá v rozmezí 2 až 5 mm. Kapilární kolony jsou tenké trubice z nerezové oceli nebo skla, na jejichž vnitřní stěně je nanášena kapalná stacionární fáze. Tyto kolony dosahují délky 10 až 100 m, jejich vnitřní průměr je 0,1 až 0,5 mm. Kolona je umístěna v termostatovaném prostoru, který udržuje na koloně námi zvolenou teplotu. Podle toho, zda je teplota kolony po celou dobu konstantní nebo se mění rozeznáváme dva typy analýzy. A to isothermální analýzu (teplota kolony je po celou dobu analýzy stejná) a analýzu s teplotním gradientem (teplota kolony se v průběhu analýzy mění podle námi zvoleného programu). Analýza s využitím teplotního gradientu je vhodná pro analýzu směsí látek s rozdílnými teplotami varu. Dojde tak ke zkrácení doby analýzy a ke zlepšení tvaru chromatografických pík.^{1,2,3}

Stacionární fáze

Stacionární fáze je naplněna v koloně. Její vlastnosti závisí na charakteru analyzovaného vzorku. Polaritu stacionární fáze volíme podle polarity separovaných složek směsi. Můžeme zvolit stacionární fázi nepolární, slabě polární, středně polární nebo polární. Nepolární fází je poly(dimethylsiloxan) a poly(5%-difenyl-95%-dimethylsiloxan), slabě polární fází je poly(14%-bis(kyanopropyl)-86%-dimethylsiloxan), středně polární fází je poly(50%-kyanopropylfenyl-50%-dimethylsiloxan), polární fází je polyethylenglykol.^{3,4}

Detektor

Detektor určuje citlivost chromatografické analýzy. Detektor volíme podle typu analyzovaného vzorku. V plynové chromatografii využíváme detektory ze skupiny ionizačních detektorů nebo tepelně vodivostní detektor.^{2,3}

Ionizační detektory

Ionizační detektory pracují na principu měření ionizačního proudu, který vzniká v přítomnosti nabitých částic v nosném plynu. Ionizačním zdrojem může být kyslíkový plamen nebo zdroj ionizačního záření. Do této skupiny detektorů patří hmotnostní spektrometr, detektor elektronového záchyty, plamenoionizační detektor, termoionizační detektor, fotoionizační detektor a palmenofotometrický detektor.²

Hmotnostní detektor

Hmotnostní detektor funguje na principu ionizace neutrálních molekul a atomů na ionty a fragmenty, které jsou následně separovány na základě poměru hmotnosti a náboje. U této detekce je nejčastěji využívána elektronová ionizace, nejčastěji používaný analyzátor je kvadrupól. Je to univerzální detektor s citlivostí 1 ng až 10 pg.^{2,5}

Plamenoionizační detektor

Dalším velmi využívaným je detektor plamenoionizační detektor. Vzorek je v tomto detektoru spálen kyslíkovodíkovým plamenem. Ionty, které tímto procesem vznikají, jsou vedeny na polarizované elektrody, kde generují proud. Tento proud se zesiluje a převádí do počítače. Tento detektor je univerzální pro organické látky. Citlivost detektoru je 10 až 100 pg.^{2,7}

Tepelně vodivostní detektor

Tepelně vodivostní detektor je takový, který měří rozdíl mezi tepelnou vodivostí nosného plynu a analyzované látky. Tento detektor je univerzální. Jeho citlivost je menší než 400 pg propanu/ml helia.²

Záznam chromatogramu

Signál vznikající v detektoru je převáděn na proudovou odezvu. Chromatogram je potom grafickým záznam závislosti proudové odezvy na čase. Ze získaného chromatogramu poté můžeme vyhodnotit jednotlivé retenční parametry jednotlivých signálů, plochy a výšky píků.⁵

Řídící jednotka

Ke zpracování dat analýzy se používá počítač se speciálním softwarem. Tento software zároveň ovládá celý systém.⁵

Nosný plyn

Nosný plyn představuje v plynové chromatografii mobilní fázi. Jako nosný plyn se nejčastěji využívá dusík nebo helium. Lze ale využít i jiné plyny jako například argon nebo vodík. Kritéria pro výběr nosného plynu jsou jeho viskozita, účinnost, čistota, reaktivita, typ používaného detektoru, ale například i cena nosného plynu. Hlavním problémem nosného plynu jsou nečistoty, které může obsahovat. Kritickými nečistotami jsou kyslík, vodní pára a uhlovodíky. Tyto nečistoty jsou nebezpečné pro separační systém, protože mohou reagovat se stacionární fází a měnit tak její složení, i pro měřicí systém, kde mohou

ovlivnit detekci (uhlovodíky obsažené v nosném plynu mohou způsobovat šum base line). Nosný plyn je proto před vstupem do analýzy předčištěván.^{1,3,4,6}

Splitování

Splitování je technika nástřiku vzorku na kolonu. Při splitování je směs vzorku a nosného plynu rozdělena na dvě nestejně velké části. Menší část vzorku vstupuje na kolonu, větší do odpadu.³

Vzorek lze také nastříknout bez splitu (split less injection). Nástřik bez splitu je využíván pro analýzu směsí látek, které se výrazně liší bodem varu, nebo pro stopové analýzy.³

2.1.5. Využití plynové chromatografie

Plynová chromatografie se využívá pro kvalitativní i kvantitativní hodnocení směsí látek.

Kvalitativní analýza

Plynová chromatografie je metodou separační, nikoliv identifikační. Proto ji pro identifikaci primárně nevyužíváme. Pokud bychom se ji přesto rozhodli k identifikaci použít, musíme zvolit vhodný detektor (například hmotnostní detektor). Při kvalitativní analýze identifikujeme analyt srovnáváním jeho retenčních dat a retenčních dat standardu. Retenční data analytu odráží interakce analytu se stacionární a mobilní fází, jsou proto specifická pro daný chromatografický systém. Z toho vyplývá, že změny chromatografických podmínek způsobí změny retenčních parametrů. Z toho také vyplývá, že 100% identifikace není v chromatografii možná.²

Kvantitativní analýza

Kvantitativní analýzou zjišťujeme množství analyzované látky ve vzorku. Koncentrace dané látky je úměrná ploše, případně výšce píku. Vlastní určení obsahu látky ve vzorku se provádí z ploch píků vzorku a standardu. K určení používáme metodu vnitřního nebo vnějšího standardu, metodu standardního přídatku, metodu kalibrační křivky nebo metodu vnitřní normalizace.⁵

Metoda vnějšího standardu

Na kolonu nastříkneme roztok analyzovaného vzorku a poté roztok vnějšího standardu. Oba chromatogramy potom porovnááme. Jako vnější standard se používá látka odpovídající kvality, nejčastěji to bývá některá z analyzovaných složek. Koncentraci stanovované látky pak vypočítáme z poměru plochy pod píkem (výšky píku) dané látky a plochy pod píkem vnějšího standardu.⁵

Metoda vnitřního standardu

Pokud zvolíme metodu vnitřního standardu, tak ke stanovovanému vzorku přidáme inertní standard. Tato látka není přítomná v původním vzorku, nereaguje s ním, od všech složek vzorku musí být dostatečně oddělena a eluuje se v blízkosti stanovované látky. Vzorek homogenizujeme a poté nastříkneme na kolonu. Koncentraci dané látky opět vypočítáme z poměru plochy pod píkem (výšky píku) dané látky a plochy pod píkem vnitřního standardu. Tato metoda je méně časově náročná a přesnější než metoda předchozí.^{3,5}

Metoda standardního přídávku

Tato metoda se používá, pokud mezi signálem a koncentrací platí přímá úměra. To znamená, že mezi signálem a koncentrací je lineární závislost a roztok, který má nulovou koncentraci stanovované látky, dává nulový signál.³

Měření probíhá tak, že si připravíme dva roztoky o stejném objemu. Do obou roztoků dáme stejné množství vzorku, do jedné z nich navíc přidáme přesně známé množství látky, kterou chceme stanovit. Poté proměříme oba dva roztoky.⁵ Koncentraci stanovované látky vypočítáme podle následujícího vzorce:

$$c_x = \left(\frac{S_x}{S - S_x} \right) \cdot c_s$$

c_x - koncentrace vzorku

c_s - koncentrace standardního přídávku

S_x - signál vzorku

S - signál vzorku se standardním přídávkem

Metoda kalibrační křivky

Připravíme si roztoky se známými rostoucími koncentracemi analytu. Všechny roztoky postupně nastříkujeme na kolonu, proměříme píky odpovídající těmto roztokům, tak dostaneme dvojice hodnot plocha pod píkem a koncentrace dané látky. Tyto hodnoty vyneseme do grafu. Na osu y vynášíme hodnoty ploch pod píkem a na osu x vynášíme koncentraci. To znamená, že dostaneme závislost plochy pod píkem na koncentraci. Vynesené body poté proložíme regresí. Pokud pak proměříme další vzorek, vyneseme do kalibrační křivky plochu pod píkem a odečteme koncentraci stanovované látky ve vzorku.^{3,4,5,8}

Metoda vnitřní normalizace

Pokud používáme tuto metodu, předpokládáme stejné závislosti odezvy na obsahu pro všechny složky analyzované směsi. Při vlastním měření změříme plochy všech píků na chromatogramu, obsah stanovované látky pak vyhodnotíme jako procento plochy pod píkem stanovované látky ze součtu všech ploch pod píky na chromatogramu.⁵

2.2. Validace analytické metody

Validací rozumíme ověření účinnosti metody, pokud se změni podmínky, při kterých měření probíhá. Cílem validace je také prokázání toho, že metoda je pro daný typ stanovení vhodná. Jde o experimentální doložení přesnosti a správnosti výsledků. Sledujeme tyto validační parametry: selektivitu, linearitu, správnost, přesnost a robustnost.⁹

2.2.1. Selektivita

Selektivita je schopnost správného a přesného určení analytu v přítomnosti jiných látek. Tyto látky by neměly interferovat s analytem.

2.2.2. Linearita

Jedná se o rozmezí koncentrací, v nichž platí lineární vztah mezi koncentrací analytu a odezvou detektoru. Linearita je vyjádřena korelačním koeficientem r .⁹ Platí:

$$y = ax + b \quad r = 0,999$$

Korelační koeficient by měl být blízký 1.

2.2.3. Přesnost

Přesností rozumíme míru shody mezi několika výsledky měření jednoho vzorku. Rozlišujeme opakovatelnost, reprodukovatelnost a mezilehlou přesnost.

Opakovatelností rozumíme míru shody výsledků během jedné analýzy. Reprodukovatelností pak míru shody výsledků, pokud jsou měření prováděna dvěma laboratořemi. Mezilehlou přesností vyjadřujeme míru shody výsledků změřených v jedné laboratoři v různých časech.^{9,3}

Přesnost je vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou RSD. Platí:

$$RSD = (SD / \text{průměr}) \cdot 100$$

SD směrodatná odchylka

2.2.4. Správnost

Jde o shodu experimentálně zjištěných výsledků analytu ve vzorku s nominální hodnotou přidaného standardu. Správnost vyjadřujeme parametrem výtěžnost R. Platí:

$$R = \left(\frac{c}{c_{real}} \right) \cdot 100\%$$

R - výtěžnost

c - stanovená koncentrace

c_{real} - skutečná koncentrace³

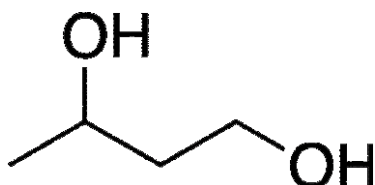
2.2.5. Robustnost

Robustností rozumíme míru vlivu kolísání podmínek, při kterých stanovení probíhá, na výsledek analytického stanovení. Zjišťujeme schopnost poskytovat spolehlivé výsledky i při nechtěných změnách chromatografických podmínek.¹⁰

2.3. Vlastnosti používaných látek

2.3.1. 1,3-butandiol

Vzorec: $C_4H_{10}O_2$



Mr: 90,123

1,3-butandiol je čirá, bezbarvá, hygroskopická, viskózní kapalina. Má slabou charakteristickou chuť a je bez zápachu. S vodou, etanolem acetonem je mísitelný v jakémkoli poměru. Je částečně rozpustný v etheru a nerozpustný v alifatických uhlovodících, tetrachlormetanu a olejích. Rozpouští většinu silic.

Používá se při přípravě kosmetických přípravků pro svůj hydratační účinek, dále se využívá jako extrakční prostředek pro výrobu extraktů z drog. Slouží pro výrobu umělých hmot a výbušnin. Protože má antimikrobiální vlastnosti, je součástí čistících přípravků.

Stanovení obsahu 1,3-butandiolu

Připravíme si acetylační činidlo smícháním 3,4 ml vody a 130 ml acetanhydridu. Do 1000,0 ml doplníme bezvodým pyridinem. Pro vlastní zkoušku nepipetujeme 20 ml tohoto činidla do 250,0 ml odměrné baňky, poté přidáme 1,0 g vzorku. Pod zpětným chladičem zahříváme. Po 1 hodině odstavíme a necháme zchladnout při pokojové teplotě. Poté chladič propláchneme 50 ml vody prosté oxidu uhličitého. Odměrnou baňku uzavřeme a vzorek zchladíme na 20 °C. Poté ke vzorku přidáme 0,5 ml fenolftaleinu a titrujeme hydroxidem sodným 0,5 mol/l za neustálého promíchávání do změny

zbarvení. Zkoušku také provedeme se slepým vzorkem a poté provedeme potřebné úpravy.

1 ml hydroxidu sodného 0,5 mol/l odpovídá 2,253 mg 1,3-butandiolu.^{11,12,13,14}

1,3-butandiol lze získat z mnoha materiálů, jako příklad je v Tabulce 1 uveden materiál a metoda, kterou se z něho 1,3-butandiol získává.

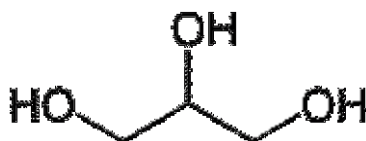
Tabulka 1: Materiály a metody stanovení 1,3-butandiolu a jiných diolů

látka	materiál	metoda	odkaz*
1,3-butandiol	roztok acetaldu	elektrolytická redukce	15
dioly	krevní sérum/moč	GC	16
1,3-butandiol	plná krev/sérum	GC/HPLC	17
dioly	komplexy s kyselinou boritou	MS	18
1,3-butandiol	roztok	acido-bazická titrace	11
organické sloučeniny	rostlinné extrakty	GC/MS	19

* odkaz na použitou literaturu

2.3.2. Glycerol

Vzorec: $C_3H_8O_3$



Mr: 92,090

Glycerol je sirupovitá kapalina, na omak mastná, čirá, bezbarvá nebo téměř bezbarvá, velmi hygroskopická kapalina. Je neomezeně mísitelný s vodou a s etanolem 96 %. Je těžce rozpustný v acetonu a je prakticky nerozpustný v mastných olejích a v silicích.

Glycerol je součástí dermatologických a kosmetických produktů na ochranu pokožky. Má schopnost zadržovat vlhkost v mastech a krémech. Má laxativní vlastnosti, proto se používá jako součást glycerinových čípků. Slouží také k přípravě trinitrátu glycerolu. Ve farmaceutickém průmyslu se používá jako pomocná látka.²⁰

Stanovení obsahu glycerolu

0,075 g glycerolu dobře promícháme se 45,0 ml vody. Poté přidáme 250,0 ml směsi objemových dílů kyseliny sírové 0,1 mol/l a jodistanu sodného 0,1 mol/l (1+20). Vzorek necháme 15 minut stát chráněný před světlem. Poté ke vzorku přidáme 5,0 ml roztoku ethylenglykolu (500 g/l) a necháme ho 20 minut stát chráněný před světlem. Po přidání 0,5 ml fenolftaleinu jako indikátoru titrujeme hydroxidem sodným 0,1 mol/l do změny zbarvení. Během titrace vzorek neustále promícháváme. Provedeme slepou zkoušku.

1 ml hydroxidu sodného 0,1 mol/l odpovídá 9,21 mg glycerolu.^{4,21,22,23}

3. Cíl práce

Cílem diplomové práce je validovat metodu pro stanovení 1,3-butandiolu a glycerolu ve směsi.

4. Experimentální část

4.1. Použitý materiál, pomůcky, přístroje a chemikálie

Chromatografická kolona:

Supelcowax-10 fused silica capillary column: 30 m × 0,53 mm × 0,5 μm film thickness, Supelco Inc, USA

Přístroje:

GC 2010 Gas Chromatograph Shimadzu, Japonsko

AOC-5000 Auto Injector, Shimadzu, Japonsko

GC Solution, Chromatography data system, Version 2.30.00 SU7, Shimadzu, Japonsko

Analytické váhy ADN, Japonsko

Chromatografické podmínky:

Nosný plyn: vodík

Rychlost průtoku nosného plynu: 150 m/s

Teplota nástřiku: 250 °C

Teplota kolony v úseku 1: 110 °C

Teplota kolony v úseku 2: nárůst teploty o 20 °C/min

Teplota kolony v úseku 3: 200 °C

Teplota detektoru: 300 °C

Pomůcky:

Laboratorní sklo a nádobí

Chemikálie:

1,3- butandiol, obsah 99,83 % Cleanese Texas, USA

Glycerol Sigma-Aldrich, Praha ČR
Methanol gradient grade Lichrosolv Merck, ČR
Propylenglycol ČSL 4 Sanitas a.s., Říčany

Vzorek, který jsem testovala, měl toto složení:

1,3-butandiol

Glycerol

Složka 1

Složka 2

Jako vnitřní standard jsem si zvolila 1,2-propandiol. Základní roztok vnitřního standardu měl toto složení:

1,2-propandiol	1,8 g
Methanol	ad 100,0 ml

Příprava vzorku k analýze:

Navážka (300 mg) se rozpustí ve 100 ml odměrné baňce v methanolu a přidá se 10 ml roztoku vnitřního standardu a doplní se methanolem po rysku. Základní navážka vzorku byla 300 mg.

Nejdříve jsem stanovovala vhodný splitovací poměr, dále jsem sledovala selektivitu, linearitu, přesnost, správnost a robustnost metody.

4.1.1. Splitovací poměr

Pro stanovení vhodného splitovacího poměru jsem si navážila 0,3070 g vzorku. Byly testovány následující splitovací poměry: 1:3, 1:5, 1:10 a 1:20.

4.1.2. Selektivita

Pro stanovení selektivity jsme si připravila následující methanolicke roztoky:

1,3- butandiolu, který obsahoval 0,1431 g ve 100 ml,

glycerolu, který obsahoval 0,1625 g ve 100 ml,

složky 1, který obsahoval 0,0774 g ve 100 ml,

složky 2, který obsahoval 0,0059 g ve 100 ml

a vnitřního standardu, který obsahoval 1,8034 g ve 100 ml.

Z každého roztoku jsem odebrala 10 ml, které jsem v odměrné baňce doplnila methanolem na 100 ml. Takto připravený vzorek jsme použila k analýze.

4.1.3. Linearita

Pro stanovení linearity jsem si připravila pět vzorků. První odpovídal 80 % základní navážky vzorku, druhý odpovídal 90 % základní navážky, třetí 100 % základní navážky, čtvrtý 110% základní navážky a pátý 120 % základní navážky.

Výpočtem jsem zjistila, jaké množství 1,3-butandiolu a glycerolu by měly jednotlivé vzorky obsahovat. Vypočtená množství jsou uvedena v Tabulce 2.

Tabulka 2: Vypočtená množství pro navážku 1,3- butandiolu a glycerolu

	80 %	90 %	100 %	110 %	120 %
	240 mg	270 mg	300 mg	330 mg	360 mg
1,3- butandiol	115,152 mg	129,564 mg	143,940 mg	158,334 mg	172,728 mg
glycerol	123,600 mg	139,050 mg	154,500 mg	169,950 mg	185,400 mg

Připravila jsem si dva vzorky. Skutečné navážky jsou uvedeny v Tabulce 3
Tabulce 4.

Tabulka 3: Navážky 1,3-butandiolu a glycerolu na vzorek 1

navážky-vzorek 1					
1,3-butandiol	116,1 mg	130,1 mg	145,9 mg	157,5 mg	173,0 mg
glycerol	124,1 mg	138,5 mg	153,6 mg	167,2 mg	184,5 mg

Tabulka 4: Navážky 1,3-butandiolu a glycerolu na vzorek 2

navážky-vzorek 2					
1,3-butandiol	115,7 mg	128,7 mg	144,1 mg	158,0 mg	177,2 mg
glycerol	124,3 mg	140,0 mg	154,0 mg	167,2 mg	184,5 mg

Vzorky jsem pak podrobila měření. Každá koncentrace od každého vzorku byla proměřena třikrát.

4.1.4. Přesnost

Pro stanovení přesnosti jsem si připravila šest vzorků. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Vzorky byly připraveny navážením 300 mg vzorku o základním složení. Navážky jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Navážky pro stanovení přesnosti

vzorek	1	2	3	4	5	6
navážka	303,8 mg	299,2 mg	314,5 mg	302,3 mg	301,5 mg	297,7 mg

Ke každému vzorku bylo přidáno 10 ml roztoku vnitřního standardu. Tento roztok jsem připravila navážením 4,5004 g 1,2-propandiolu a jeho naředěním methanolem na objem 250,0 ml.

Pro větší spolehlivost jsem měření provedla ještě jednou s nově připravenými vzorky. Navážky jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Navážky pro stanovení přesnosti

vzorek	1a	2a	3a	4a	5a	6a
navážka	298,2 mg	298,0 mg	297,5 mg	301,2 mg	301,0 mg	302,8 mg

Připravila jsem si i nový roztok vnitřního standardu. Tentokrát byl připraven navážením 4,4828 g 1,2-propandiolu a jeho naředěním methanolem na objem 250,0 ml.

4.1.5. Správnost

Pro stanovení správnosti jsem si připravila dvě série vzorků. Vzorky první série mají stejný obsah glycerolu a proměnlivý obsah 1,3-butandiolu. Jeho obsah je tam 80 %, 100 % a 120 % z obsahu v základním vzorku. V druhé sérii je stálý obsah 1,3-butandiolu proměnlivý obsah glycerolu. Glycerolu je tam 80 %, 100 % a 120 % z obsahu v původním vzorku. Vypočítala jsem si množství obou složek ve vzorcích. Vypočtená množství obou složek jsou uvedena v Tabulce 7 a Tabulce 8.

Tabulka 7: Vypočtené navážky při proměnlivém množství 1,3-butandiolu a konstantním množství glycerolu

	80 %	100 %	120 %
1,3-butandiol	115,152mg	143,940mg	172,728mg
	100 %	100 %	100 %
glycerol	154,500mg	154,500mg	154,500mg

Tabulka 8: Vypočtené navážky při proměnlivém množství glycerolu a konstantním množství 1,3-butandiolu

	80 %	100 %	120 %
glycerol	123,600mg	154,500mg	185,400mg
	100 %	100 %	100 %
1,3-butandiol	143,940mg	143,940mg	143,940mg

Skutečné navážky Jsou uvedeny v Tabulce 9 a Tabulce 10.

Tabulka 9: Skutečné navážky při proměnlivém množství 1,3-butandiolu a konstantním množství glycerolu.

	80 %	100 %	120 %
1,3-butandiol	113,700mg	142,500mg	172,400mg
	113,300mg	143,400mg	172,600mg
	100 %	100 %	100 %
glycerol	153,400mg	158,380mg	154,700mg
	153,900mg	154,200mg	154,600mg

Tabulka 10: Skutečné navážky při proměnlivém množství glycerolu a konstantním množství 1,3-butandiolu.

	80 %	100 %	120 %
glycerol	125,400mg	158,380mg	185,700mg
	127,200mg	154,200mg	185,200mg
	100 %	100 %	100 %
1,3-butandiol	142,500mg	143,600mg	144,700mg
	143,400mg	144,500mg	145,200mg

4.1.6. Robustnost

Posledním validačním parametrem byla robustnost. Sledovala jsem tyto parametry: stabilitu, průtok nosného plynu, teplotu detektoru, teplotu nástřiku, teplotu kolony, splňovací poměr a nosný plyn.

Pro stanovení stability vzorku jsem si navážila 297,900 mg základního vzorku. Tento vzorek jsem si připravila k měření. Měřila jsem ho v čase 0 (ihned po navážení), dále pak po 2 hodinách, po 4 hodinách, po 8 hodinách, po 12 hodinách a po 24 hodinách.

Průtok nosného plynu byl 150 m/s. Průtok jsem o 5 % snížila a zvýšila. Při měření tedy byl 142,5 m/s a 157,5 m/s.

Teplota detektoru byla 300 °C. Při měření jsem ji o 5 % snížila na 285 °C a o 5 % zvýšila na 315 °C.

Teplota nástřiku byla 250 °C. Pro účely měření byla o 5 % snížena na 237,5 °C a o 5 % zvýšena na 262,5 °C.

Kolona je z hlediska teploty rozdělena na 3 úseky. Úsek 1 je první částí kolony, kam vstupuje vzorek po nástřiku. V tomto úseku byla stálá teplota 110 °C. Snížila jsem ji o 5 % na 105,5 °C a poté zvýšila o 5 % na 116,5 °C. V úseku 2 se teplota zvyšuje o 20 °C/min. Pro účely měření jsem zvyšování teploty nastavila na 19 °C/min a na 21 °C/min. V úseku 3 je teplota na koloně opět stálá. Je 200 °C. Při měření jsem ji snížila o 5 % na 190 °C a zvýšila o 5 % na 210 °C.

Dále byla provedena změna splitovacího poměru. Všechna měření probíhala se splitovacím poměrem 5. Toto měření probíhalo se splitovacím poměrem 4 a 6.

Poslední měření proběhlo s jiným nosným plynem. Vodík byl zaměněn za helium.

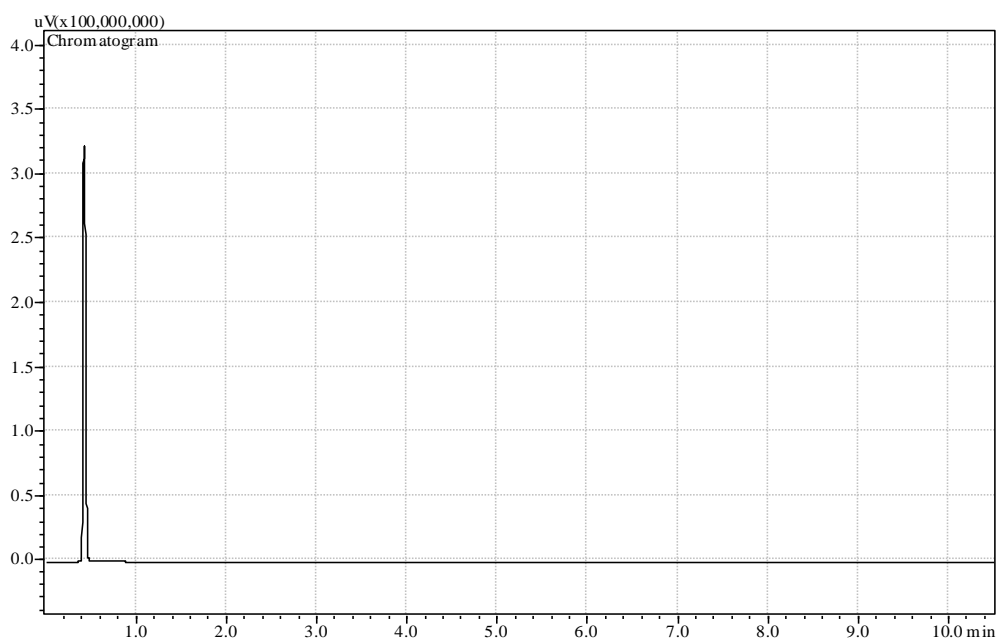
5. Výsledky a diskuse

5.1.Splitovací poměr

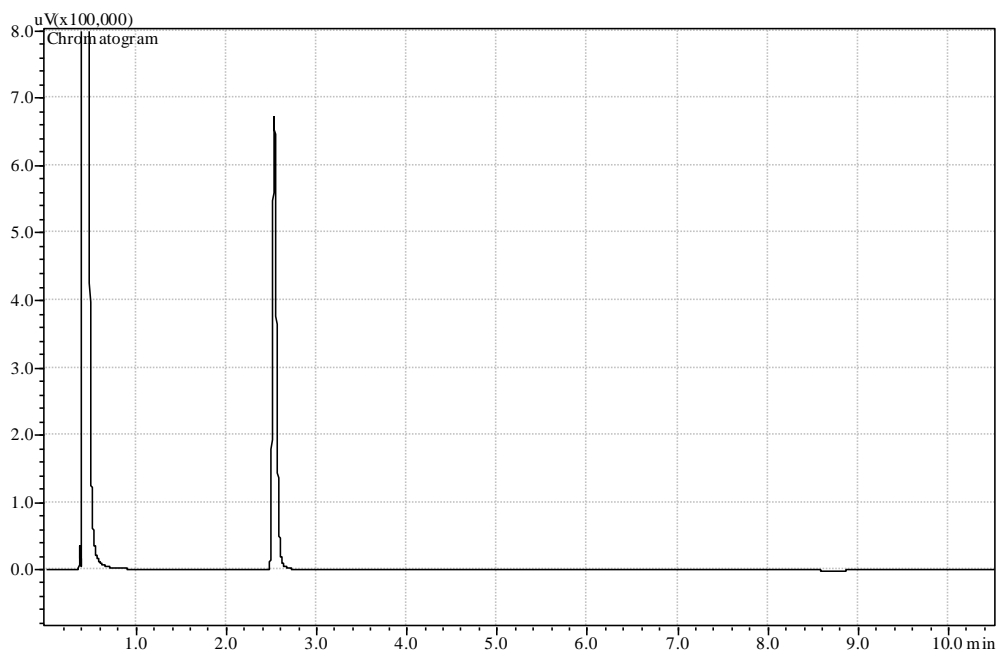
Jako nejvhodnější splitovací poměr jsem zvolila poměr 1:5. Při splitovacím poměru 1:3 byly plochy pod píky větší, než u mnou zvoleného poměru. Při splitovacích poměrech 1:10 a 1:20 byly plochy pod píky mnohem menší. Proto jsem zvolila splitovací poměr 1:5, píky jsou při něm dobře čitelné. S tímto poměrem byla provedena všechna následující měření.

5.2.Selektivita

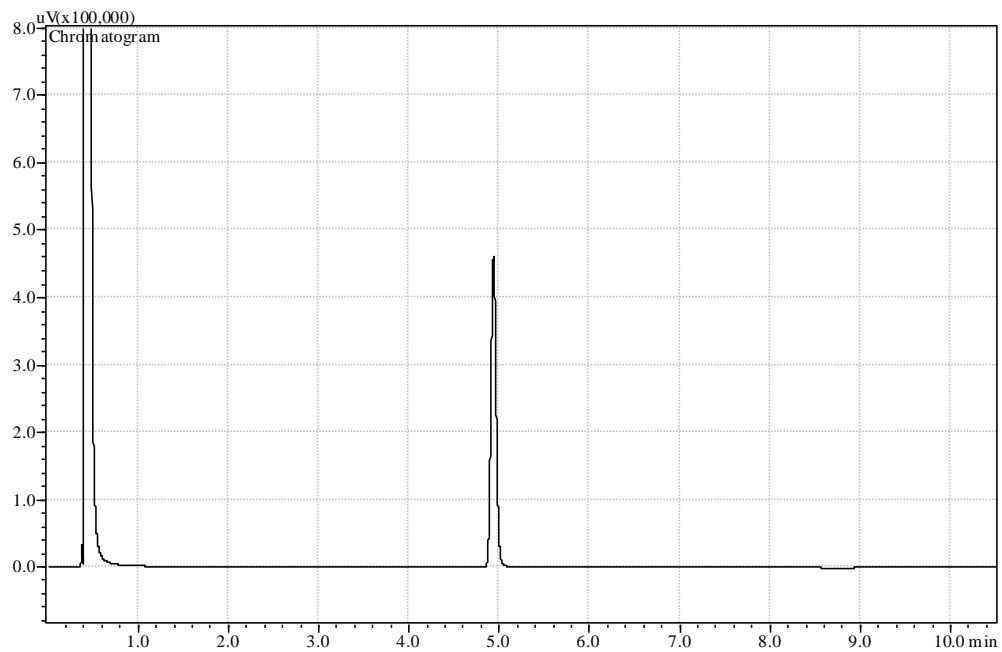
Při zkoušce na selektivitu jsem zjistila, že jednotlivé složky směsi jsou od sebe dobře oddělitelné. Jako důkaz poslouží chromatogramy, které při této zkoušce vznikly. Na Obrázku číslo 2 je patrná eluce methanolu (rozpouštědla). Na ostatních chromatogramech, které jsou na Obrázcích 3-7, odpovídá první pík rozpouštědlu. Ze všech chromatogramů uvedených na Obrázku 3-7 je patrné, že jednotlivé složky směsi se eluují samostatně. Metoda je tedy selektivní.



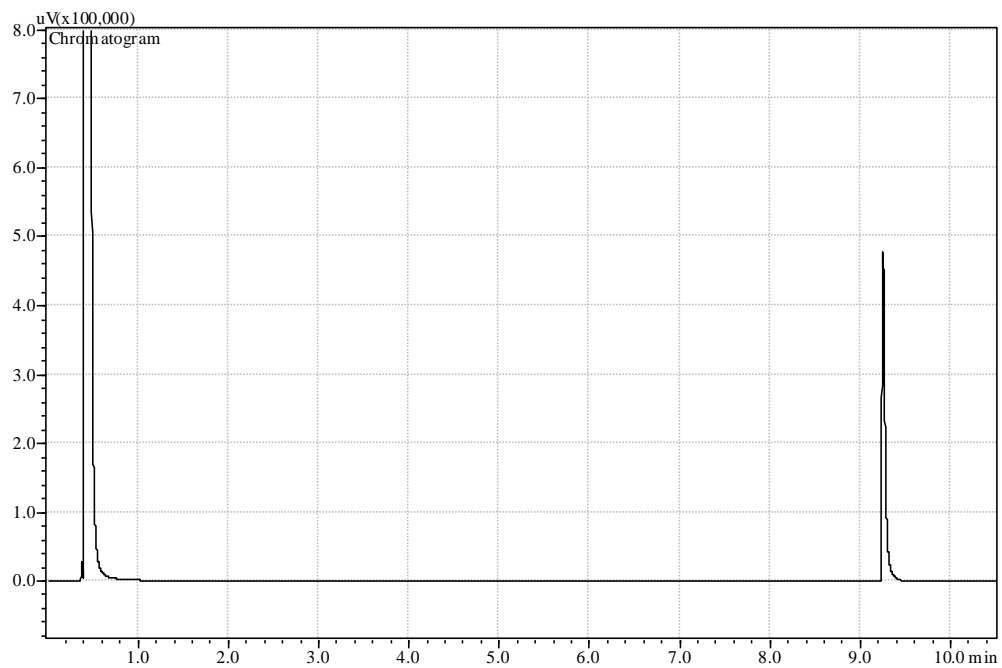
Obrázek 2: Chromatogram eluce methanolu



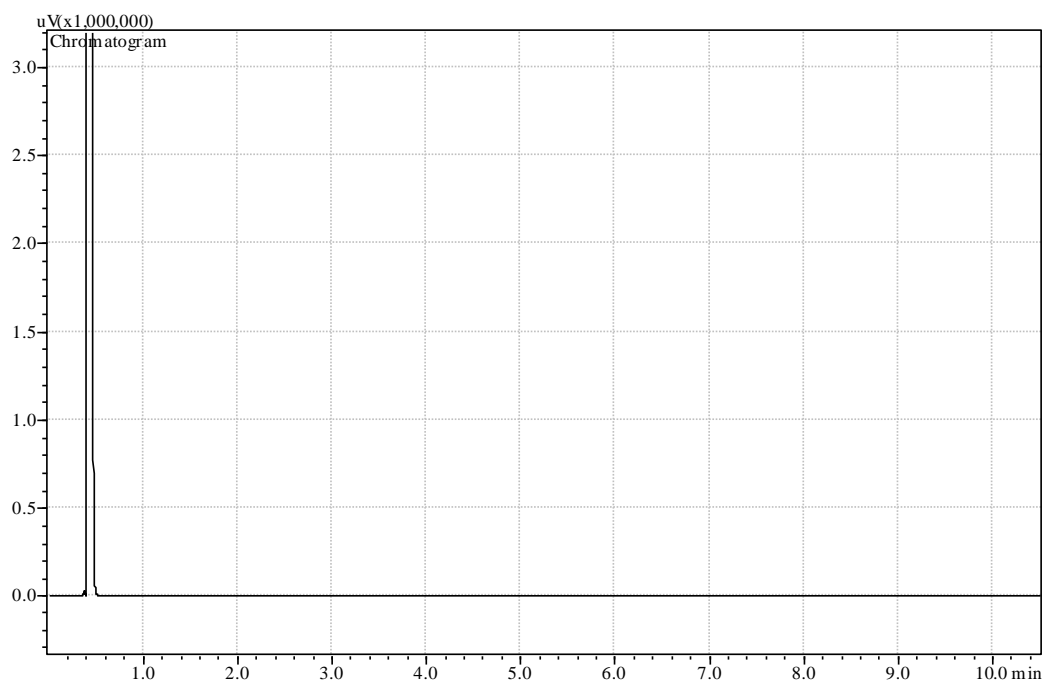
Obrázek 3: Chromatogram eluce vnitřního standardu.



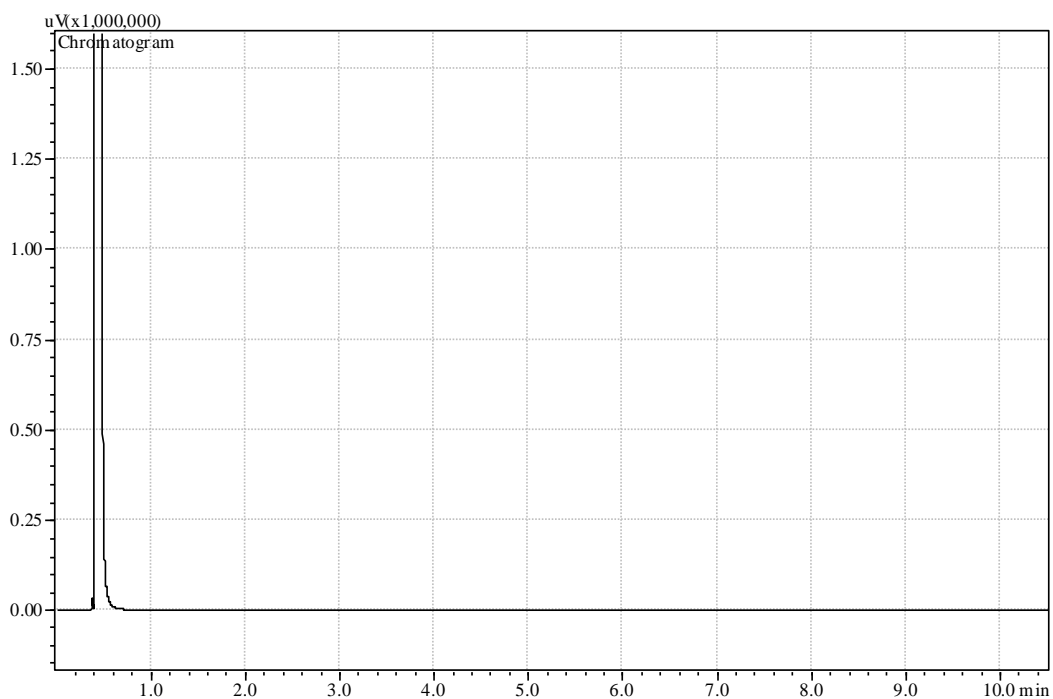
Obrázek 4: Chromatogram eluce 1,3- butandiolu



Obrázek 5: Chromatogram eluce glycerolu



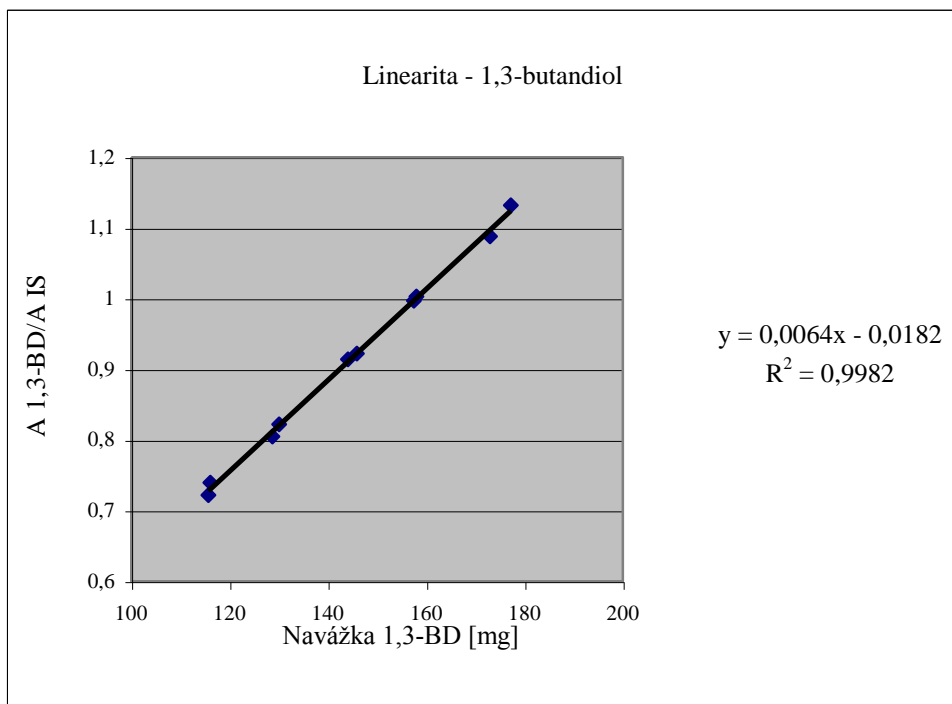
Obrázek 6: Chromatogram eluce Složky 1



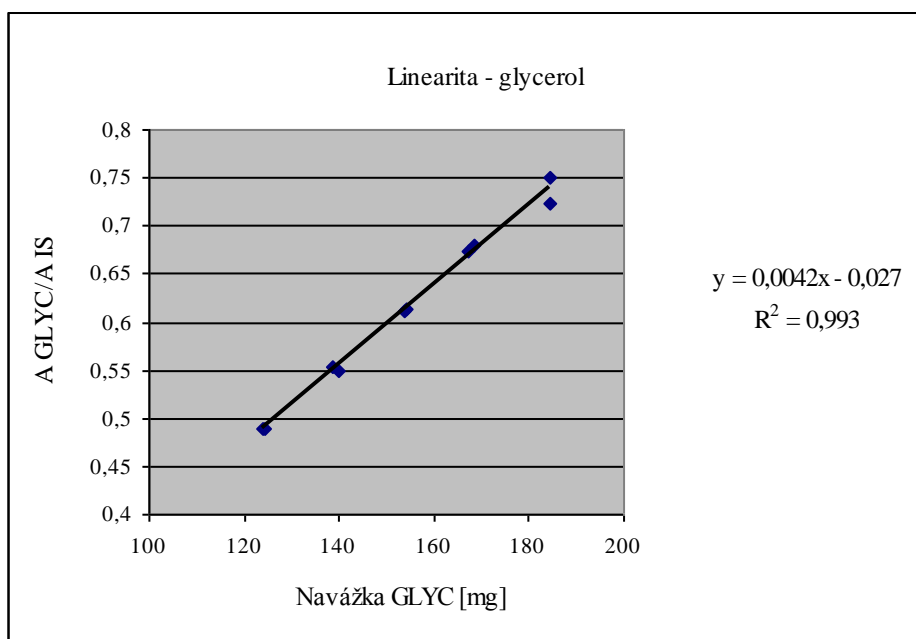
Obrázek 7: Chromatogram eluce Složky 2

5.3.Linearita

Z grafů na Obrázku 8 a Obrázku 9 je patrné, že byla prokázána lineární odezva detektoru pro 1,3-butandiol i glycerol v koncentracích 80, 90, 100, 110 a 120 %.



Obrázek 8: Linearita - 1,3-butandiol



Obrázek 9: Linearita – glycerol

5.4. Přesnost

Při zkoušce přesnosti jsem sledovala opakovatelnost a mezilehlou přesnost. Výsledky na zkoušku opakovatelnosti jsou shrnuty v Tabulce 11 a Tabulce 12. Připravila jsem si celkem 6 vzorků, které byly proměřeny v jeden den, ale v různých časech. Z tabulek je patrné, že opakovatelnost byla prokázána. Druhý den byla zkouška přesnosti provedena ještě jednou. Opět jsem si připravila 6 vzorků. Výsledky jsem zaznamenala do Tabulky 13 a Tabulky 14. Tyto výsledky byly použity pro stanovení mezilehlé přesnosti. Srovnáním výsledků z Tabulek 11 a 12 a Tabulek 13 a 14 byla mezilehlá přesnost potvrzena.

Tabulka 11: Stanovení opakovatelnosti pro 1,3-butandiol

	Area		Area	Poměr ploch	Průměr	Navážka (mg)	(průměr/nav) *100
Vnitřní standard	2 043 896	1,3-butandiol	1 889 752	0,9246	0,9256	303,8	0,3047
	2 036 886		1 889 093	0,9274			
	2 025 152		1 872 980	0,9249			
	2 099 652		1 869 599	0,8904	0,8914	299,2	0,2979
	2 069 061		1 842 727	0,8906			
	2 056 224		1 836 788	0,8933			
	2 075 838		1 956 008	0,9423	0,9416	314,5	0,2994
	2 072 859		1 951 152	0,9413			
	2 059 192		1 938 069	0,9412			
	2 082 525		1 880 814	0,9031	0,9030	302,3	0,2987
	2 075 850		1 875 235	0,9034			
	2 069 455		1 867 728	0,9025			
	2 046 805		1 862 372	0,9099	0,9099	301,5	0,3018
	2 057 300		1 869 787	0,9089			
	2 050 004		1 867 655	0,9110			
	2 068 674		1 841 500	0,8902	0,8898	297,7	0,2989
	2 064 472		1 837 486	0,8901			
	2 062 642		1 834 075	0,8892			

Tabulka 12: Stanovení opakovatelnosti pro glycerol

	Area		Area	Poměr ploch	Průměr	Navážka (mg)	(průměr/nav)*100
Vnitřní standard	2 043 896	Glycerol	1 218 669	0,5962	0,5997	303,8	0,1974
	2 036 886		1 223 976	0,6009			
	2 025 152		1 219 131	0,6020			
	2 099 652		1 241 996	0,5915	0,5886	299,2	0,1967
	2 069 061		1 213 606	0,5865			
	2 056 224		1 208 632	0,5878			
	2 075 838		1 287 198	0,6201	0,6219	314,5	0,1977
	2 072 859		1 288 598	0,6217			
	2 059 192		1 284 929	0,6240			
	2 082 525		1 251 782	0,6011	0,5971	302,3	0,1975
	2 075 850		1 241 293	0,5980			
	2 069 455		1 225 490	0,5922			
	2 046 805		1 222 372	0,5972	0,6005	301,5	0,1992
	2 057 300		1 231 619	0,5987			
	2 050 004		1 241 702	0,6057			
	2 068 674		1 222 154	0,5908	0,5870	297,7	0,1972
	2 064 472		1 206 316	0,5843			
	2 062 642		1 208 244	0,5858			

Tabulka 13: Stanovení mezilehlé přesnosti pro 1,3-butandiol

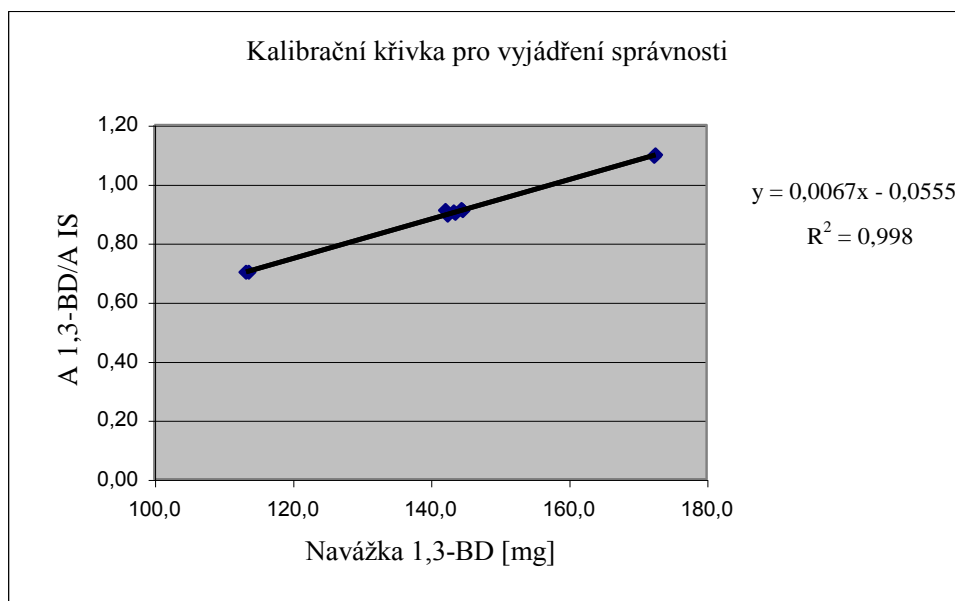
	Area		Area	Poměr ploch	Průměr	Navážka (mg)	(průměr/nav)*100
Vnitřní standard	2 092 700	1,3-butandiol	1 876 241	0,8966	0,8979	298,2	0,3011
	2 081 731		1 871 211	0,8989			
	2 078 125		1 866 699	0,8983			
	1 928 032		1 746 904	0,9061	0,9044	298,0	0,3035
	1 930 211		1 740 894	0,9019			
	1 929 907		1 747 231	0,9053			
	2 053 460		1 851 061	0,9014	0,9001	297,5	0,3026
	2 027 694		1 829 029	0,9020			
	2 028 167		1 818 922	0,8968			
	2 069 152		1 881 591	0,9094	0,9086	301,2	0,3017
	2 049 613		1 860 346	0,9077			
	2 037 835		1 852 176	0,9089			
	2 052 247		1 869 343	0,9109	0,9112	301,0	0,3027
	2 046 339		1 867 886	0,9128			
	2 049 233		1 864 784	0,9100			
	2 048 454		1 871 708	0,9137	0,9124	302,8	0,3013
	2 044 961		1 868 055	0,9135			
	2 036 692		1 853 432	0,9100			

Tabulky 14: Stanovení mezilehlé přesnosti pro glycerol

	Area		Area	Poměr ploch	Průměr	Navážka (mg)	(průměr/nav)*100
Vnitřní standard	2 092 700	Glycerol	1 282 042	0,6126	0,6110	298,2	0,2049
	2 081 731		1 273 019	0,6115			
	2 078 125		1 265 582	0,6090			
	1 928 032		1 175 608	0,6097	0,6081	298,0	0,2041
	1 930 211		1 163 469	0,6028			
	1 929 907		1 180 624	0,6118			
	2 053 460		1 253 413	0,6104	0,6091	297,5	0,2048
	2 027 694		1 224 306	0,6038			
	2 028 167		1 243 788	0,6133			
	2 069 152		1 250 910	0,6046	0,6099	301,2	0,2025
	2 049 613		1 258 030	0,6138			
	2 037 835		1 246 073	0,6115			
	2 052 247		1 257 534	0,6128	0,6131	301,0	0,2037
	2 046 339		1 254 019	0,6128			
	2 049 233		1 257 541	0,6137			
	2 048 454		1 240 463	0,6056	0,6128	302,8	0,2024
	2 044 961		1 251 233	0,6119			
	2 036 692		1 264 933	0,6211			

5.5.Správnost

Na Obrázku 10 je vyjádřena závislost poměru ploch 1,3-butandiolu a vnitřního standardu na navážce 1,3-butandiolu. V Tabulce 15 je pak vypočítána výtěžnost, která slouží k vyjádření správnosti metody.

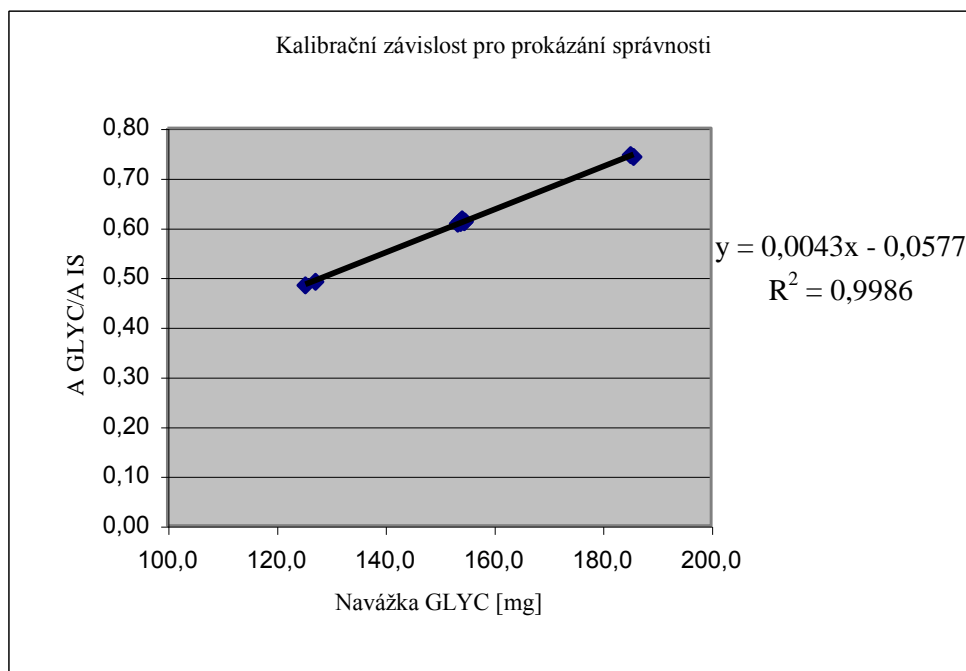


Obrázek 10: Závislost poměru plocha pod píkem 1,3-butandiolu ku ploše pod píkem vnitřního standardu na navážce 1,3-butandiolu

Tabulka 15: Stanovení správnosti pro 1,3-butandiol

Obsah 1,3BD	Výtěžnost (%)	SD	RSD
80%	99,54	0,2206	0,2216
100%	99,76	0,3599	0,3608
120%	99,66	0,2178	0,2186

Na Obrázku 11 je vyjádřena závislost poměru ploch glycerolu a vnitřního standardu na navážce glycerolu. V Tabulce 16 je pak vypočítána výtěžnost, která slouží k vyjádření správnosti metody.



Obrázek 11: Závislost poměru plocha pod píkem glycerolu ku ploše pod píkem vnitřního standardu na navážce glycerolu

Tabulka 16: Stanovení správnosti pro glycerol

Obsah GLYC	Výtěžnost (%)	SD	RSD
80%	100,32	0,0980	0,0977
100%	100,59	0,1272	0,1264
120%	100,49	0,0248	0,0247

Z tabulek i obrázků je patrné, že správnost metody byla potvrzena.

5.6. Robustnost

Při této zkoušce jsem měnila některé parametry, při kterých analýza probíhala, a sledovala jsme jejich vliv na změnu retenčního času, rozlišení, tailing faktoru (chvostování) a počtu teoretických pater.. Parametry, které se měnily, jsou následující: rychlost průtoku mobilní fáze, teplota detektoru, teplota nástřiku, teplota na koloně v úseku 1,2 a 3, splitovací poměr a změna nosného plynu. Také jsem sledovala, zda je vzorek stabilní.

5.6.1. Změna retenčních časů

Z Tabulky 17, 18 a 19 a z Obrázku 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 a 19 je patrné, které parametry ovlivňují retenční čas.

Při změně rychlosti průtoku mobilní fáze dojde k posunu retenčních časů. Čím je rychlost průtoku mobilní fáze vyšší, tím je kratší doba sorpce analytu na koloně a tím je také retenční čas kratší.

Při změně teploty na koloně v úseku 1 dojde k posunu retenčních časů. Čím je teplota na koloně v úseku 1 vyšší, tím je retenční čas kratší.

Další parametry (teplota detektoru, teplota nástřiku, teplota kolony v úseku 2 a 3, splitovací poměr a změna nosného plynu) retenční čas neovlivní.

Tabulka 17: Parametry, které ovlivňují změnu retenčního času vnitřního standardu

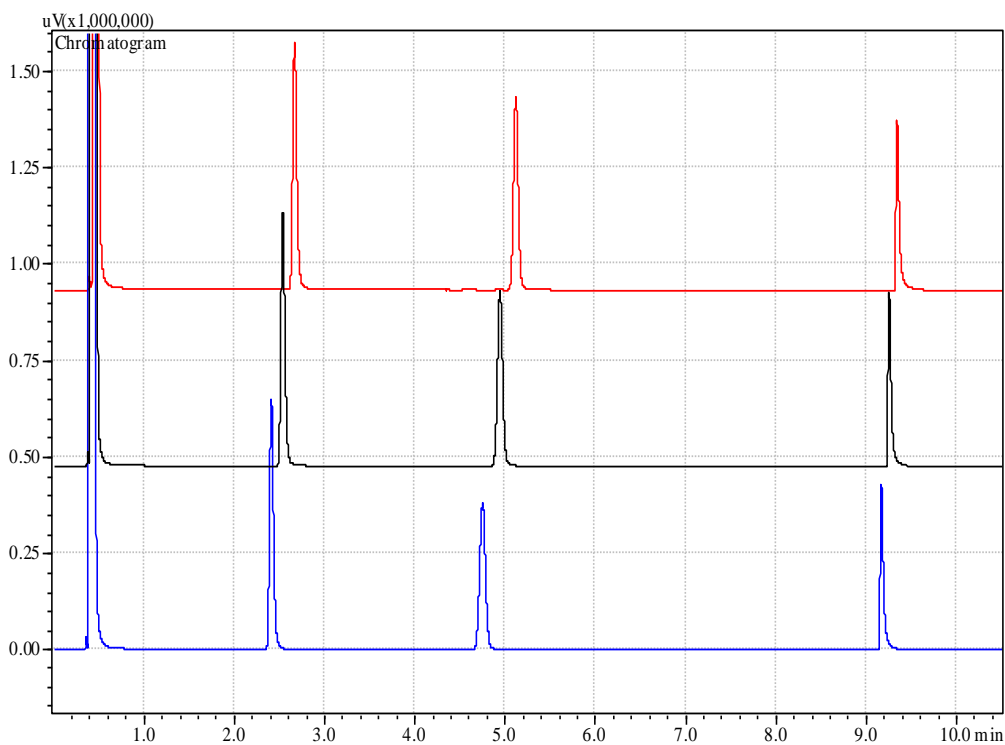
RETENČNÍ ČAS	IS					
	1	2	3	průměr	SD	RSD
měření						
optimální stav	2,537	2,534	2,533	2,5347	0,0021	0,0821
průtok mf <	2,667	2,665	2,665	2,6657	0,0012	0,0433
průtok mf >	2,412	2,410	2,411	2,4110	0,0010	0,0415
teplota kolony - úsek 1 <	3,111	3,110	3,111	3,1107	0,0006	0,0186
teplota kolony- úsek 1 >	2,090	2,090	2,089	2,0897	0,0006	0,0276

Tabulka 18: Parametry, které ovlivňují změnu retenčního času 1,3-butandiolu

RETENČNÍ ČAS	1,3-BD					
měření	1	2	3	průměr	SD	RSD
optimální stav	4,942	4,939	4,938	4,9397	0,0021	0,0421
průtok mf <	5,118	5,116	5,116	5,1167	0,0012	0,0226
průtok mf >	4,750	4,751	4,750	4,7503	0,0006	0,0122
teploty kolony - úsek 1 <	5,651	5,651	5,652	5,6513	0,0006	0,0102
teplota kolony- úsek 1 >	3,987	3,987	3,986	3,9867	0,0006	0,0145

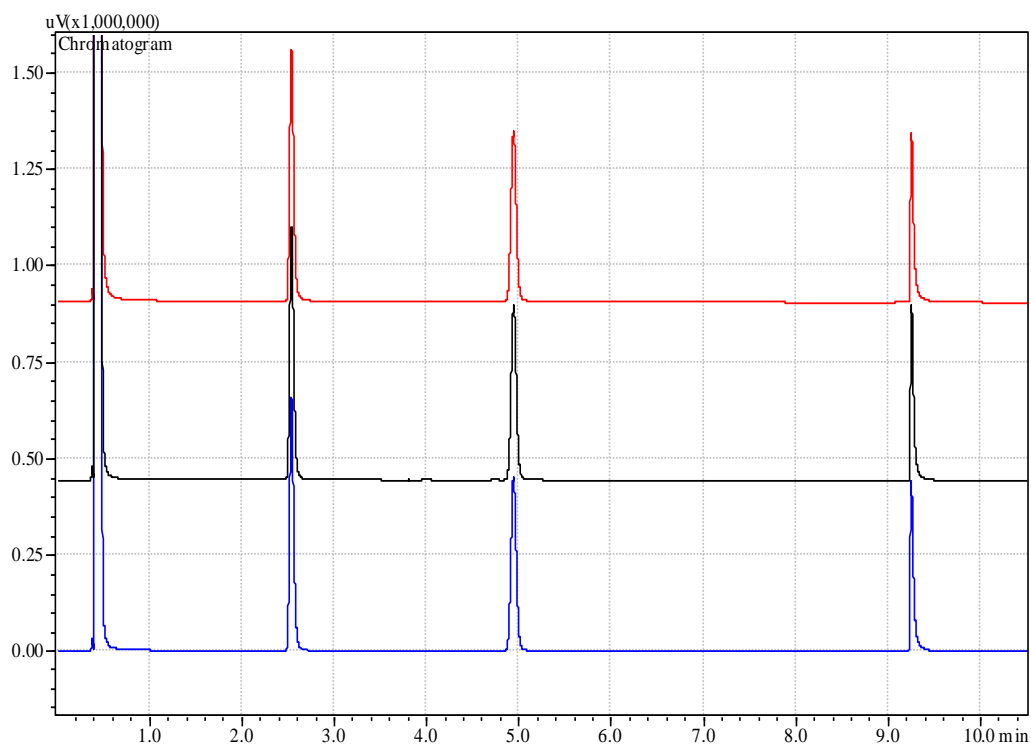
Tabulka 19: Parametry, které ovlivňují změnu retenčního času glycerolu

RETENČNÍ ČAS	GLYC					
měření	1	2	3	průměr	SD	RSD
optimální stav	9,253	9,252	9,252	9,2523	0,0006	0,0062
průtok mf <	9,342	9,341	9,342	9,3417	0,0006	0,0062
průtok mf >	9,167	9,167	9,166	9,1667	0,0006	0,0063
teplota kolony - úsek 1 <	9,548	9,547	9,547	9,5473	0,0006	0,0060
teplota kolony - úsek 1 >	8,943	8,942	8,940	8,9417	0,0015	0,0171



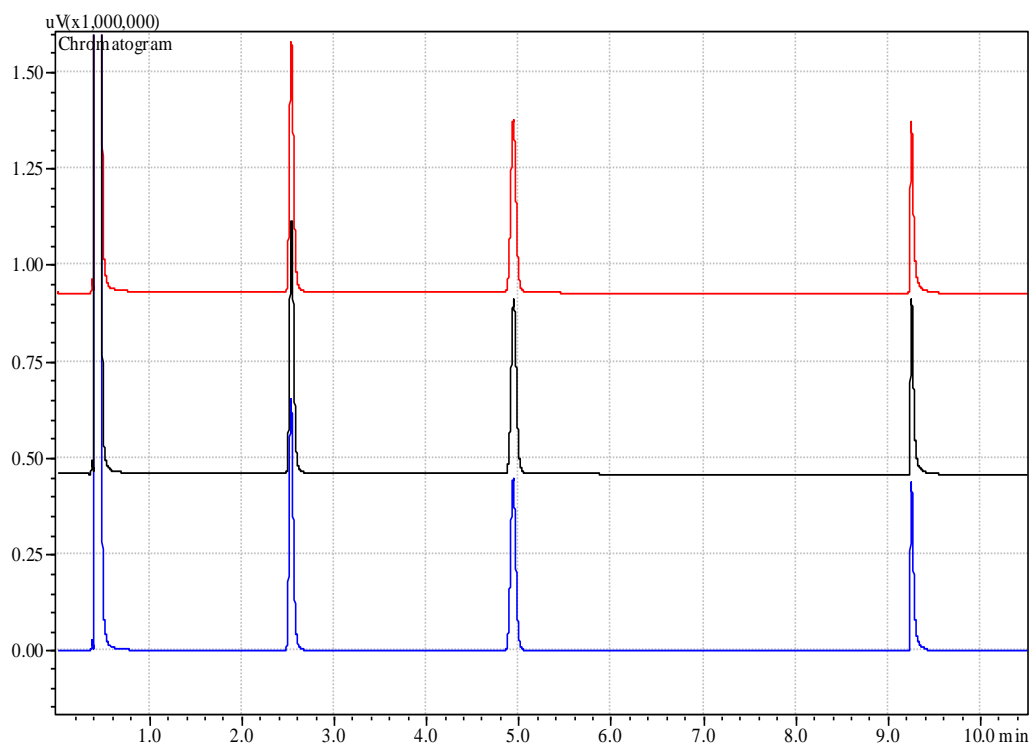
Obrázek 12: Změna průtoku mobilní fáze

černá – optimální stav červená - -5 % modrá - +5 %



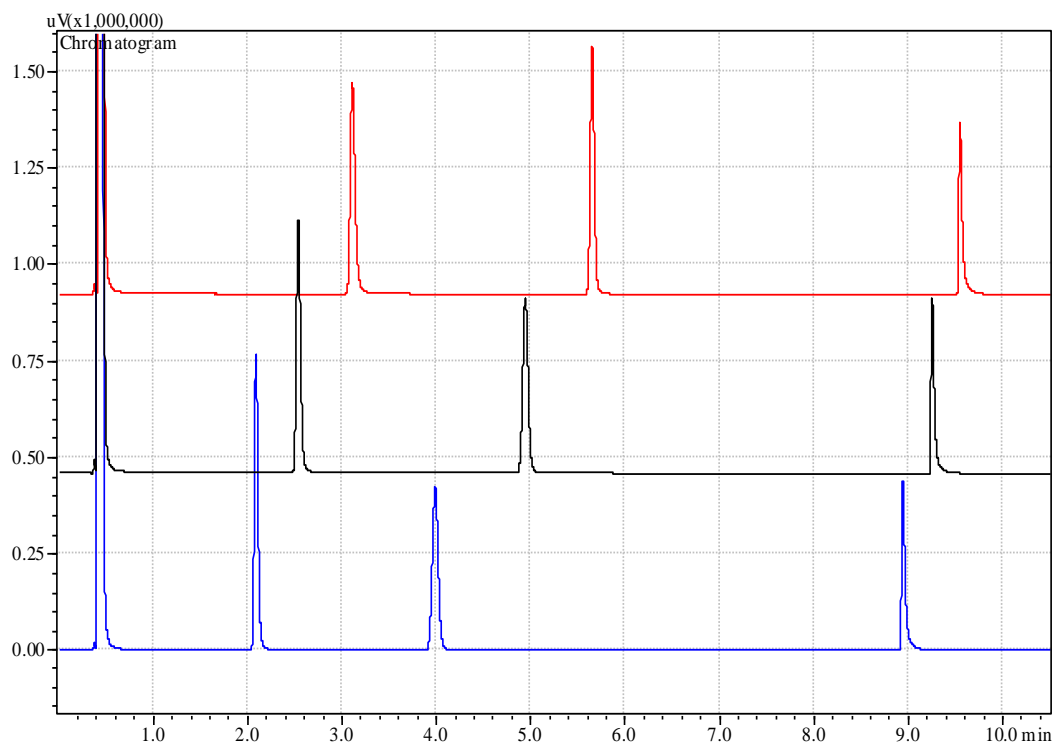
Obrázek 13: Změna teploty detektoru

černá – optimální stav červená - -5 % modrá - + 5%



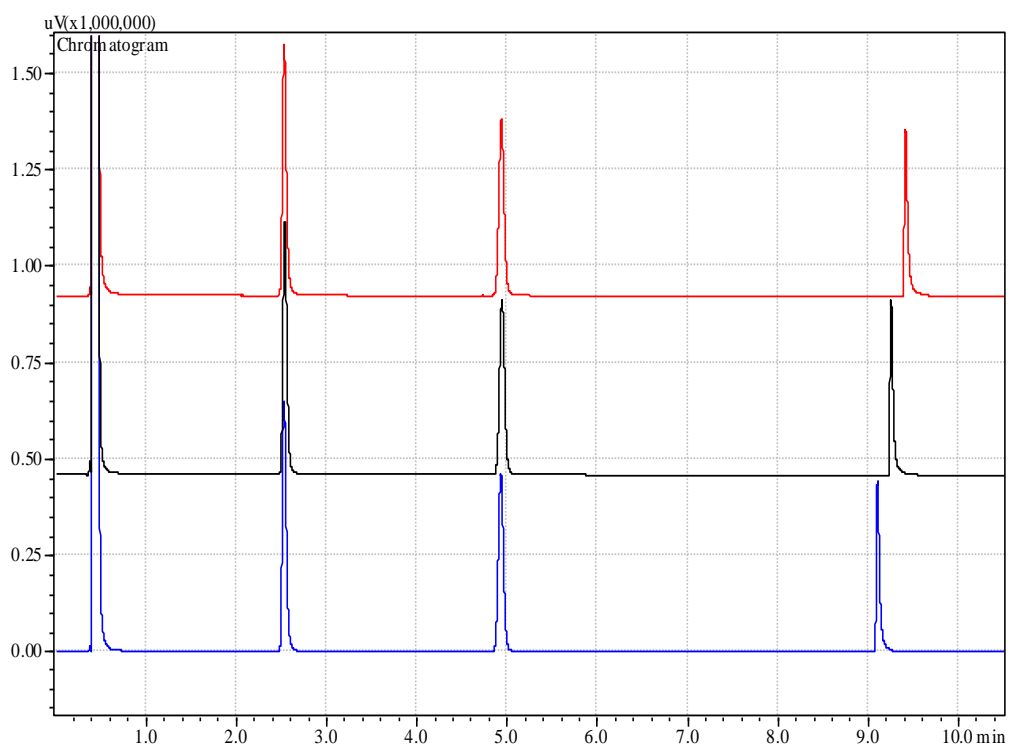
Obrázek 14: Změna teploty nástřiku

černá – optimální stav červená - -5 % modrá - +5 %



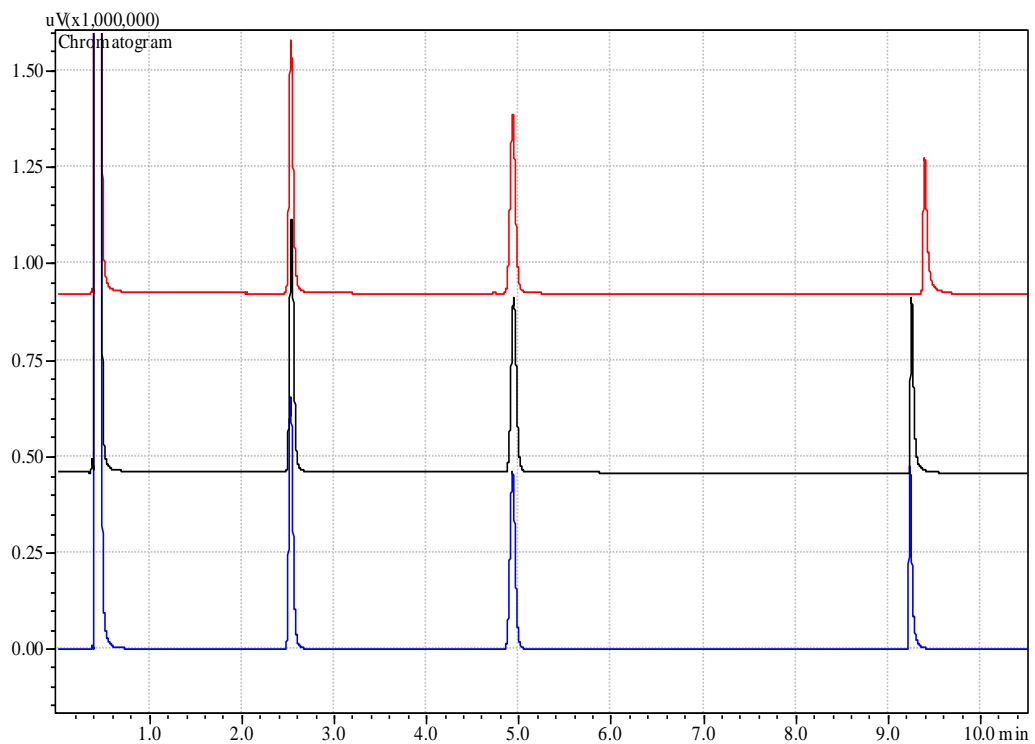
Obrázek 15: Změna teploty na koloně v úseku 1

černá – optimální stav červená - -5 % modrá - +5 %



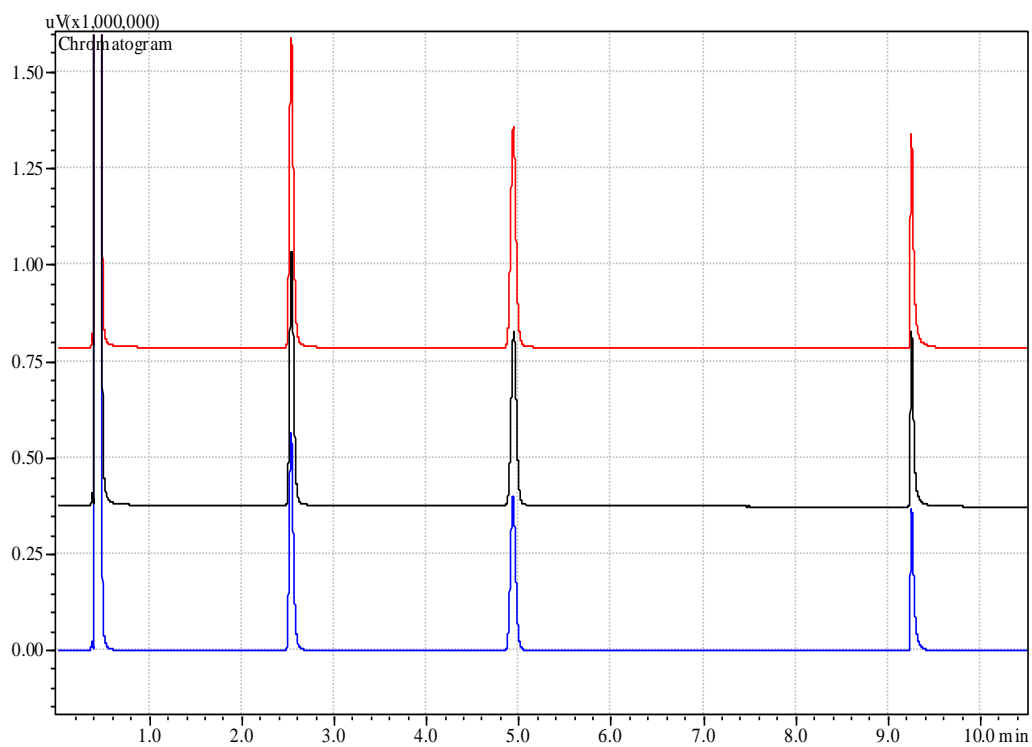
Obrázek 16: Změna teploty na koloně v úseku 2

černá – optimální stav červená - -5 % modrá - +5 %



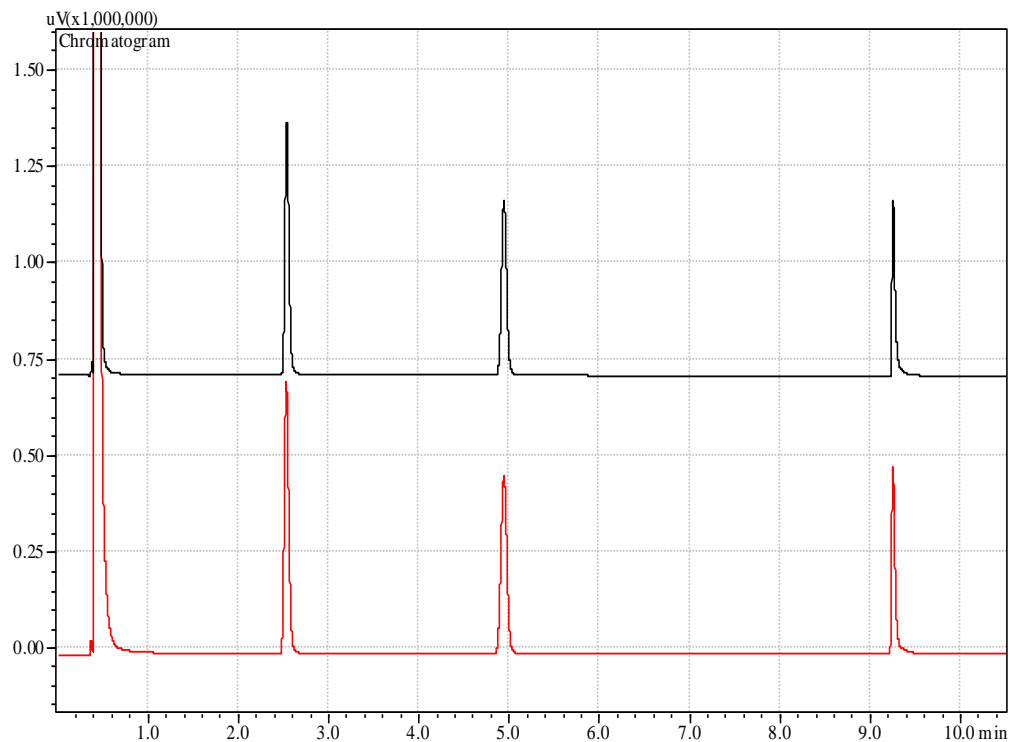
Obrázek 17: Změna teploty na koloně v úseku 3

černá – optimální stav červená - -5 % modrá - +5 %



Obrázek 18: Změna splitovacího poměru

černá – optimální stav červená - -5 % modrá - +5 %



Obrázek 19: Změna nosného plynu

černá – vodík červená – helium

5.6.2. Změna rozlišení

Z tabulky 20 a 21 je patrné, že za změnu rozlišení jsou zodpovědné tyto parametry: průtok mobilní fáze, teplota na koloně v úseku 1 a změna nosného plynu. Další parametry (teplota detektoru, teplota nástřiku, teplota kolony v úseku 2 a 3, splitovací poměr) rozlišení neovlivní.

Čím vyšší je rychlost průtoku mobilní fáze, tím nižší je rozlišení mezi jednotlivými píky.

Čím vyšší je teploty na koloně v úseku 1, tím nižší je rozlišení mezi jednotlivými píky.

Pokud změníme nosný plyn vodík za helium, snížíme tím rozlišení mezi jednotlivými píky.

Tabulka 20: Parametry, které ovlivňují rozlišení píků vnitřního standardu a 1,3-butandiolu

ROZLIŠENÍ	IS - 1,3-BD					
	1	2	3	průměr	SD	RSD
optimální stav	25,883	25,793	25,659	25,7783	0,1127	0,4373
průtok mf <	27,508	27,603	27,682	27,5977	0,0871	0,3157
průtok mf >	23,579	23,612	23,644	23,6117	0,0325	0,1376
teplota kolony - úsek 1 <	29,408	29,086	29,069	29,1877	0,1910	0,6544
teplota kolony - úsek 1 >	20,502	20,629	20,592	20,5743	0,0653	0,3175
nosný plyn H->He	22,250	22,160	22,194	22,2013	0,0454	0,2047

Tabulka 21: Parametry, které ovlivňují rozlišení píků 1,3-butandiolu a glycerolu

ROZLIŠENÍ	1,3-BD - GLYC					
	1	2	3	průměr	SD	RSD
optimální stav	52,275	51,826	51,729	51,9433	0,2913	0,5608
průtok mf <	54,004	54,264	54,425	54,2310	0,2124	0,3917
průtok mf >	49,058	49,038	49,260	49,1187	0,1228	0,2500
teplota kolony - úsek 1 <	55,971	55,266	55,605	55,6140	0,3526	0,6340
teplota kolony - úsek 1 >	55,701	55,958	55,990	55,8830	0,1584	0,2835
nosný plyn H->He	44,900	44,922	45,206	45,0093	0,1707	0,3792

5.6.3. Změna tailing faktoru

Z Tabulky 22, 23 a 24 je patrné, že tailing faktor ovlivňují následující parametry: rychlost průtoku mobilní fáze, teplota detektoru, teplota na koloně v úseku 1, změna splitovacího poměru a změna nosného plynu. Další parametry (teplota nástřiku, teplota na koloně v úseku 2 a 3) tailing faktor neovlivní.

Čím vyšší je průtok mobilní fáze, tím vyšší je i tailing faktor.

Čím vyšší je teplota detektoru, tím nižší je tailing faktor.

Čím vyšší je teplota na koloně v úseku 1, tím nižší je tailing faktor.

Čím vyšší je splitovací poměr, tím vyšší je tailing faktor.

Pokud zamění nosný plyn vodík za helium, dojde ke snížení tailing faktoru.

Tabulka 22: Parametry, které ovlivňují tailing faktor píku vnitřního standardu

TAILLING FACTOR	IS					
	1	2	3	průměr	SD	RSD
měření						
optimální stav	1,228	1,261	1,261	1,2500	0,0191	1,5242
průtok mf <	1,270	1,272	1,278	1,2733	0,0042	0,3270
průtok mf >	1,261	1,260	1,259	1,2600	0,0010	0,0794
teplota-detektor <	1,265	1,264	1,259	1,2627	0,0032	0,2546
teplota-detektor >	1,243	1,254	1,248	1,2483	0,0055	0,4412
teplota kolony - úsek 1 <	1,350	1,340	1,338	1,3427	0,0064	0,4788
teplota kolony - úsek 1 >	1,230	1,235	1,240	1,2350	0,0050	0,4049
splitovací poměr 4	1,292	1,283	1,271	1,2820	0,0105	0,8218
splitovací poměr 6	1,317	1,317	1,313	1,3157	0,0023	0,1755
nosný plyn H->He	1,219	1,229	1,224	1,2240	0,0050	0,4085

Tabulka 23: Parametry, které ovlivňují tailing faktor píku 1,3-butandiolu

TAILLING FACTOR	1,3-BD					
	1	2	3	průměr	SD	RSD
měření						
optimální stav	1,081	1,081	1,083	1,0817	0,0012	0,1068
průtok mf <	1,082	1,087	1,081	1,0833	0,0032	0,2967
průtok mf >	1,038	1,028	1,046	1,0373	0,0090	0,8694
teplota-detektor <	1,084	1,095	1,081	1,0867	0,0074	0,6783
teplota-detektor >	1,089	1,086	1,083	1,0860	0,0030	0,2762
teplota kolony - úsek 1 <	1,121	1,114	1,107	1,1140	0,0070	0,6284
teplota kolony - úsek 1 >	1,075	1,074	1,078	1,0757	0,0021	0,1935
splitovací poměr 4	1,086	1,083	1,079	1,0827	0,0035	0,3244
splitovací poměr 6	1,102	1,109	1,098	1,1030	0,0056	0,5048
nosný plyn H->He	1,043	1,054	1,048	1,0483	0,0055	0,5254

Tabulka 24: Parametry, které ovlivňují tailing faktor píku glycerolu

TAILLING FACTOR	GLYC					
	1	2	3	průměr	SD	RSD
měření						
optimální stav	2,067	2,146	2,181	2,1313	0,0584	2,7400
průtok mf <	2,207	2,194	2,231	2,2107	0,0188	0,8491
průtok mf >	2,214	2,192	2,180	2,1953	0,0172	0,7855
teplota-detektor <	2,162	2,208	2,198	2,1893	0,0242	1,1051
teplota-detektor >	2,142	2,176	2,186	2,1680	0,0231	1,0639
teplota kolony - úsek 1 <	2,247	2,261	2,269	2,2590	0,0111	0,4929
teplota kolony - úsek 1 >	2,308	2,282	2,308	2,2993	0,0150	0,6528
splitovací poměr 4	2,270	2,251	2,246	2,2557	0,0127	0,5614
splitovací poměr 6	2,344	2,366	2,320	2,3433	0,0230	0,9818
nosný plyn H->He	1,946	1,976	1,973	1,9650	0,0165	0,8409

5.6.4. Změna počtu teoretických pater

Ke změně počtu teoretických pater dojde, pokud se změní následující parametry: průtok mobilní fáze, teplota na koloně v úseku 1 a změna nosného plynu. Je to patrné z výsledků měření uvedených v Tabulce 25, 26 a 27. Parametry (teplota detektoru, teplota nástřiku, teplota na koloně v úseku 2 a 3, splitovací poměr) počet teoretických pater neovlivní.

Pokud zvýšíme rychlost průtoku mobilní fáze, dojde ke snížení počtu teoretických pater v systému.

Pokud zvýšíme teplotu na koloně v úseku 1, Snížení počtu teoretických pater.

Pokud změním nosný plyn, dojde ke snížení počtu teoretických pater v systému.

Tabulka 25: Parametry, které ovlivňují změnu počtu teoretických pater

POČET TEORET. PATER	IS					
	1	2	3	průměr	SD	RSD
měření						
optimální stav	15 854	15 742	15 658	15 751	98,8001	0,6272
průtok mf <	16 728	16 870	16 794	16 797	70,9282	0,4223
průtok mf >	14 869	14 862	14 871	14 867	4,3691	0,0294
teplota kolony - úsek 1 <	17 404	17 074	16 971	17 150	226,3377	1,3198
teplota kolony - úsek 1 <	14 437	14 771	14 682	14 630	173,1009	1,1832
nosný plyn H->He	12 328	12 346	12 146	12 273	110,5330	0,9006

Tabulka 26: Parametry, které ovlivňují změnu počtu teoretických pater

POČET TEORET. PATER	1,3-BD					
	1	2	3	průměr	SD	RSD
měření						
optimální stav	34 905	34 596	34 092	34 531	410,3222	1,1883
průtok mf <	45 274	45 477	46 079	45 610	418,5435	0,9177
průtok mf >	25 071	25 196	25 325	25 197	127,3827	0,5055
teplota kolony - úsek 1 <	81 878	79 808	80 145	80 610	1 110,9275	1,3781
teplota kolony - úsek 1 >	18 889	19 007	18 965	18 954	60,0213	0,3167
nosný plyn H->He	24 598	24 152	24 590	24 447	255,2529	1,0441

Tabulka 27: Parametry, které ovlivňují změnu počtu teoretických pater

POČET TEORET. PATER	GLYC					
	1	2	3	průměr	SD	RSD
měření						
optimální stav	386 464	372 087	377 344	378 632	7 274,3409	1,9212
průtok mf <	380 035	385 411	383 282	382 910	2 707,2502	0,7070
průtok mf >	366 996	363 208	368 324	366 176	2 654,5253	0,7249
teplota kolony - úsek 1 <	396 986	387 469	396 220	393 558	5 287,2477	1,3434
teplota kolony - úsek 1 >	329 191	334 009	336 152	333 117	3 564,8695	1,0702
nosný plyn H->He	310 852	319 470	320 298	316 873	5 230,6571	1,6507

5.6.5. Změna poměru plochy pod píkem zkoumané látky ku ploše pod píkem standardu

Změnu poměru plochy pod píkem zkoumané látky ku ploše pod píkem standardu ovlivní tyto parametry: průtok mobilní fáze a teplota kolony v úseku 1. Je to patrné z Tabulky 28 a Tabulky 29.

Další parametry (teplota detektoru, teplota nástřiku, teplota kolony v úseku 2 a 3, splitovací poměr a změna nosného plynu) analýzu neovlivní.

Tabulka 28: Parametry, které ovlivňují poměr plochy pod píkem 1,3-butandiolu ku ploše pod píkem vnitřního standardu

ZMĚNA POMĚRU PLOCHY POD PÍKEM 1,3-BD KU PLOŠE POD PÍKEM IS			
parametry	A IS	A 1,3-BD	A 1,3-BD/A IS
optimální stav	2 062 191	1 825 643	0,8853
průtok mf <	2 066 723	1 849 424	0,8949
průtok mf >	2 029 603	1 782 912	0,8785
teplota kolony - úsek 1 <	2 041 075	1 953 636	0,9570
teplota kolony - úsek 1 >	2 090 382	1 885 538	0,9020

Tabulka 29: Parametry, které ovlivňují poměr plochy pod píkem glycerolu ku ploše pod píkem vnitřního standardu

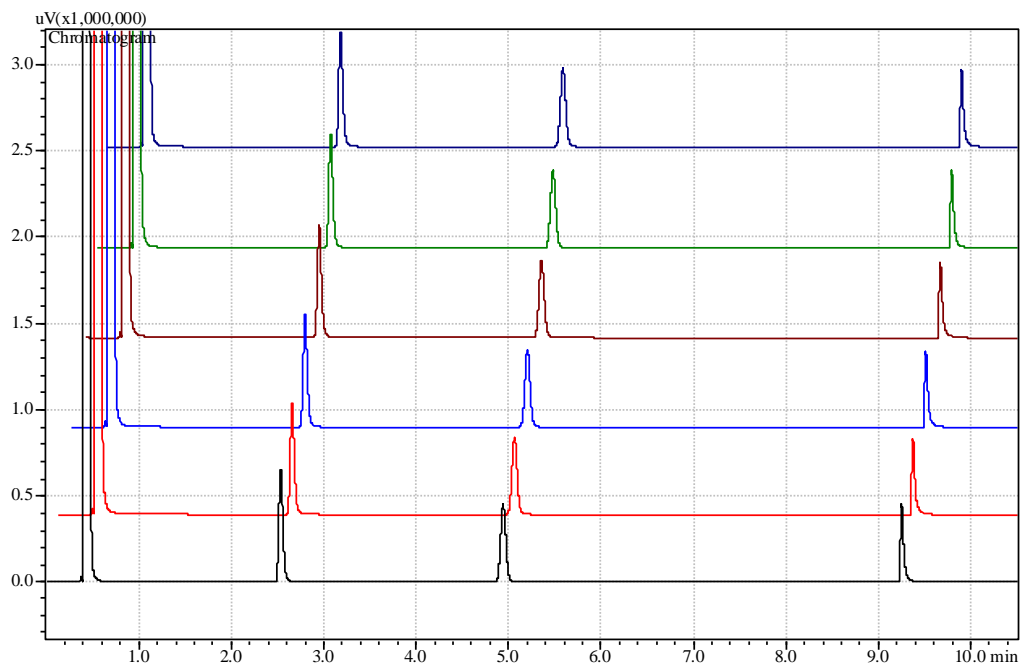
ZMĚNA POMĚRU PLOCHY POD PÍKEM 1,3-GLYC KU PLOŠE POD PÍKEM IS			
	A IS	A GLYC	A GLYC/A IS
optimální stav	2 062 191	1 185 821	0,5750
průtok mf <	2 066 723	1 201 729	0,5815
průtok mf >	2 029 603	1 193 284	0,5879
teplota kolony - úsek 1 <	2 041 075	1 230 320	0,6027
teplota kolony - úsek 1 >	2 090 382	1 232 786	0,5897

5.6.6. Stabilita

Vzorek byl zkoumán i z hlediska stability. Z Tabulky 30 i z chromatogramu na Obrázku 20 je patrné, že používaný vzorek je stabilní. Nepodléhá žádným rozkladným změnám po dobu 24 hodin.

Tabulka 30: Stabilita vzorku

	IS	1,3-BD					GLYC				
	Area	Area	Poměr ploch	Průměr	SD	RSD	Area	Poměr ploch	Průměr	SD	RSD
Čas 0 hod	2 063 206	1 829 851	0,8869	0,8852	0,0017	0,1883	1 189 319	0,5764	0,5750	0,0019	0,3272
	2 061 284	1 825 085	0,8854				1 186 790	0,5758			
	2 062 082	1 821 993	0,8836				1 181 355	0,5729			
Čas 2 hod	2 042 475	1 807 884	0,8851	0,8857	0,0006	0,0701	1 177 075	0,5763	0,5810	0,0042	0,7223
	2 040 676	1 806 938	0,8855				1 188 564	0,5824			
	2 047 216	1 814 532	0,8863				1 196 239	0,5843			
Čas 4 hod	2 063 183	1 821 309	0,8828	0,8835	0,0009	0,1013	1 187 466	0,5756	0,5806	0,0046	0,7972
	2 056 685	1 818 956	0,8844				1 196 074	0,5816			
	2 057 229	1 819 002	0,8842				1 202 767	0,5847			
Čas 8 hod	2 062 484	1 826 848	0,8858	0,8854	0,0016	0,1858	1 186 158	0,5751	0,5778	0,0029	0,5028
	2 068 277	1 825 555	0,8826				1 201 450	0,5809			
	2 074 037	1 835 811	0,8851				1 197 783	0,5775			
Čas 12 hod	2 084 086	1 844 494	0,8850	0,8845	0,0007	0,0743	1 214 115	0,5826	0,5861	0,0033	0,5545
	2 078 998	1 837 428	0,8838				1 219 761	0,5867			
	2 081 527	1 840 128	0,8840				1 225 966	0,5890			
Čas 24 hod	2 105 486	1 864 329	0,8855	0,8854	0,0015	0,1696	1 204 411	0,5720	0,5707	0,0056	0,9852
	2 090 757	1 856 552	0,8880				1 203 191	0,5755			
	2 092 291	1 852 316	0,8853				1 181 074	0,5645			



Obrázek 20: Chromatogram pro průkaz stability

černá – 0 hod červená – 2 hod modrá – 4 hod hnědá – 8
hod zelená – 12 hod tmavomodrá – 24 hod

6. Závěr

V této diplomové práci jsem chtěla nastínit téma analýzy pomocí plynové chromatografie a validaci analytické metody.

Práce ukazuje, jaké podmínky, při kterých metoda probíhá, mohou být pozměněny, aniž by došlo k ovlivnění výsledků analýzy. Ukázalo se, že bez ovlivnění výsledků mohou být pozměněny tyto podmínky: splitovací poměr, teplota na koloně v úseku 2 a 3, teplota nástřiku. Zároveň došlo k prokázání linearit, správnosti, přesnosti a selektivity metody.

Metodu je možné považovat za validovanou.

7. Seznam použité literatury

- ¹ Karlíček, R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2005
- ² Klimeš, J. a kol.: Kontrola léčiv I, Karolinum, Praha 2002
- ³ Klouda, P.: Moderní analytické metody, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003
- ⁴ Český lékopis 2005, Grada, Praha 2005
- ⁵ Literák, J., Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita [online] 2008 [cit. 2008-05-08] dostupné na <<http://www.chemi.muni.cz/~literak/uvod.pdf>>
- ⁶ Ševčík, J., G., K., Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Karlova Univerzita [online] 2008 [cit. 2008-05-08] dostupné na <http://www.natur.cuni.cz/~sevcik/plyn_chrom.pdf>
- ⁷ Grob, R., Barry, E., F.: Modern practise of gas chromatography 4th ed., Wiley-Interscience, NewYersy 2004
- ⁸ Synek, V., Fakulta životního prostředí, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem [online] 2008 [cit. 2008-05-08] dostupné na <<http://www.fzp.ujep.cz/~synek/analytika/texty/8Kalibrace.doc>>
- ⁹ The international Conference on Harmanization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [online] 2005 [cit. 2008-05-08] dostupné na <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>
- ¹⁰ Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav konzervace potravin a technologie masa, [online] [cit. 2009-1-13] dostupné na http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/ana/validace.pdf
- ¹¹ Institut of Medicine of the National Academics: Food Chemical Codex 5, 2004, The national academies press, 500 Fifth Street, N. W., Washington, DC
- ¹² Vohlídal, J., Julák, A., Škulík, K.: Chemické a analytické tabulky, Grada, Praha 1999

-
- ¹³ Špalová, K.: Využití plynové chromatografie v kontrole léčiv II, Diplomová práce, FaF UK, Hradec Králové, 2008
- ¹⁴ Scorecard, The pollution information site [online] [cit. 2009-3-21] Dostupné z: <http://www.scorecard.org/chemical-profiles/summary.tcl?edf_substance_id=107-88-0#use_profile>
- ¹⁵ Kyriakides L. P., Some Organic Preparations, J. Am. Chem. Soc. 36 (1914) 530-537
- ¹⁶ Houzé P., Chaussard J., Harry P., Pays M., Simultaneous determination of ethylene glycol, propylene glycol, 1,3-butylene glycol and 2,3-butylene glycol in human serum and urine by wide-bore column gas chromatography, J. Chromatogr. 619 (1993) 251-257
- ¹⁷ Moffatt E. J., Hagardorn A. N., Ferslew K. E., A gas-liquid chromatographic method for quantitation of 1,3-butylene glycol in whole blood or plasma and the separation of the short chain glycols, J. Anal. Toxicol. 10 (1986) 35-37
- ¹⁸ Ackloo S. Z., Burgers P. C., McCarry B. E., Terlouw J. K., Structural Analysis of Diols by Electrospray Mass Spectrometry on Boric Acid Complexes, Rapid Commun. Mass Spectrom. 13 (1999) 2406-2415
- ¹⁹ Iordache A., Culea M., Gherman C., Cozar O., Characterization of some plant extracts by GC-MS, Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B. Beam Interact. Mater. Atoms. 267 (2009) 338-342
- ²⁰ Melichar, B. a kol.: Chemická léčiva, Avicenum, Praha 1987
- ²¹ Kodíček, M. glycerol. From Biochemické pojmy: výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2009-04-19] Available from [www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/vid_es-002/look.html?p=glycerol>](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/vid_es-002/look.html?p=glycerol)
- ²² British Pharmacopoeia 2004, Stationary Office Limited, London
- ²³ European Pharmacopoeia 6th Edition, European Directorate for the Quality of Medicines, 2007