

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Katedra Analytické chemie

Stanovení glykolů a jiných alkoholů pomocí GC-MS

Bc. Eva Pinkasová

Diplomová práce

2018

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Department of Analytical Chemistry

Determination of glycols and other alcohols by GC-MS

Bc. Eva Pinkasová

Thesis

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva Pinkasová**
Osobní číslo: **C16547**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Stanovení glykolů a jiných alkoholů pomocí GC-MS**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Proveďte literární rešerši zaměřenou na stanovení glykolů a jiných vícesytných alkoholů pomocí plynové chromatografie. Zaměřte se na různé způsoby derivatizace umožňující jejich stanovení touto metodou.
2. V experimentální části optimalizujte metodu pro jejich stanovení pomocí GC-MS. Zaměřte se na dosažení co nejvyšší citlivosti. Porovnejte možnost stanovení s využitím EI a CI ionizace. Vypracovanou metodu ověřte na uměle kontaminovaných a případně i reálných vzorcích.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Aleš Eisner, Ph.D.

Katedra analytické chemie

doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlášení:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 11.5.2018

Bc. Eva Pinkasová

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své diplomové práce Ing. Aleši Eisnerovi Ph.D. za odborné vedení při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Petře Bajerové, Ph.D. za pomoc a rady při jejím zpracování. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a trpělivost.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá způsoby stanovení glykolů a jiných vícesytných alkoholů pomocí plynové chromatografie. Před stanovení je potřeba tyto látky derivatizovat. V teoretické části jsou charakterizovány jednotlivé látky a jednotlivé způsoby derivatizace pro tyto látky. Experimentální část popisuje dva způsoby derivatizace a její optimalizace, tak aby byla metoda co nejcitlivější. Tyto derivatizace jsou navzájem porovnány.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, GC–MS, derivatizace, glykoly, vícesytné alkoholy

ANNOTATION:

The diploma thesis deals with methods of determination glycols and other polyhydric alcohols by gas chromatography with mass spectrometry. Derivatization is needed before determination. In the theoretical part are these compounds and some derivatization methods characterized. In the experimental part are described two derivatization methods and optimization these methods. These derivatizations have compared each other.

KEY WORDS:

Gas chromatography, mass spectrometry, CG-MS, derivatization, glycols, polyhydric alcohols

Seznam použitých zkratk:

BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
DEG	Diethylenglykol
DEGMBE	Diethylenglykol monobutyl ether
DOX	Dioxan
EG	Ethylenglykol
GC	Plynová chromatografie
GC – MS	Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie
Gly	Glycerol
GSC	Plynová adsorpční chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRGC – MS	High resolution gas chromatography/mass spektrometry
HS – GC	plynová chromatografie s headspace nástřikem
HS – SPME	Headspace s mikroextrakcí tuhou fází
MS	Hmotnostní spektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid
PENTA	Pentaerytritol
PG	Propylenglykol
SPE	Extrakce tuhou fází
SPME	mikroextrakce tuhou fází
TEG	Triethylenglykol
TMS	trimethylsilylová skupina
TSIM	N-trimethylsilylimidazol

Obsah

Úvod.....	14
1. Glykoly a vícesytné alkoholy.....	15
1.1. Chemická struktura a vlastnosti.....	15
1.2. Výroba a použití.....	17
1.3. Toxicita.....	20
2. Plynová chromatografie.....	22
2.1. Instrumentace.....	22
2.1.1. Kolona.....	23
2.1.2. Detektor.....	24
3. Derivatizace.....	26
3.1. Alkylace.....	26
3.2. Acylace.....	27
3.3. Silylace.....	28
3.3.1. Silylační činidla.....	28
4. Stanovení glykolů.....	30
4.1. Stanovení ethylenglykolu.....	30
4.2. Stanovení diethylenglykolu.....	30
4.3. Stanovení propylenglykolu.....	31
4.4. Stanovení glycerolu.....	32
4.5. Stanovení dioxanu.....	33
4.6. Stanovení pentarytritolu.....	33
4.7. Stanovení nemrznoucí kapaliny.....	34
5. Experimentální část.....	36
5.1. Použité přístroje.....	36
5.2. Použité chemikálie.....	37

5.3.	Derivatizace vzorku	38
5.3.1.	Derivatizace vzorku – acetylace	38
5.3.2.	Derivatizace vzorku – silylace	39
5.4.	Teplotní program plynového chromatografu	40
5.5.	Kvalitativní určení stanovovaných látek.....	41
6.	Výsledky	44
6.1.	Acetylace	44
6.1.1.	Validace Metody	47
6.2.	Silylace.....	52
6.2.1.	Validace metody	56
6.3.	Stanovení modelových vzorků.....	62
	Závěr.....	64
	Seznam literatury:.....	66
	Přílohy:	70

Seznam obrázků a ilustrací:

Obrázek 1: a) ethylenglykol (EG), b) diethylenglykol (DEG), c) triethylenglykol (TEG), d) propylenglykol (PG).....	16
Obrázek 2: a) Glycerol (GLY), b) dioxan (DOX).....	16
Obrázek 3: a) diethylenglykol monobutyl ether (DEGMBE), b) pentaerytritol (PENTA)	17
Obrázek 4: Schéma plynového chromatografu	23
Obrázek 5: Kvadrupolový analyzátor	25
Obrázek 6: zleva N-trimethylsilylimidazol, BSTFA, MSTFA	29
Obrázek 7: koncentrátor EVATERM.....	38
Obrázek 8: Plynový chromatograf GC-2010 plus, hmotnostní spektrometr: GCMS-TQ 8030 a automatický dávkovač: AOC-5000.....	39
Obrázek 9: Chromatogram stanovovaných látek po acetylaci	41
Obrázek 10: Chromatogram stanovovaných látek po silylaci	42
Obrázek 11: Porovnání množství derivatizačního činidla použitého k derivatizaci roztoku glycerolu o koncentraci 50 µg/ml.....	53
Obrázek 12: Porovnání acetonitrilu (1) a acetonu (2) jako rozpouštědla pro roztok glycerolu o koncentraci 100 µg/ml, který byl derivatizován 20 µl činidla.....	53
Graf 1: Kalibrace ethylenglykol diacetátu	49
Graf 2: Kalibrace diethylenglykol diacetátu	50
Graf 3: Kalibrace glycerol triacetátu.....	50
Graf 4: Kalibrace diethylenglykol monobutyl ether acetátu	50
Graf 5: Kalibrace triethylenglykol diacetátu.....	51
Graf 6: Kalibrace pentaerytritol tetraacetátu.....	51
Graf 7: Kalibrace ethylenglykol bistrimethylsilyl etheru.....	59
Graf 8: Kalibrace derivátu propylenglykolu	59
Graf 9: Kalibrace glycerol tris(trimethylsilyl) etheru	60
Graf 10: Kalibrace derivátu DEGMBE.....	60
Graf 11: Kalibrace derivátu triethylenglykolu	61
Graf 12: Kalibrace pentaerytritol 4 TMS derivátu.....	61

Seznam tabulek:

Tabulka 1: Podmínky plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru:.....	40
Tabulka 2: Teplotní program pro měření na GC pro vzorek, který byl acylován.....	40
Tabulka 3: Teplotní program pro měření na GC pro vzorek, který byl silylován	40
Tabulka 4: Parametry jednotlivých látek použitých při měření v režimu SIM.....	42
Tabulka 5: Parametry jednotlivých látek použitých při měření v režimu SIM.....	43
Tabulka 6: Navážka a koncentrace zásobních roztoků	44
Tabulka 7: Průměrné plochy píků stanovovaných látek, které byly derivatizovány acylačním činidlem.	45
Tabulka 8: Rozsah kalibrace, mez stanovitelnosti a koeficient spolehlivosti pro stanovované látky, které byly acylovány.....	46
Tabulka 9: Spočítané relativní odchylky pro stanovované látky, které byly derivatizovány acylačním činidlem, v měřených koncentracích.....	47
Tabulka 10: Rozsah kalibrace, mez stanovitelnosti a koeficient spolehlivosti pro stanovované látky.	49
Tabulka 11: Navážka a koncentrace zásobních roztoků	52
Tabulka 12: Průměrné plochy píků stanovovaných látek, které jsou derivatizovány silylačním činidlem.....	54
Tabulka 13: Rozsah kalibrace, mez stanovitelnosti a koeficient spolehlivosti pro stanovované látky, které byly silylovány.....	56
Tabulka 14: Spočítané hodnoty pro silylační metodu.....	56
Tabulka 15: Rozsah kalibrace, mez stanovitelnosti a koeficient spolehlivosti.....	59
Tabulka 16: Výtěžnost pro jednotlivá rozpouštědla, kdy byl derivatizován roztok glycerolu o koncentraci 50 µg/ml.	62
Tabulka 17: Výtěžnost metody měřené 2x v režimu SCAN.....	63
Tabulka 18: Výtěžnost metody měřené 2x v režimu SIM	63

Úvod

Glykoly jsou dvojsytné alkoholy, které jsou známy, protože se využívají jako součást nemrznoucích kapalin. Nejznámějším z této skupiny látek je ethylenglykol jemuž se někdy říká glykol. Dalším vícesytným alkoholem, konkrétně trojsytným, je glycerol, který je součástí tuků ve formě svých esterů. Jedinou pevnou látkou z látek zmíněných v této práci je pentaerytritol. Všechny tyto látky jsou toxické a mohou se dostat do životního prostředí, takže je potřeba jejich monitorování.

V teoretické části práce je nejprve zmíněna obecná charakteristika glykolů a dalších vícesytných alkoholů. Dále jsou zde obecně popsány různé způsoby derivatizace, které se mohou využít pro jejich stanovení. V poslední části jsou popsána jednotlivá stanovení glykolů a jiných vícesytných alkoholů.

V experimentální části jsou nejprve popsány dva způsoby derivatizace, které byly optimalizovány, aby byly metody co nejcitlivější. V každé metodě byly proměřeny kalibrační roztoky. Nakonec byla vybrána vhodnější metoda, pro kterou byla ověřena její účinnost.

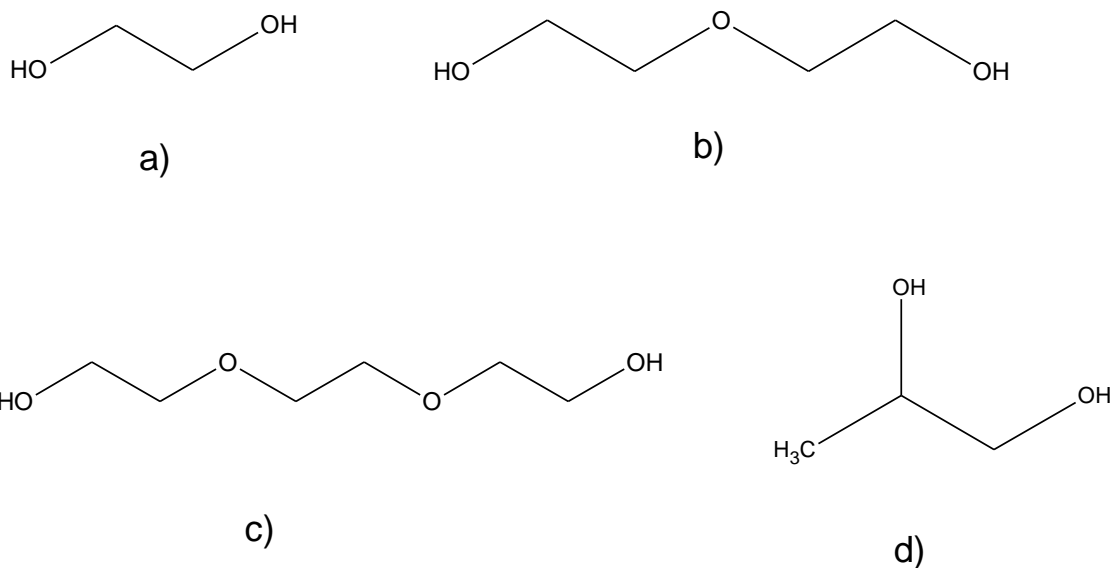
1. Glykoly a vícesytné alkoholy

1.1. Chemická struktura a vlastnosti

Jedná se o sloučeniny, které obsahují dvě hydroxylové skupiny připojené na atom uhlíku, a proto se jim někdy říká dioly. Glykoly reagují podobně jako jednosytné alkoholy, takže snadno vytvářejí estery, acetáty, ethery a podobné sloučeniny. Nejjednodušším glykolem je ethylenglykol. Ethylenglykol obsahuje 2 primární hydroxylové skupiny. Jedná se o bezbarvou, čirou kapalinu bez zápachu, která má sladkou chuť, má nízkou viskozitu a je to hygroskopická kapalina s malou těkavostí. EG má vysoký bod varu (197,6 °C) a výrazně snižuje bod tuhnutí vody. Je snadno mísitelný s vodou a polárními roztoky. Jeho molekulová hmotnost je 62,07 g/mol a molekulový vzorec je $C_2H_6O_2$. Diethylenglykol, triethylenglykol nebo tetraethylenglykol jsou oligomery ethylenglykolu, takže mají podobné fyzikální vlastnosti jako ethylenglykol. Struktury těchto glykolů jsou znázorněny na obrázku 1a, 1b a 1c. Diethylenglykol má molekulovou hmotnost 106,12 g/mol a na rozdíl od EG, obsahuje etherovou skupinu. Teplota varu DEG je 245,8 °C. [1]

Triethylenglykol je bezbarvá, mírně nasládlá kapalina. Systematický název této sloučeniny je 1,2-bis(2-hydroxyethoxy)ethan, nebo ethylen glykol-bis-(2-hydroxyethyl ether) a má molekulový vzorec $C_6H_{14}O_4$. Jedná se o vyšší glykol. Bod varu je 288 °C, ale bod vzplanutí je 199 °C. Tato látka je mísitelná s vodou, anebo s organickými rozpouštědly. Molekulová hmotnost triethylenlykolu je 150,17 g/mol. [2]

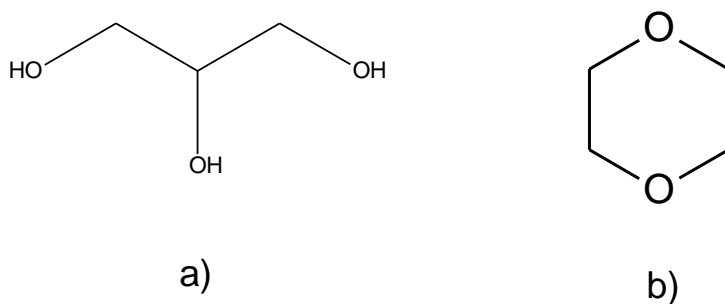
Systematický název propylenglykolu je 1,2-propandiol, takže se jedná o alkohol s primární i sekundární hydroxylovou skupinou (viz obrázek 1 d). Je to čistá, viskózní, bezbarvá kapalina s lehkým zápachem a nahořklou chutí. Výrazně snižuje teplotu tuhnutí vody a byl vyvinut jako alternativa k ethylenglykolu. Molekulová hmotnost má hodnotu 76,1 g/mol a molekulový vzorec je $C_3H_8O_2$. Bod varu této látky je 187,9 °C. [3]



Obrázek 1: a) ethylenglykol (EG), b) diethylenglykol (DEG), c) triethylenglykol (TEG), d) propylenglykol (PG)

Glycerol má systematický název 1,2,3-propantriol a triviální glycerin (viz obrázek 2 a). Jedná se o nejjednodušší triol. Je to bezbarvá, hygroskopická, sladce chutnající organická látka, která je při pokojové teplotě viskózní s teplotou varu 290 °C. Teplota tuhnutí čistého glycerolu je přibližně 18 °C. Molekulová hmotnost je 92,09 g/mol a molekulový vzorec $C_3H_8O_3$. [4]

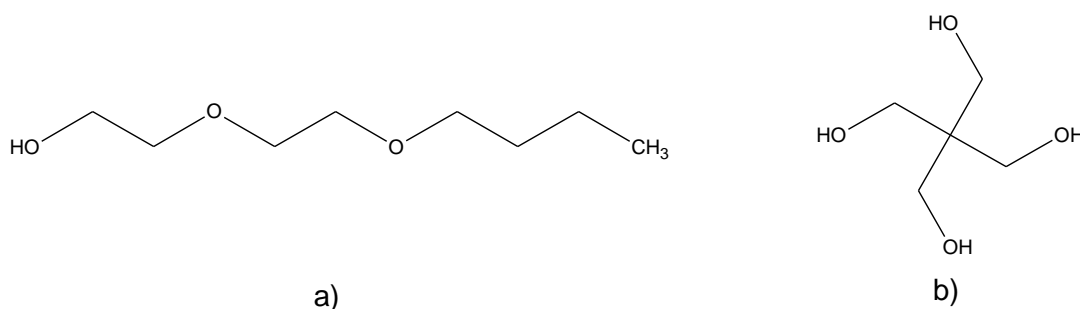
Dioxan je cyklický diether tvořený šestičlenným kruhem, který má systematický název 1,4-dioxacyklohexan (viz obrázek 2 b). Jedná se o průhlednou kapalinu s etherických zápachem, rozpustnou ve vodě a organických rozpouštědlech, která je při pokojové teplotě bezbarvá s etherickým zápachem. Dioxan je hořlavá kapalina s teplotou vzplanutí 11 °C. Molekulová hmotnost je 88,11 g/mol. [5]



Obrázek 2: a) Glycerol (GLY), b) dioxan (DOX)

Diethylenglykol monobutyl ether je bezbarvá kapalina a řadí se mezi glykolethery. Systematický název této sloučeniny je 2-(2-Butoxyethoxy) ethanol a molekulový vzorec $C_8H_{18}O_3$ (viz obrázek 3 a). Sloučenina je mísitelná s vodou, oleji nebo organickými rozpouštědly. Bod varu je $230,4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Molekulová hmotnost má hodnotu $162,23\text{ g/mol}$. [6]

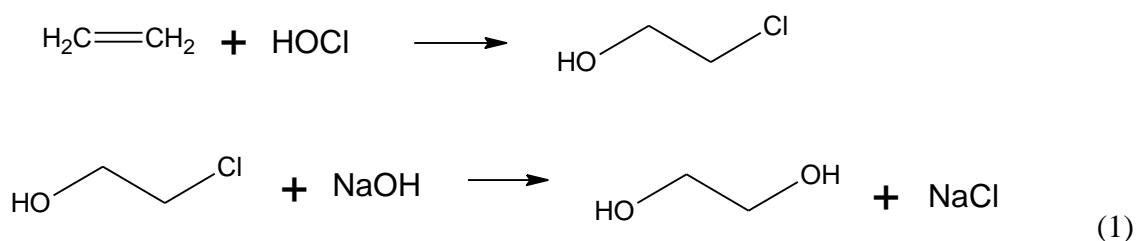
Pentaerytritol je vícemocný alkohol se čtyřmi OH skupinami, jehož molekulární vzorec je $C_5H_{12}O_4$, takže molekulová hmotnost má hodnotu $136,15\text{ g/mol}$. Je to bílá, krystalická látka středně rozpustná ve vodě, s teplotou varu $276\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplotou tání $261 - 262\text{ }^{\circ}\text{C}$. Schématická struktura látky je na obrázku 3 b. [7]



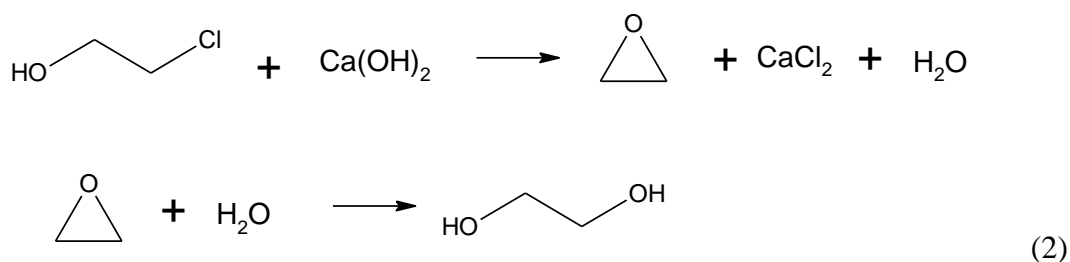
Obrázek 3: a) diethylenglykol monobutyl ether (DEGMBE), b) pentaerytritol (PENTA)

1.2. Výroba a použití

Ethylenglykol byl poprvé připraven v roce 1859 Wurtzem hydrolyzou ethylenglykoldiacetátu. Během první světové války byl poprvé využit průmyslově jako meziprodukt pro výbušniny, kdy nahradil glycerol. Ethylenglykol je komerčně vyráběn z ethylenchlorohydrinu, který byl vyroben z ethylenu. Chlorhydrin je přeměněn na ethylenglykol hydrolyzou s bází. Reakční schéma je znázorněno v rovnici (1). [1]



Alternativní způsob výroby je převedení chlorhydrinu na ethylenoxid s následnou hydrolyzou. Reakční schéma je v rovnici (2). [1]



Použití ethylenglykolu je široké. Často se používá například jako součást nemrznoucích a chladicích kapalin do aut nebo letadel. Dále se může využít při výrobě plastů a polyesterových vláken pryskyřic. [1]

DEG byl poprvé syntetizován v roce 1859 Lourencem a Wurtzem. Komerčně začal být vyráběn v roce 1928 společností Union Carbide, kdy se jedná o koprodukt ethylenglykolu produkovaného hydrolyzou ethylenoxidu. Nejčastěji je používán k výrobě nenasycených polyesterových pryskyřic, jako součást nemrznoucích směsí nebo k dehydrataci zemního plynu. [1]

TEG se používá jako činidlo pro sušení kapaliny zemního plynu kvůli své nízké těkavosti. Dále je využíván jako rozpouštědlo v impregnačních činidlech, nebo jako vinylový plastifikátor. Kvůli svým vlastnostem, při bodu tuhnutí se používá jako součást nemrznoucích směsí. [1] Před 50 lety se TEG využíval k dezinfekci, a to zejména v kasárnách a nemocnicích. Triethylenglykol je baktericidní pro hemolytické streptokoky, pneumokoky a stafylokoky, ale nepůsobí při ničení respiračních infekcích. Dalším využitím může být výroba mlhy pro divadelní účely. [2]

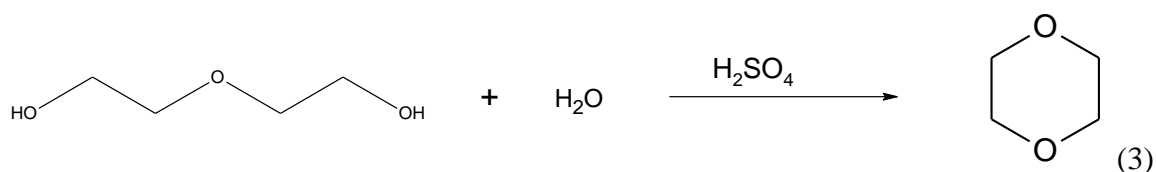
PG byl připraven v roce 1859 hydrolyzou z propylenglykolu diacetátu. Komerčně je vyráběn hydrolyzou propylenoxidu. Nejdůležitější komerční využití je při výrobě polyesterů. Má nízkou hodnotu toxicity pro člověka a má další žádoucí účinky, takže je používán v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Používá se při výrobě emulgátorů v potravinách, nebo může být použit jako konzervační látka. [1]

Glycerol byl izolován už v roce 1779 Carlem Wilhelmem Scheelem pomocí zmýdelňování olivového oleje s hydroxidem olovnatým. Prvním průmyslovým použitím bylo v roce 1866 vyrobení dynamitu, kdy byl nitroglycerin je stabilizován absorpcí na křemelině.

Nejčastěji se glycerol vyrábí z přírodních olejů nebo tuků, protože ho můžeme nalézt ve všech přírodních tucích a olejích jako estery mastných kyselin. Může být syntetizován i z propenu. Tato sloučenina má mnoho využití a je důležitým meziproduktem v metabolismu živých organismů. Nejčastěji se používá při výrobě cigaret jako změkčovadlo a zvlhčovadlo tabáku, při výrobě různých ochranných pryskyřic, nebo může být využit ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu [4]

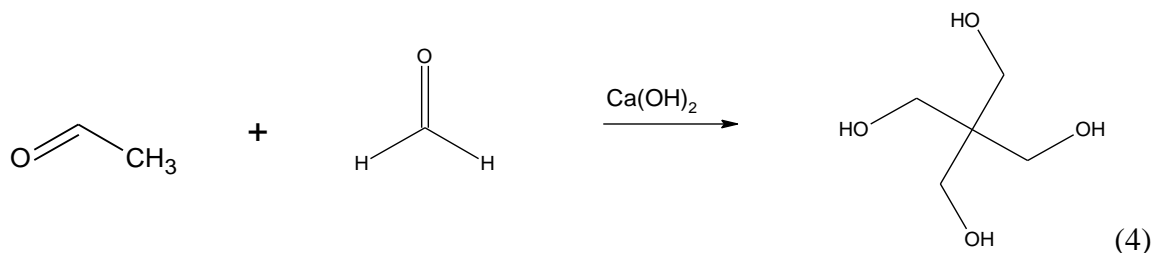
Glykolethery jsou polární látky rozpustné v organických rozpouštědlech a vodě. Nejčastěji se používají jako přísady do barev, nátěrů, brzdových kapalin, čističů a jiných chemických sloučenin. [8]

Dioxan byl údajně připraven v roce 1863 reakcí ethylenglykolu s 1,2-dibromethanem. Nicméně komerčně byl vyráběn až od roku 1929. Komerčně se vyrábí dehydratací a uzavřením kruhu diethylenglykolu. Jako katalyzátor se používá koncentrovaná kyselina sírová. Páry dioxanu se čistí, aby se odstranila voda a produkt byl co nejčistější. Rovnice výroby dioxanu je znázorněna v rovnici (3). [5]



Oxidací vzdušným kyslíkem vzniká z dioxanu peroxid (2-hydroperoxid 1,4-dioxanu), který je velmi nestabilní a vysoce výbušný. Používá se ke stabilizaci 1,1,1-trichlorethanu a zabraňuje jeho reakci s hliníkem. Dioxan se používá jako rozpouštědlo při přípravě inkoustů nebo lepidel a jako rozpouštědlo pro extrakci živočišných a rostlinných olejů. [5]

Pentaerytritol je vyráběn reakcí formaldehydu a acetaldehydu v přítomnosti bazického katalyzátoru. Všechny reakční kroky jsou reverzibilní kromě posledního, což se využívá při průmyslové výrobě, aby se dosáhlo co nejvyšší výtěžnosti. Reakce se proto musí kontrolovat, aby nedocházelo k tvorbě meziproduktů. V rovnici (4) je zobrazeno reakční schéma výroby pentarytritolu. [7]



Pentaerythritol se přidává do nátěrových hmot, laků nebo alkydových pryskyřic. Alkydové pryskyřice se vyrábějí reakcí pentaerythritolu s organickou kyselinou jako je kyselina ftalová nebo kyselina maleinová. Tyto sloučeniny se vyznačují vysokou viskozitou a rychlým sušením. Estery pentaerythritolu s dlouhým řetězcem se využívají jako přípravky, které snižují bod tuhnutí pro mazací přípravky, jako jsou topné oleje, motorová nafta a jiné. Nitrací pentaerythritolu koncentrovanou kyselinou dusičnou vzniká tetranitrát této látky, který se používá jako náplň rozbušek. Pentaerythritol tetranitrát se využívá i jako vazodilatační prostředek při léčbě anginy pectoris. [7]

1.3. Toxicita

Ethylenglykol je používán jako nemrznoucí prostředek. Byl zaznamenán případ, kdy se ethylenglykol použil jako náhrada ethanolu, nebo byl použit během pokusu o sebevraždu. Účinky na ledviny nebo vlivy na kardiopulmonální onemocnění po požití ethylenglykolu byly dobře zdokumentovány. Neurologické následky jsou pozorovány jen zřídka. Ethylenglykol se při požití rychle vstřebává ze žaludku a v játrech se přemění na toxické aldehydy, oxolátky a kyselinu mléčnou. Počáteční obraz může napodobit intoxikaci ethanolem. Druhá fáze, během které se projeví kardiopulmonální symptomy, se objeví po 24 až 72 hodinách. Pokud pacient přežije první dvě etapy, projeví se porucha ledvin, od proteinurie až po anurii. [9]

Otravy diethylenglykolem jsou datovány od roku 1937. Nejčastěji se jednalo o otravy po požití farmaceutických přípravků v rozvojových zemích. Po požití je látka rychle absorbována a roznesena do celého těla. Metabolismus odbourávání je v játrech a produkty jsou vylučovány ledvinami. Klinické příznaky po otravě se rozdělují do 3 fází. V první fázi se objevují gastrointestinální příznaky s metabolickou acidózou. Ve druhé fázi se rozvíjí metabolická acidóza a vzniká poškození ledvin, které může končit smrtí. Ve třetí fázi se

objevují různé neuropatie. Léčba spočívá v kontrole acidobazické rovnováhy. Dále může pomoci hemodialýza. Průměrná letální dávka čistého DEG je 1 mg/kg. [10]

TEG má velmi nízkou perorální letální toxicitu, takže se po jeho expozici projeví jen velmi málo příznaků otravy. Kontakt kapaliny s okem způsobí mírné podráždění, při kontaktu s kůží se neprojevují žádné výrazné příznaky. Při vdechnutí aerosolu se může objevit periferní dráždivý účinek. [2]

Propylenglykol se používá jako rozpouštědlo pro intravenózní, orální a lokální farmaceutické přípravky. Obecně je považován za bezpečný, ale ve velkých dávkách, které jsou podávány i krátkou dobu, může být toxický. Z běžně užívaných léčiv je v intravenózním lorazepamu největší množství propylenglykolu. Ačkoliv existuje několik případů, kdy byla hlášena metabolická acidóza a masivní poranění ledvin po expozici PG, žádný z těchto případů nebyl hlášen po roce 1982. Propylenglykol je alkohol s nízkou molekulovou hmotností a je snadno odstraněn hemodialýzou. [11]

Dioxan je ve velkém množství používán v chemickém průmyslu, takže je každoročně velké množství této chemikálie uvolněno do povrchových vod. Studie neprokázala zjevná úmrtí na rakovinu u malé skupiny pracovníků ve výrobním a zpracovatelském zařízení, kteří byli vystaveni nízkým hladinám 1,4-dioxanu. Některé studie ukazují, že dlouhodobé perorální podávání dioxanu v pitné vodě se u potkanů a myší projevuje hepatocelulárními a nosními nádory. Dle mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny je dioxan zařazen do skupiny karcinogenů 2B. Prokazatelně je karcinogenní pro zvířata ale neexistují dostatečné důkazy pro označení, že je karcinogenní u lidí. [12]

Diethylenglykolmonobutylether nebyl tak rozsáhle studován jako ethylenglykol butylether. Ale na začátku 90. let 20. století byla provedena měření týkající se absorpce a eliminace dermálně aplikovaných dávek DEGMBE u potkanů. Po expozici bylo přítomno podráždění kůže, ale nebyly přítomny žádné systémové, nebo neurotoxické účinky. Starší studie [13] v nichž byla látka podána ústně, zahrnovala studii s pitnou vodou. Zmíněné studie mají svá omezení a nežádoucí účinky nejsou tak dobře zdokumentovány. [8]

PENTA je klasifikován jako nepravidelná, krystalická částice. Jedná se o netoxickou látku, která při požití nebo vdechnutí nevyvolá žádnou reakci [7]

2. Plynová chromatografie

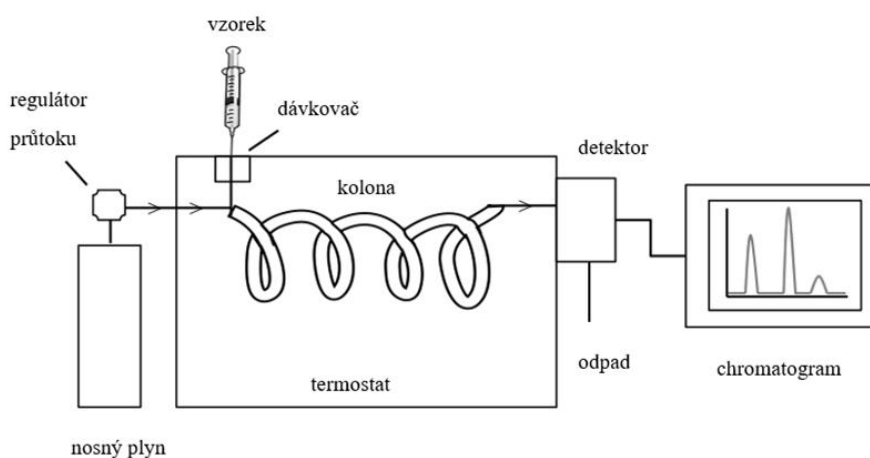
V roce 1941 Martin a Synge vyvinuli kapalinovou dělicí chromatografii, kde experimentovali s oddělením aminokyselinových směsí. Může být také použita k oddělení plynů [15]. V roce 1952 Martin a James vynalezli plynově-kapalinovou chromatografii, kdy jako mobilní fázi použili inertní nosný plyn a jako stacionární fázi netěkavou kapalinu na tuhém nosiči. [14]

Jedná se o separační techniku, která je založená na rozdílné distribuci složek mezi dvoufázový systém, kdy je mobilní fází plyn a stacionární fází kapalina nebo pevná látka. Na rozdíl od jiných technik je retence rozpuštěných látek ovlivněna pouze tlakem par (závisí na teplotě) a intermolekulární reakcí mezi stacionární fází a rozpouštěnou látkou. Tato technika byla vyvinuta v 50. letech 20. století a v dnešní době je jednou z nejvyužívanějších technik. Můžeme ji použít pro analýzu plynů (jako dusík, oxid uhelnatý nebo zemní plyn) až po analýzu ropných produktů. Existují dva typy plynové chromatografie: plynová rozdělovací chromatografie (GLC) a plynová adsorpční chromatografie (GSC). V GLC je stacionární fáze kapalina, která působí jako rozpouštědlo pro separované látky. Kapalina může být distribuována jako tenký film na povrchu stěny kapilární kolony. V GLC je oddělení založeno na rozdělení složek mezi oběma fázemi, stacionární fází a mobilní fází, a proto je tato metoda využívána nejčastěji. V GSC oddělení závisí na rozdílech v adsorpci složek vzorku na anorganických adsorbentech nebo na organických adsorbentech. Provádí se v kolonách, na jejichž stěnách jsou tenké vrstvy porézního materiálu. Tato technika je velmi selektivní. [16]

2.1. Instrumentace

Základní schéma přístroje je znázorněno na obrázku č.4 a se skládá ze zásobníku plynu, dávkovacího prostoru, kolony, termostatu a detektoru. Nosný plyn se dodává v tlakové nádobě, která má dvoustupňový regulátor tlaku, takže může být tok plynu regulován. Vzorek se zavádí do proudu nosného plynu a odpařené složky se přenesou do kolony, kde dochází k oddělení jednotlivých složek. Kolona je vyhřívána na určitou teplotu. Teplota v koloně může být buď konstantní (izotermní měření), nebo proměnlivá (gradientový provoz). Po oddělení jsou komponenty zaznamenány pomocí detektoru, takže vzniklý chromatogram ukazuje závislost odezvy detektoru na čase. Chromatogram poskytuje kvalitativní

i kvantitativní data. Ke kvalitativní analýze se využívá retenční doba nebo retenční indexy a ke kvantitativní se využívá odezva detektoru. [16]



Obrázek 4: Schéma plynového chromatografu

Zdroj: <https://bitesizebio.com/28687/carrying-gas-chromatography/>

2.1.1. Kolona

Obvykle se používají 2 typy kolon: kapilární a náplňové. Výběr vhodné kolony závisí na povaze a složitosti stanovovaného vzorku, aby došlo k co nejlepší separaci. Náplňové kolony mají nižší účinnost, ale mají vysokou selektivitu pro vzorek, a proto bylo vyvinuto mnoho různých stacionárních fází. Maximální počet teoretických pater, aby byla co největší účinnost separace, pro tento typ kolon je 10 000. Kolony pro rutinní analýzy mají obvykle hodnoty jenom mezi 3000 až 5000. Náplní do těchto kolon jsou například modifikovaný oxid křemičitý, oxid hlinitý, nebo zeolity. [16]

První monolitické kolony byly vytvořeny koncem šedesátých a počátkem sedmdesátých let jako alternativa k náplňovým kolonám v plynové chromatografii. Tyto sloupce byly vyrobeny z polyurethanové pěny, která byla schopna vytvořit pórovitou strukturu, která umožňovala volný průtok mobilní fáze. Tyto kolony se daly snadno připravit, byly tepelně stabilní a mechanicky odolné. Současně byly vyvinuty otevřené kapilární kolony, které se nejčastěji používají v GC. Monolitické kolony mají vyšší pórovitost než náplňové kolony. Monolitické kolony se začaly používat hlavně v kapalinové chromatografii. [17]

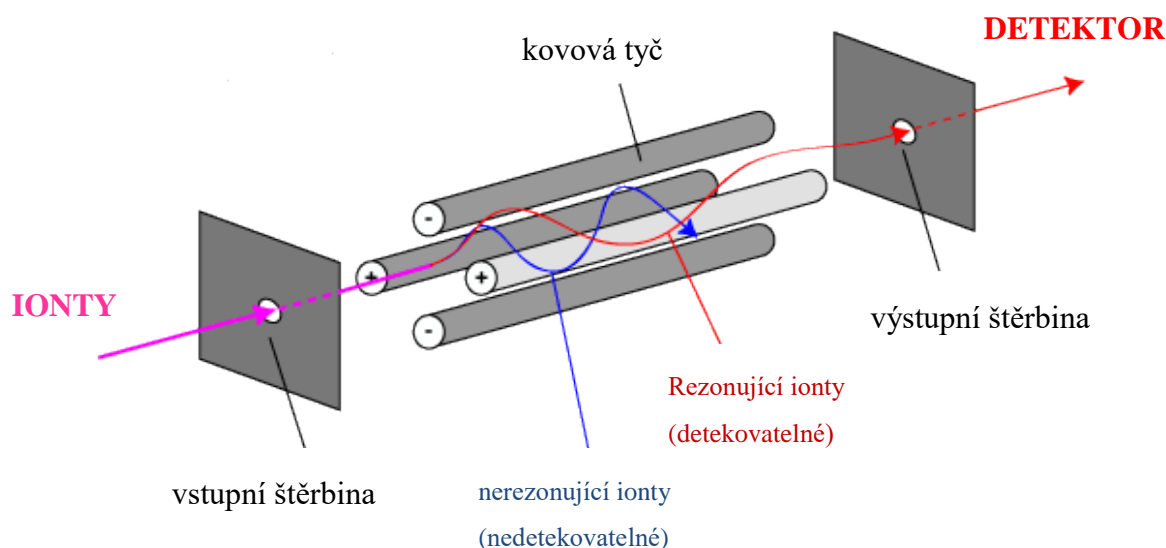
Kapilární kolony mají naopak vysokou hodnotu počtu teoretických pater. Výhodou je inertnost těchto kolon a kompatibilita se spektroskopickými detektory. Tento druh kolony byl vyvinut již v roce 1957 M. Golayem, ale skutečný průlom byl až v roce 1979, kdy došlo k vývoji taveného křemene. Pevnost a pružnost tohoto křemene může za to, že použití je jednodušší oproti dříve používaným skleněným kolonám. Vnitřní povrch kolony je potažen tenkou vrstvou stacionární fáze (WCOT kolona) a podle vnitřního průměru je můžeme rozdělit do 3 skupin. Prvním typem jsou konvenční kapilární kolony, druhým widebore nebo megabore kapilární kolony. Třetím typem jsou narrowbore kapilární kolony. Pokud je adsorbent, s určitým průměrem částic, nanesen v pórovité vrstvě na stěnu kapiláry tak se tyto kolony nazývají PLOT kolony. Výhodou PLOT kolon oproti náplňovým kolonám je rychlost analýzy. [16], [18]

2.1.2. Detektor

V plynové chromatografii detektory zjišťují přítomnost stanovované látky v nosném plynu, konvertují ji do elektrického signálu, který je zaznamenán. Nejdůležitějšími vlastnostmi u detektorů jsou citlivost, selektivita, lineární rozsah, dynamický rozsah nebo faktory odezvy detektoru. Nejpoužívanějším univerzálním detektorem v plynové chromatografii je plamenově – ionizační detektor. Jako selektivní detektory se obvykle využívají spektroskopické detektory, které umožňují selektivní rozpoznání separované látky. Mezi tyto detektory se řadí detektor elektronového záchyty, plamenový fotometrický detektor nebo fotoionizační detektor. Pro kombinaci s plynovou chromatografií se může použít hmotnostní detektor, nebo méně často využívaný infračervený spektrometr s Fourierovou transformací. Principem hmotnostního detektoru je, že když molekuly vzorku opouštějí chromatografickou kolonu tak jsou zavedeny do iontového zdroje, kde dojde k jejich ionizaci ve vakuu. Vznikající ionty se oddělují podle poměru efektivní hmotnosti ku náboji (m/z). Nejčastěji se používá kvadrupólový detektor, nebo analyzátor doby letu. [16]

Kvadrupolový analyzátor je nejpoužívanějším z dynamických hmotnostních spektrometrů. Tento detektor je tvořen čtyřmi tyčemi mezi kterými procházejí ionty. Ionty lze oddělit, protože na tyče je vloženo vysofrekvenční střídavé napětí a dochází k jejich oscilaci. Tento detektor je jednoduchý, snadno ovladatelný, kompaktní a poměrně levný. Schéma tohoto analyzátoru je na obrázku 5. Těchto výhod se využilo při výrobě trojitého

kvadrupólového analyzátoru. Jedná se o 3 kvadrupolové analyzátory řazené za sebou. Druhý analyzátor slouží jako kolizní cela kam jsou přiváděny vybrané ionty z prvního analyzátoru. V kolizní cele dochází ke srážkám iontů s plynem. Vznikající fragmenty jsou detekovány ve třetím analyzátoru. Tento analyzátor se využívá při tandemové hmotnostní spektrometrii. [19]



Obrázek 5: Kvadrupolový analyzátor

Zdroj: <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html>

Plamenový ionizační detektor je nejčastěji využívaný detektor v plynové chromatografii. Poskytuje téměř univerzální odezvu na organické sloučeniny. Má nízké detekční limity, dlouhodobou stabilitu, jednoduchý provoz a rychlou odezvu. Odezvou detektoru je spalování organických sloučenin v malém difuzním plamenu vodíku a vzduchu. Druhým nejčastěji využívaným ionizačním detektorem v plynové chromatografii je detektor elektronového záchytu. Je využíván při stanovení pesticidů a průmyslových chemických látek v životním prostředí. Dalším ionizačním detektorem, který se používá je fotoionizační, nebo třeba heliový ionizační detektor. [20]

V GC–MS můžeme použít elektronovou nebo chemickou ionizaci. Při elektronové ionizaci jsou molekuly ionizovány proudem dopadajících elektronů, kdy vzniká molekulární radikálový ion (M^+). Během této ionizaci může dojít k úplné fragmentaci a molekulární ion pak úplně chybí. Chemická ionizace je měkkou ionizační technikou, kdy ionizace v plynné fázi probíhá prostřednictvím reakce ion-molekula. Fragmentace je nižší a pozorujeme kvazimolekulární ionty $(M+H)^+$, $(M-H)^-$. [16]

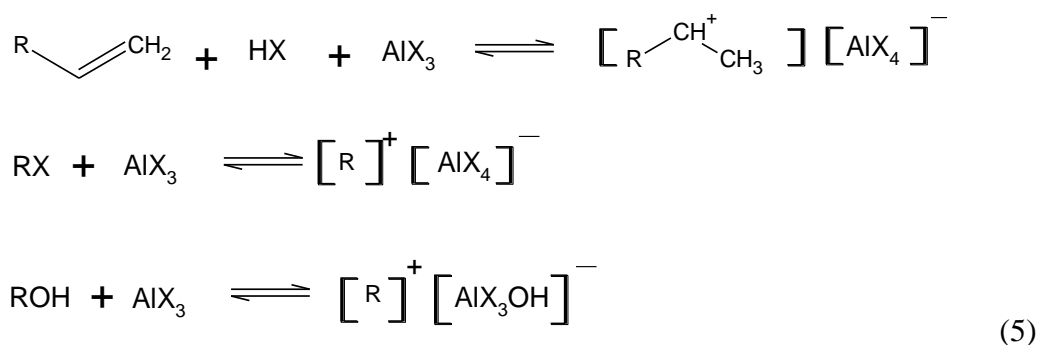
3. Derivatizace

Derivatizace je chemický proces, při kterém je sloučenina přeměněna tak, aby vznikla nová sloučenina, která má vlastnosti více přizpůsobené chromatografii. Hlavním problémem při stanovení některých látek je polarita. Polarita analytu je způsobena přítomností – OH, – NH, – COOH nebo – SH skupiny v molekule. Tepelný rozklad těchto látek je doprovázen dehydratací, dekarboxylací nebo třeba tvorbou cyklických struktur. Navíc systém horkého vstřikování může způsobit odpaření analytů před jejich separací. GC–MS může detekovat pouze ty sloučeniny, které jsou těkavé, stabilní a schopné procházet chromatografickou kolonou. Sloučeniny obsahující výše uvedené funkční skupiny mají tendenci tvořit intermolekulární vodíkové vazby, které snižují těkavost, tepelnou stabilitu a způsobují jejich interakci se stacionárními fázemi, což se projevuje asymetrickými píky, nebo jejich špatným rozlišením. Tyto problémy znemožňují spolehlivou kvalitativní a kvantitativní analýzu, a proto se nedoporučuje jejich přímá analýza. Přeměna na deriváty omezuje interakce, které narušují analýzu. Dále zlepšuje selektivnost, citlivost a detekci. Používají se tři základní typy analytických derivatizačních technik a to: alkylace, acylace a silylace. [21]

3.1. Alkylace

Alkylační činidla snižují polaritu sloučenin nahrazením labilních vodíků za alifatickou nebo alifaticko-aromatickou skupinu. Tato derivatizace se používá pro sloučeniny obsahující kyselé vodíky, jako jsou karboxylové kyseliny nebo fenoly. Vznikající látky jsou estery nebo ethery. [22]

Nejčastěji používanými alkylačními činidly jsou olefiny a alkylhalogenidy. Používanými alkeny jsou například ethylen, propen, nebo dodecen (tetrapropen). Často využívanými alkylhalogenidy jsou methylchlorid, methyljodid, ethylchlorid, isopropylchlorid, terc-butylchlorid nebo benzylchlorid. Jako alkylační činidla se mohou použít například i alkoholy, ethery, aldehydy a ketony, thioly ovšem v těchto případech se katalyzátor částečně hydrolyzuje. Dalšími silnými alkylačními činidly jsou například dimethylsulfát, diethylsulfát, nebo kyselina trifluormethansulfonová. Většina průmyslově využívaných alkylací je katalyzována Lewisovou kyselinou. Obecné schéma alkylace je znázorněno v rovnici (5). [23]

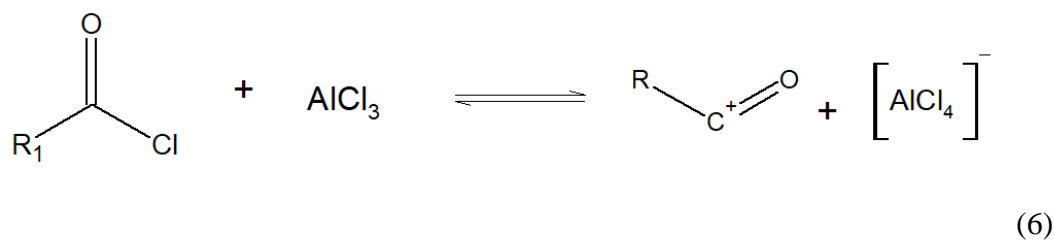


Princípem esterifikace je alkylace kyselých sloučenin, kdy se zvýší těkavost sloučeniny, ale zároveň zůstane zachována kyselá skupina během dalších reakcí. Esterifikace karboxylových kyselin nesoucích další funkční skupiny jako -OH, -NH, nebo -S probíhá například pomocí směsi etheru fluoridu boritého s alkoholem. Při této reakci se esterifikuje pouze karboxylová skupina a zbytek molekuly není ovlivněn. [24]

3.2. Acylace

Acylační reakce jsou založeny na reakci s anhydridem kyseliny v přítomnosti pyridinu. Acylovány mohou být například primární a sekundární aminové skupiny, hydroxylové, thiolové nebo indolové skupiny. [24]

V rovnici (6) je znázorněno schéma reakce acylhalogenidu s Lewisovou kyselinou. Vzniká polarizovaný komplex nebo acyliový ion, přičemž obě tyto sloučeniny mohou působit jako aktivní elektrofil. Velké množství acyliového iontu se tvoří ve vysoce polárních rozpouštědlech jako je například nitrobenzen. Pokud se jako acylační činidla použijí anhydridy, nebo estery, v přítomnosti protonových kyselin, lze očekávat vysokou koncentraci acylových iontů. [23]



Často se používá bazicky katalyzovaná acylace alkoholů, fenolů, aminů a thiolů anhydridem kyseliny nebo acylchloridem. Je známo, že různé sloučeniny pyridinu katalyzují acylaci alkoholů. Pro acyl transferové reakce v alkoholech byla použita i řada jiných katalyzátorů, jako jsou například TaCl₅, COCl₂ a KSF. Autoři článku prokázali, že se může k acylaci alkoholů použít Cu(OTf)₂ v přítomnosti acetanhydridu nebo kyseliny octové. Za stejných podmínek mohou být acylovány i jiné funkční skupiny jako: fenoly, aminy a thioly. [25]

3.3. Silylace

Silylace je derivatizační technika, kdy je do organické sloučeniny obsahující –OH, –COOH, –SH, –NH₂ a =NH zavedena trimethylsilová skupina. Využívá se pro sloučeniny jako jsou alkoholy, amidy, aminy, sacharidy, fenoly a spousty dalších sloučenin s polyfunkčními skupinami. Nahrazením aktivního vodíku silylovou skupinou je snížena polarita dané sloučeniny, což vede k nárůstu těkavosti. Stabilita je zvýšena i kvůli snížení počtu reaktivních míst. Deriváty se rychle a jednoduše připraví podle schématu v rovnici (7). [24]

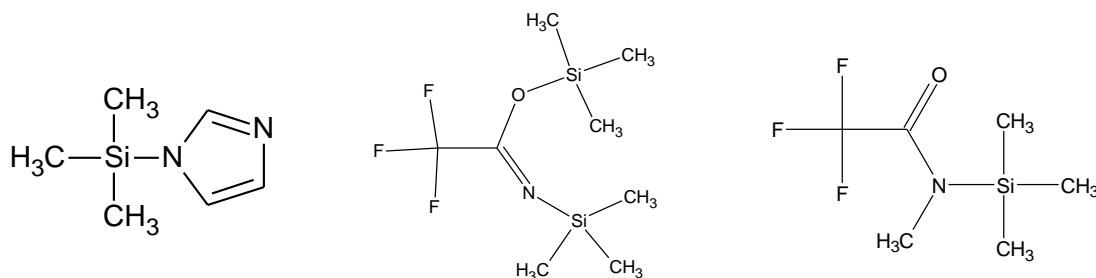


Silylace je nejrozšířenější derivatizační technika. Reakce probíhá prostřednictvím bimolekulární nukleofilní substituce, kdy dojde zároveň k připojení nukleofilu a odstupující skupiny. Přítomnost odstupující skupiny zlepšuje výtěžek reakce. Mezi činidla, která se používají nejčastěji patří například trimethylchlorsilan, trimethylsilylimidazol, N-methyltrimethylsilyltrifluoracetamid, nebo N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid. Poslední dvě činidla se využívají hlavně při analýze fenolů, sterolů nebo cukrů. [22]

3.3.1. Silylační činidla

Silylačními činidly jsou látky na bázi křemíku, které se používají k modifikaci organických a anorganických substrátů. Nejsilnějším silylačním činidlem je N-trimethylsilylimidazol, které je vhodné pro uhlohydráty a steroidy. Toto činidlo reaguje rychle

a bezproblémově s hydroxylovými a karboxylovými skupinami, nereaguje s aminy. Tohoto se dá využít, pokud sloučenina obsahuje obě skupiny a je potřeba je rozlišit. Dalším často používaným činidlem je N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid. BSTFA je poměrně silné činidlo, kdy vznikají těkavé stabilní deriváty. Používá se k derivatizaci například alkoholů, aminů, karboxylových kyselin, fenolů, steroidů. Vedlejší produkty činidla se obvykle promývají s rozpouštědlem. Pokud se látky obtížně silylují, jako například amidy mastných kyselin, tak se používá BSTFA s 1% trimethylchorsilanem. Tato směs je silnější než samotný BSTFA. N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid je nejcitlivější činidlo z dostupných trimethylsilylových a silyluje hydrochloridové soli aminů přímo. Molekulová hmotnost TSIM je 140,3 g/mol, BSTFA má hodnotu 257,4 g/mol a MSTFA 199,3 g/mol. Schéma jednotlivých sloučenin je na obrázku 6. [26]



Obrázek 6: zleva N-trimethylsilylimidazol, BSTFA, MSTFA [26]

4. Stanovení glykolů

4.1. Stanovení ethylenglykolu

Otrava ethylenglykolem je běžným klinickým problémem, takže jeho identifikace a kvantifikace v séru je důležitá pro lékařské účely. Existuje několik způsobů pro stanovení ethylenglykolu, a to pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, anebo pomocí enzymatické analýzy. Většina plynových chromatografických technik zahrnuje přímé určení ethylenglykolu a má problémy spojené s chvostováním píků a citlivostí. Identifikace EG pak probíhá pomocí retenčních časů, a proto se mohou v rutinní analýze objevit chyby spojené se špatnou identifikací. Obvykle se ke stanovení používají deriváty EG, které tvoří molekulární ionty menší než 200. Autoři tohoto článku použili novou derivatizační techniku s použitím perfluoroktanoyl chloridem, který tvoří deriváty s molekulovou hmotností 854 a základním píkem s m/z 441. Výhodou tohoto derivátu je, že je méně těkavý a neobsahuje interference spojené se sérem. Detekční limit této metody byl 5 $\mu\text{g/ml}$. [27]

Metody vyvinuté, proto aby mohly být využity v nouzových případech by měly být rychlé a jednoduché. Dále by tyto metody měly umožňovat monitorování analytů různých tříd léčiv v jednom biologickém vzorku. Autoři článku zdokonalili metodu, kdy se k derivatizaci používá bis-N, O-trimethylsilyltrifluoracetamid s dimethylformamidem. Po mikrovlnné derivatizaci byl do plynového chromatografu dávkován derivát a analyzován v režimu selektivního monitorování iontů. Celková doba analýzy od začátku příprav až po dosažení kvantitativních výsledků je 35 minut. Všechny sloučeniny jsou odděleny během 12 minut a detekovány s limitem kvantifikace 0,05 a 0,01 g / l pro glykoly. Touto metodou se mohou detekovat propylenglykol, diethylenglykol, triethylenglykol, tetraethylenglykol, kyselina mléčná nebo třeba kyselina glykolová. [28]

4.2. Stanovení diethylenglykolu

DEG se ilegálně přidával do vína, aby se zlepšila jeho sladkost, hladkost, a tím i obchodní hodnota. Toto falšování bylo nalezeno v mnoha vínech na celém světě. DEG lze stanovit pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, ale častěji se používá plynová chromatografie. Přímé dávkování vína způsobuje řadu chromatografických problémů jako je, kontaminace dávkovače, adsorpce a špatná reprodukovatelnost. Kromě toho jsou výsledné

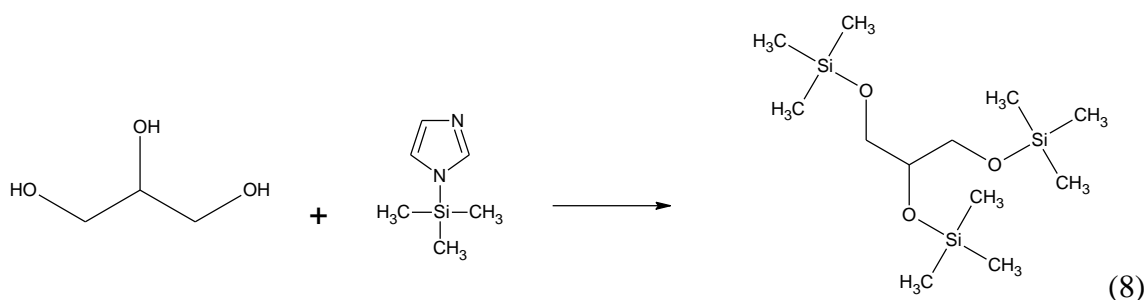
chromatogramy často velmi složité a tím pádem je identifikace a kvantifikace obtížná. Pro GC a GC–MS bylo popsáno i několik způsobů, kdy se vzorek derivatizoval, ale k analýze byla potřeba bezvodá látka. Extrakce DEG z vodných roztoků je obtížná, a proto není vhodná ke kvantitativní analýze. Z tohoto důvodu použili hmotnostní spektrometrii s vysokým rozlišením (HRGC–MS). Vyvinuli jednoduchou a citlivou, kvantitativní metodu ke stanovení obsahu DEG ve vínu bez extrakce. Vzorek se připraví tak, že se víno odbarví aktivním uhlím, zředí acetonitrilem a zfiltruje. Takto připravený roztok se dává rovnoměrně do přístroje. Na aktivní uhlí se sorbovaly skoro všechny barevné sloučeniny ve víně. Zároveň se snížila hodnota DEG ve vzorku, a to až po dobu 6 hodin. Ředění pomocí acetonitrilu vysráží některé bílkoviny a cukry. Srážení bylo účinnější, pokud byl vzorek ponořen v ledové vodě. Výťažnost této metody je přibližně 90 % a limit detekce je 0,1 mg/l. Stejný filtrát může být také analyzován pomocí plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem, ale citlivost této metody je nižší. [29]

4.3. Stanovení propylenglykolu

Propylenglykol může být toxický při opakovaném intravenózním podávání léků, které ho využívají jako rozpouštědlo. Mezi tyto léky se řadí třeba lorazepam, který se podává intubovaným pacientům s mechanickou ventilací. Dalšími léčivými obsahujícími PG jsou třeba diazepam, etomidát nebo fenytoin. Dalším významným lékem obsahujícím propylenglykol jsou přípravky s aktivním uhlím, které ho používají jako pomocnou látku, aby toto uhlí nebylo tak zrnité a lépe se podávalo. Ke stanovení propylenglykolu a ethylenglykolu se použila metoda plynové chromatografie s headspace nástřikem (HS–GC). Metoda používá derivatizaci za použití kyseliny fenylboronové. Derivatizace se prováděla, protože stanovované glykoly mají relativně vysoké body varu (EG – 197 °C a PG – 188 °C). Tato metoda umožňuje laboratorům, které mají HS–GC vybavení, rychle analyzovat ethanol, methanol, isopropanol, ethylenglykol a propylenglykol na jediném přístroji. Limit kvantifikace této metody je 1 mg/dl. Tato studie byla prováděna, protože mnoho klinických laboratoří nemělo přístup k přístroji GC–MS. [30]

4.4. Stanovení glycerolu

Metoda enzymatického kolorimetrického testu se tradičně používá ke stanovení hladiny glycerolu. Principem měření je absorbance purpurového produktu, který je produkován řadou enzymatických reakcí. Tento vzniklý pigment je měřen spektrofotometrem. Metoda je vhodná pouze pro vzorky tekutin s menším množstvím lipidů. Byla popsána metoda HPLC, kdy byl glycerol acylován a derivát poté obsahoval benzoylovou skupinu. Tato derivatizace je velmi komplikovaná a ovlivněna biologickými faktory jako jsou obsah bílkoviny ve vzorku, zásaditost vzorku a jiné. Některé metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí mají vyšší citlivost, při stanovení glycerolu ve vzorcích krve než metoda HPLC. Často se při těchto metodách jako derivatizační činidlo používá N-methyl-N-[terc-butyldimethylsilyl]-trifluoroacetamid. Jako derivatizační činidlo byl použit trimethylsilylimidazol vzhledem k jednoduchým podmínkám silylace a nízkým cenám činidla. Rovnice silylace pro stanovení glycerolu touto metodou je zobrazeno v rovnici (8):



Vzorek byl po lyofilizaci rozpuštěn v acetonitrilu a derivatizován, Poté bylo reakční rozpouštědlo odpařeno a vysušený zbytek rozpuštěn v hexanu. Takto připravená směs byla dávkována do plynového chromatografu. Tato metoda je proto vhodnější pro obecné analytické laboratoře, kdy se stanovuje glycerol v různých typech biologických vzorků. Mez detekce této metody je 0,1 µg/ml. [31]

4.5. Stanovení dioxanu

Kontaminace podzemních vod cyklickými ethery je problémem, protože se jedná o pravděpodobné lidské karcinogeny. Dioxan je dobře rozpustný ve vodě, takže jeho odstranění je velmi obtížné. DOX se kvantitativně stanovuje pomocí extrakce tuhou fází. Autoři článku vyvinuli citlivou, selektivní a jednoduchou metodu ke stanovení dioxanu a tetrahydrofuranu, kdy na disk s aktivním uhlím dávkovali vzorek rozpuštěný v acetonu. Tyto speciální extrakční disky snižují čas a náklady na analýzu vzorků. Další výhodou je, že jsou ohebné a můžeme je vložit do nádobek automatického dávkovače, kde se analyty promývají. Následně jsou dákovány do plynového chromatografu s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Limit detekce této metody pro DOX a tetrahydrofuran je 0,31 $\mu\text{g/l}$ s výtěžností 98 % a 95 %. [32]

Obvykle se ke stanovení 1,4-dioxanu ve vodě používá extrakce kapalina-kapalina, nebo extrakce na tuhé fázi v kombinaci s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Tyto metody jsou však náročné na množství vzorku nebo rozpouštědla, a navíc jsou časově náročné. Headspace analýza je výhodná z hlediska reprodukovatelnosti, doby analýzy a automatizace. V poslední době se začala používat mikroextrakce tuhou fází, která je specifická a vysoce citlivá metoda pro analýzu 1,4-dioxanu, ale je nákladná. Autoři článku použili pro stanovení 1,4-dioxanu ve vodě metodu headspace GC–MS. Vzorek vody se nasatí chloridem sodným a přidá se 0,5 M HCl. Lahvička s roztokem je zahřívána 30 minut při teplotě 90 ° C. Výsledný roztok je dákován do chromatografu. Limit detekce metody je 0,02 $\mu\text{g/l}$. [33]

4.6. Stanovení pentarytritolu

Suchanec (1965) prezentoval metodu ke stanovení pentaerytritolu v plynovém chromatografu s tepelně vodivostním detektorem. Principem je tvorba trimethylsilylových derivátů těchto polyhydroxysloučenin. Tento postup je kratší, jednodušší a umožňuje analýzu komerčních sloučenin, jako jsou třeba mono-, di-, nebo tripentaerytritol. Trimethylsilylové deriváty jsou tékavější a tepelně stabilnější a jejich příprava trvá 10 až 30 minut v závislosti na množství polypentaerytritolů přítomných ve vzorku. Acetátové deriváty nejsou moc vhodné kvůli své dlouhé přípravě a mají nižší citlivost pro tripentaerytritol a vyšší polyhydroxysloučeniny. Acetylace trvá 2,5 hodiny. [34]

Pro řadu polyesterů, fenolové pryskyřice nebo různá aditiva polymerů byla vyvinuta speciální metoda pyrolýzy. Derivatizace těchto látek spočívá v methyloaci nebo butylaci, kdy se jako derivatizační činidlo používá tetramethyl- nebo tetrabutylamonium hydroxid. Toto derivatizační činidlo se ke směsi přidává během pyrolýzy. Analýza vzniklých derivátů probíhá v plynovém chromatografu s plamenově-ionizačním detektorem. Využit lze i GC/MS. Výhodou této techniky je vysoká citlivost detekce i pro delší strukturní řetězce a minimální manipulace se vzorkem. Součástí alkydových pryskyřic jsou polyfunkční kyseliny, vícesytné alkoholy a mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Pomocí této metody dochází k methyloaci polárních složek s dlouhým řetězcem. Při klasické pyrolýze jsme schopni stanovit pouze aldehydy, alkeny, alkany nebo anhydrid kyseliny ftalové. [35]

4.7. Stanovení nemrznoucí kapaliny

Nemrznoucí kapalina obsahuje ethylenglykol, diethylenglykol a propylenglykol. Tato směs se na letištích používá k odmrazování nebo proti námraze letadel a přistávacích ploch při studeném počasí. Tyto látky mohou představovat hrozbu pro všechny oddělení životního prostředí, a proto musí být monitorovány. Autoři článku vyvinuli novou, rychlou, citlivou a přesnou metodu pro stanovení látek obsažených v nemrznoucí kapalině, které mohou kontaminovat odtok vody z letiště. Principem metody je headspace mikroextrakce tuhou fází (HS-SPME), která je spojena s GC-MS. Extrakce polárních látek s malou molekulovou hmotností je velmi obtížná. Nejúčinnějším postupem extrakce glykolů ve vodě je extrakce v tuhé fázi (SPE). Extrakce kapalina – kapalina nebo kapalina – tuhá látka není tak účinná. Modernější technikou extrakce je SPME, která je rychlejší, citlivější, ekonomičtější a jednodušší k automatizaci. Lineární rozsah kalibrační přímky byl měřen v rozmezí 0,1 – 300 mg/l. Experimentální výsledky prokázaly, že technika HS-SPME má dobré detekční limity a není potřebný krok derivatizace vzorku. Výtěžnost metody byla v rozmezí 67 – 89 %. [36]

Pro stanovení glykolů v biologických vzorcích bylo popsáno několik metod, kdy se používali různé techniky jako je plynová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, nebo GC-MS. Nejlépe se jeví metoda s hmotnostní detekcí. Stanovení těchto látek je důležité, aby byla včas diagnostikována glykolová intoxikace. Autoři článku vyvinuly metodu, kdy byl vzorek plazmy nejprve deproteinizován pomocí acetonu a následně odpařen. Poté byl přidán anhydrid kyseliny pivalové, aby vznikly stabilní glykolové estery. K zahřátí

směsi bylo použito mikrovlnné záření, takže se zkrátila doba inkubace na polovinu a oproti dřívějšímu postupu se zlepšil poměr signálu k šumu. Aby bylo měření co nejpřesnější je potřeba vždy připravit čerstvou derivatizační směs. Limit detekce této metody je 0,01 g/l s výtěžností 50 – 65 %. Tato metoda byla primárně vyvinuta pro stanovení ethylenglykolu a diethylenglykolu, ale je vhodná i pro stanovené propylenglykolu nebo butylenglykolu. Bylo zjištěno, že tato metoda je vhodná i pro detekci glykolů v moči. [37] [38]

5. Experimentální část

5.1. Použité přístroje

plynový chromatograf: GC-2010 plus (Shimadzu, Japonsko)

hmotnostním spektrometr: GCMS-TQ 8030 (Shimadzu, Japonsko)

automatický dávkovač: AOC-5000 (Shimadzu, Japonsko)

GC 2010 s hmotnostním detektorem QP2010 plus (Shimadzu, Japonsko)

Autosampler AOC – 20i (Shimadzu, Japonsko)

sušárna Memmert (Německo)

koncentrátor: Labicom EVATERM (Česká republika)

třepačka YellowLine TTS 2 (Imlab, Belgie)

Analytické váhy: HR-120-EC (A&D instruments LTD, Japonsko)

5.2. Použité chemikálie

Aceton pro HPLC $\geq 99,8$ % VWR Chemicals (Francie)

Methanol pro HPLC $\geq 99,9$ % Sigma-Aldrich (Německo)

Acetonitril pro HPLC, Sigma-Aldrich (Francie)

n-hexan, Merck Millipore (Německo)

Pyridin: p.a., PENTA (Česká republika)

Acetanhydrid: p.a., PENTA (Česká republika)

Ethylacetát: Merck Millipore (Německo)

MSTFA: Sigma - Aldrich (USA)

Jodid amonný: p.a., Riedel-de Haen (Německo)

2-mercaptoethanol: Fluka (Švýcarsko)

Ethylenglykol, Merck Millipore (Německo)

Diethylenglykol, Merck Millipore (Německo)

Propylenglykol, Merck Millipore (Německo)

Triethylenglykol, Merck Millipore (Německo)

Glycerol, Merck Millipore (Německo)

Pentaerytritol, Merck Millipore (Německo)

Diethylenglykol monobutyl ether, Merck Millipore (Německo)

1,4 – dioxan, Merck Millipore (Německo)

5.3. Derivatizace vzorku

5.3.1. Derivatizace vzorku – acetylace

Nejprve byl připraven zásobní roztok dané látky o koncentraci 5 mg/ml. Bylo naváženo přesně okolo 25 mg glykolu do 5 ml odměrné baňky a doplněno acetonem, nebo methanolem (pouze pentaerytritol) po rysku. Z tohoto roztoku byl odpipetován 1 ml do nádoby, která se dala do koncentrátoru (na obrázku 7). Tento roztok byl odpařen pod dusíkem až do sucha. Během odpařování byl vzorek vyhříván na teplotu 40 °C, aby se rozpouštědlo odpařilo rychleji. K suchému vzorku se přidalo 30 µl pyridinu a 30 µl acetanhydridu. Poté se uzavřená nádoba dala na 45 min do sušárny, která byla nastavena na teplotu 90 °C. Po vychladnutí bylo ke vzorku napipetováno 0,5 ml ethylacetátu. Takto připravený derivát byl dávkován do plynového chromatografu.



Obrázek 7: koncentrátor EVATERM

5.3.2. Derivatizace vzorku – silylace

Nejprve byla připravena derivatizační směs MSTFA/NH₄I/ethanthiol (383/1/2, v/w/v). Zásobní roztok byl připraven z 20 mg jodidu amonného, 1 ml MSTFA a 40 µl ethanthiolu. Jodid amonný byl rozpuštěn při 80 °C v 1 ml MSTFA. Poté bylo k této směsi přidáno 40 µl ethanthiolu. Pracovní roztok byl připraven odpipetováním 150 µl zásobního roztoku a k němu byl přidán 1 ml MSTFA. Takto připravené roztoky byly uchovávány ve tmě a v chladu.

Byl připraven zásobní roztok stanovované látky o koncentraci 5 mg/ml. Bylo naváženo přesně okolo 25 mg glykolu do 5 ml odměrné baňky a doplněno acetonem, nebo methanolem (pouze pentaerytritol) po rysku. Z tohoto roztoku byl odpipetován 1 ml do nádoby. Tento roztok byl odpařen pod dusíkem až do sucha. Během odpařování byl vzorek vyhříván na teplotu 40 °C, aby se rozpouštědlo odpařilo rychleji. K suchému vzorku bylo napipetováno 20 µl pracovního roztoku. Uzavřená nádoba byla dána na 60 min do sušárny, ve které byla teplota 80 °C. Takto připravený derivát byl rozpuštěn ve 100 µl hexanu. Tyto deriváty byly dávkovány do plynového chromatografu (na obrázku 8).



Obrázek 8: Plynový chromatograf GC-2010 plus, hmotnostní spektrometr: GCMS-TQ 8030 a automatický dávkovač: AOC-5000

5.4. Teplotní program plynového chromatografu

Bylo vyzkoušeno několik teplotních programů s různými splitovacími poměry, různou teplotou nástřiku, nebo různou počáteční teplotou. Nejvhodnější teplotní program, který měl dobré limity detekce i při splitovacím poměru 1:5, pro acetylaci je uveden v tabulce 2 a pro silylaci v tabulce 3. V tabulce 1 jsou uvedeny podmínky plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru.

Tabulka 1: Podmínky plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru:

Nosný plyn:	Helium 5.0 (Linde, Česká republika)
Dávkovaný objem:	1 μ l
Lineární rychlost: 30 cm/s	30 cm/s
Teplota nástřiku:	180 °C
Splitovací poměr:	1:5
Teplota iontového zdroje:	200 °C
Kolona:	RTx-TNT 15 m x 0,18 mm x 0,20 μ m tloušťka filmu
Měřeno v režimu SEI (simultánní elektronová ionizace)	

Tabulka 2: Teplotní program pro měření na GC pro vzorek, který byl acylován

	Teplotní nárůst (°C/min)	Konečná teplota (°C)	Čas udržování konečné teploty (min)
1.		40	3
2.	10	130	0
3.	30	325	1,5

Celková doba analýzy: 20 min

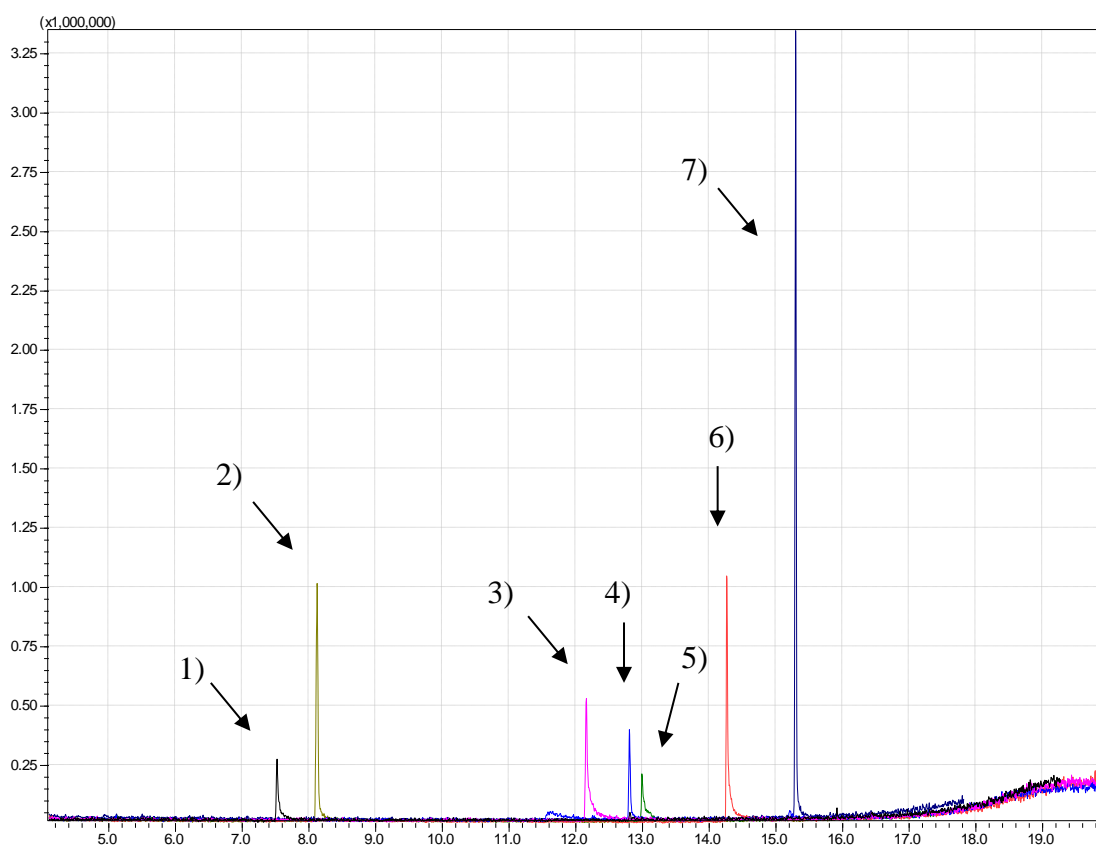
Tabulka 3: Teplotní program pro měření na GC pro vzorek, který byl silylován

	Teplotní nárůst (°C/min)	Konečná teplota (°C)	Čas udržování konečné teploty (min)
1.		50	1,5
2.	10	80	1
3.	30	230	1
4.	50	310	2

Celková doba analýzy: 15,1 min

5.5. Kvalitativní určení stanovovaných látek

Ke zjištění retenčních časů byl použit režim SCAN. Pro každou látku byl připraven derivát o koncentraci 500 µg/ml a následně byl každý změřen zvlášť v tomto režimu. Splitovací poměr byl u této metody 1:100. Na obrázku 9 je chromatogram všech stanovovaných látek, které byly acylovány. Z tohoto chromatogramu je možné odečíst retenční časy všech stanovovaných látek. Měření probíhalo na koloně RTx-TNT 15 m x 0,18 mm x 0,20 µm tloušťka filmu.



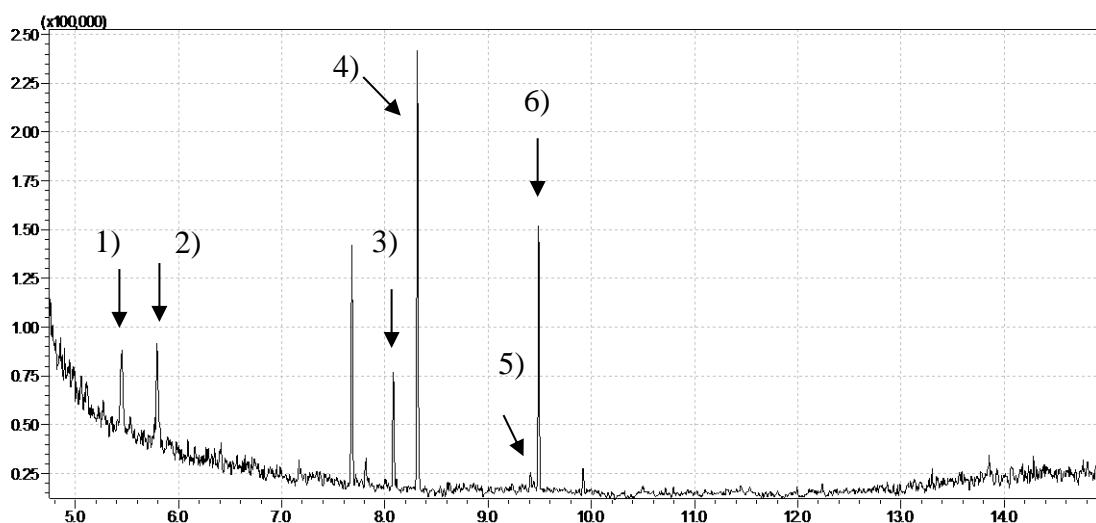
Obrázek 9: Chromatogram stanovovaných látek po acylaci, měřeno v režimu SCAN: 1) ethylenglykol diacetát, 2) propylenglykol diacetát, 3) diethylenglykol diacetát, 4) glycerol triacetát, 5) diethylenglykol monobutyl ether acetát, 6) triethylenglykol diacetát, 7) pentaerytritol tetraacetát

Z chromatogramů měřených v režimu SCAN byla zjištěna hmotnostní spektra jednotlivých látek. Ze spekter se postupně zjistily jeden cílový ion (kvantifikátor) a 2 referenční ionty (kvalifikátory), aby mohlo být měření provedeno i v režimu SIM. V tabulce 4 jsou uvedeny tyto parametry. V příloze A jsou uvedeny struktury stanovovaných derivátů.

Tabulka 4: Parametry jednotlivých látek použitých při měření v režimu SIM

Stanovovaná látka	Molekulová hmotnost	Retenční čas (min)	Cílový ion (m/z)	Referenční ion (m/z)	Referenční ion (m/z)
Ethylenglykol diacetát	146	7,61	43	86	116
Propylenglykol diacetát	160	8,12	43	87	116
Diethylenglykol diacetát	190	12,15	87	43	88
Glycerol triacetát	218	12,80	43	103	145
Diethylenglykol monobutyl ether acetát	204	12,99	43	57	87
Triethylenglykol diacetát	234	14,26	87	43	88
Pentaerytritol tetraacetát	304	15,29	43	114	112

U látek, které byly silylovány byly retenční časy zjištěny v režimu SCAN. Směs látek o koncentraci 500 µg/ml byla najednou derivatizována a následně změřena v tomto režimu. Splitovací poměr byl u této metody také 1:100. Na obrázku 10 je chromatogram všech stanovovaných látek, ze kterého je možné odečíst retenční časy. Měření probíhalo na koloně RTx-TNT o délce 15 m, průměru 0,18 mm a tloušťce filmu 0,20 µm.



Obrázek 10: Chromatogram stanovovaných látek po silylaci, měřeno v režimu SCAN: 1) ethylenglykol bistrimethylsilyl ether, 2) 1,2-propylenglykol bistrimethylsilyl ether, 3) diethylenglykol bistrimethylsilyl ether, 4) glycerol tristrimethylsilyl ether, 5) triethylenglykol 2 TMS, 6) pentaerytritol 4 TMS

Z chromatogramu měřeného v režimu SCAN byla zjištěna jednotlivá hmotnostní spektra pro stanovované látky. Diethylenglykol monobutyl ether a triethylenglykol byly zderivatizovány a změřeny zvlášť a následně se z těchto chromatogramů odečetla hmotnostní spektra. Chromatogramy těchto dvou látek jsou v přílohách C a D. Ze všech chromatogramů je patrné, že mezi časy 6,75 – 8,0 minut a 9,6 – 10,6 minut, jsou píky navíc. Tyto píky byly identifikovány jako derivatizační činidlo. Proto byl filament v těchto časech vypínán, aby nedocházelo k saturaci detektoru, pokud by byl snížen splitovací poměr na 1:5. Z těchto hmotnostních spekter se zjistily jeden cílový ion (kvantifikátor) a 2 referenční ionty (kvalifikátory), které jsou zapsány v tabulce 5. Tyto hodnoty byly využity při měření v režimu SIM. V příloze B jsou uvedeny struktury stanovovaných derivátů.

Tabulka 5: Parametry jednotlivých látek použitých při měření v režimu SIM

Stanovovaná látka	Molekulová hmotnost	Retenční čas (min)	Cílový ion (m/z)	Retenční ion (m/z)	Retenční ion (m/z)
Ethylenglykol bistrimethylsilyl ether	206	5,48	147	73	191
1,2-Propylenglykol bistrimethylsilyl ether	220	5,82	117	73	147
Diethylenglykol bistrimethylsilyl ether	250	8,09	73	117	116
Glycerol tristrimethylsilyl ether	309	8,33	73	147	205
Diethylenglykol monobutyl ether trimethylsilyl ether	234	8,60	73	57	45
Triethylenglykol 2 TMS derivát	294	9,44	73	117	116
Pentaerytritol 4 TMS derivát	424	9,49	73	191	147

6. Výsledky

6.1. Acetylace

Byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci okolo 5000 µg/ml. V tabulce 6 jsou uvedeny přesné hmotnosti navážek jednotlivých látek a přesné koncentrace zásobních roztoků, které byly použity při derivatizaci.

Tabulka 6: Navážka a koncentrace zásobních roztoků

	navážka (mg)	koncentrace (µg/ml)
Ethylenglykol	26,2	5240
Diethylenglykol	25,1	5020
Triethylenglykol	25,8	5160
Propylenglykol	25,8	5160
Glycerol	32,2	6440
DEGMBE	27,7	5540
PENTA	25,3	5060

Z těchto zásobních roztoků byla připravena pětibodová kalibrační řada. Obvykle byla pro každou látku nejprve zvolena koncentrace 10 µg/ml. Tento roztok byl zderivatizován a následně proměřen. Podle toho, jak vypadal chromatogram daného derivátu, byly zvoleny další koncentrace, až se došlo k nejnižší možné koncentraci, kterou bylo možné detekovat. Naopak nejvyšší koncentrace byla zvolena tak, aby nebyl detektor saturován. Každá látka má proto jiný rozsah koncentrací a jiný limit detekce. Každý derivát byl měřen 3x v režimu SCAN a 3x v režimu SIM. V tabulce 7 jsou uvedeny průměrné plochy píků se směrodatnou odchylkou při různých koncentracích v obou režimech. V přílohách E až K jsou kalibrační závislosti jednotlivých látek v obou režimech.

Z kalibračních závislostí je patrné, že koeficient spolehlivosti pro režim SIM a SCAN je velmi podobný. Největší rozdíl mezi těmito režimy je u derivátu triethylenglykolu. Konkrétně pro režim SIM má hodnotu 0,9623 a pro režim SCAN 0,8649. Vysoký koeficient spolehlivosti má derivát pentaerytritolu v režimu SIM, a to 0,9961.

Tabulka 7: Průměrné plochy píků stanovovaných látek, které byly derivatizovány acylačním činidlem, měřené 3x v režimu SCAN a 3x v režimu SIM. Plochy byly odečteny v režimu TIC. Údaje jsou uváděny se směrodatnou odchylkou.

Ethylenglykol diacetát					
koncentrace (µg/ml)	9,54	23,85	47,71	71,56	85,88
SCAN	1543320 ± 240269	1369755 ± 130226	6149968 ± 476840	13129265 ± 2131712	14098997 ± 2584180
SIM	990991 ± 57345	1275846 ± 77612	3092539 ± 256465	4229618 ± 288561	4939214 ± 408029
Propylenglykol diacetát					
koncentrace (µg/ml)	4,84	9,69	24,22	48,45	72,67
SCAN	436584 ± 9738	3073377 ± 20170	4449457 ± 39870	5465958 ± 100852	8803864 ± 86076
SIM	405142 ± 3053	3492043 ± 102978	5078811 ± 1184988	6562710 ± 4598476	9372056 ± 212025
Diethylenglykol diacetát					
koncentrace (µg/ml)	9,96	24,90	49,80	74,70	89,64
SCAN	80634 ± 5538	1366649 ± 37326	1824590 ± 51141	4446134 ± 99244	4596126 ± 64953
SIM	166217 ± 11392	1729958 ± 181877	2842760 ± 673334	5222224 ± 326156	6367564 ± 91008
Glycerol triacetát					
koncentrace (µg/ml)	3,11	6,21	15,53	30,28	46,58
SCAN	40173 ± 9332	36608 ± 4381	72382 ± 5885	99522 ± 940	140598 ± 3048
SIM	24852 ± 1329	26168 ± 2387	76063 ± 1172	118614 ± 8259	155920 ± 10870
Diethylenglykol monobutyl ether acetát					
koncentrace (µg/ml)	41,52	61,37	73,10	82,13	122,74
SCAN	115103 ± 32393	534299 ± 30166	941909 ± 21719	2815578 ± 111231	6328546 ± 195376
SIM	191305 ± 3706	505452 ± 32048	848605 ± 34499	3340559 ± 38908	6357709 ± 19302

Triethylenglykol diacetát					
koncentrace (µg/ml)	9,80	23,26	47,09	70,54	84,50
SCAN	437248 ± 26187	421871 ± 11005	2453436 ± 98470	4622229 ± 228096	9339733 ± 94633
SIM	718206 ± 121688	8147956 ± 99157	3145622 ± 45722	3857668 ± 168882	4928599 ± 72638
Pentaerytritol tetraacetát					
koncentrace (µg/ml)	9,88	24,70	49,41	74,11	88,93
SCAN	22903 ± 855	57803 ± 3975	132873 ± 2512	187660 ± 5385	304703 ± 23696
SIM	28321 ± 686	56257 ± 10531	140084 ± 3919	216091 ± 955	254896 ± 18742

Z grafů kalibrací byly odečteny rozsah kalibrace, mez stanovitelnosti (LOQ) a koeficient spolehlivosti (R^2) pro stanovované látky v obou režimech. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Rozsah kalibrace, mez stanovitelnosti a koeficient spolehlivosti pro stanovované látky, které byly acylovány.

	Rozsah kalibrace (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	R² (SCAN)	R² (SIM)
Ethylenglykol diacetát	9,54 – 85,88	9,54	0,9508	0,9858
Propylenglykol diacetát	4,84 – 72,67	4,84	0,9316	0,9020
Diethylenglykol diacetát	9,96 – 89,64	9,96	0,9457	0,9875
Glycerol triacetát	3,11 – 46,58	3,11	0,9856	0,9764
Diethylenglykol monobutyl ether acetát	41,52 – 122,74	41,52	0,9277	0,9025
Triethylenglykol diacetát	9,50 – 84,50	9,50	0,8636	0,9618
Pentaerytritol tetraacetát	9,88 – 88,93	9,88	0,9490	0,9961

6.1.1. Validace Metody

Pro ověření správnosti metody je potřeba její validace, která je vyjádřena relativní odchylkou. Aby byla metoda validní musí mít nejnižší koncentrace relativní odchylku do 20 % a pro ostatní koncentrace musí mít hodnotu do 15 %. V tabulce 9 jsou spočítány jednotlivé relativní odchylky pro dané koncentrace. Červeně jsou znázorněny hodnoty, které jsou nevhodné.

Tabulka 9: Spočítané relativní odchylky pro stanovované látky, které byly derivatizovány acylačním činidlem, v měřených koncentracích. Průměrné plochy píků jsou odečteny z režimu TIC

Ethylenglykol diacetát										
	SCAN					SIM				
skutečná koncentrace (µg/ml)	9,54	23,85	47,71	71,56	85,88	9,54	23,85	47,71	71,56	85,88
průměrná plocha	1543320	1369755	6149968	13129265	14098997	990991	1275846	3092539	4229618	4939214
spočítaná koncentrace (µg/ml)	18,90	17,97	43,47	80,69	85,86	23,68	28,90	62,19	83,02	96,02
relativní odchylka (%)	98,08	24,65	8,90	12,75	0,02	148,24	21,18	30,34	16,01	11,80
Propylenglykol diacetát										
	SCAN					SIM				
skutečná koncentrace (µg/ml)	4,84	9,69	24,22	48,45	72,67	4,84	9,69	24,22	48,45	72,67
průměrná plocha	436584	3073377	4449457	5465958	8803864	405142	3492043	5078811	6562710	9372056
spočítaná koncentrace (µg/ml)	-5,18	19,05	31,69	41,02	71,69	-5,30	22,21	36,35	49,58	74,62
relativní odchylka (%)	206,93	96,55	30,83	15,33	1,35	209,54	129,22	50,10	2,33	2,68
Diethylenglykol diacetát										
	SCAN					SIM				
skutečná koncentrace (µg/ml)	9,96	24,9	49,8	74,7	89,64	9,96	24,9	49,8	74,7	89,64
průměrná plocha	80634	1366649	1824590	4446134	4596126	166217	1729958	2842760	5222224	6367564
vypočítaná koncentrace (µg/ml)	8,81	30,94	38,82	83,92	86,50	8,84	29,50	44,21	75,66	90,79
relativní odchylka (%)	11,51	24,26	22,05	12,35	3,50	11,29	18,48	11,23	1,28	1,29

Glycerol triacetát										
	SCAN					SIM				
skutečná koncentrace (µg/ml)	3,11	6,21	15,53	30,28	46,58	3,11	6,21	15,53	30,28	46,58
průměrná plocha	40173	36608	72382	99522	140598	24852	26168	76063	118614	155920
vypočítaná koncentrace (µg/ml)	4,56	3,06	18,05	29,42	46,62	2,68	3,10	18,99	32,53	44,41
relativní odchylka (%)	46,52	50,67	16,22	2,85	0,10	13,71	50,04	22,25	7,44	4,66
Diethylglykol monobutyl ether acetát										
	SCAN					SIM				
skutečná koncentrace (µg/ml)	41,52	61,37	73,1	82,13	122,74	41,52	61,37	73,1	82,13	122,74
průměrná plocha	115103	534299	941909	2815578	6328546	191305	505452	848605	3340559	6357709
vypočítaná koncentrace (µg/ml)	50,39	55,53	60,52	83,47	126,49	50,89	54,70	58,87	89,13	125,76
relativní odchylka (%)	121,38	9,52	17,21	1,63	3,05	22,56	10,86	19,47	8,52	2,46
Triethylglykol diacetát										
	SCAN					SIM				
skutečná koncentrace (µg/ml)	9,5	23,26	47,09	70,54	84,5	9,5	23,26	47,09	70,54	84,5
průměrná plocha	437248	421871	2453436	4622229	9339733	718206	814796	3145622	3857668	4928599
vypočítaná koncentrace (µg/ml)	22,11	21,97	40,40	60,08	102,87	13,22	14,87	54,72	66,89	85,19
relativní odchylka (%)	132,74	5,54	14,21	14,84	21,74	39,20	36,05	16,19	5,18	0,82
Pentaerytritol tetraacetát										
	SCAN					SIM				
skutečná koncentrace (µg/ml)	9,88	24,7	49,41	74,11	88,93	9,88	24,7	49,41	74,11	88,93
průměrná plocha	22903	57803	132873	187660	304703	28321	56257	140084	216091	254896
vypočítaná koncentrace (µg/ml)	13,58	24,15	46,89	63,48	98,93	15,22	23,68	49,07	72,09	83,84
relativní odchylka (%)	37,45	2,23	5,11	14,34	11,24	54,06	4,12	0,69	2,72	5,72

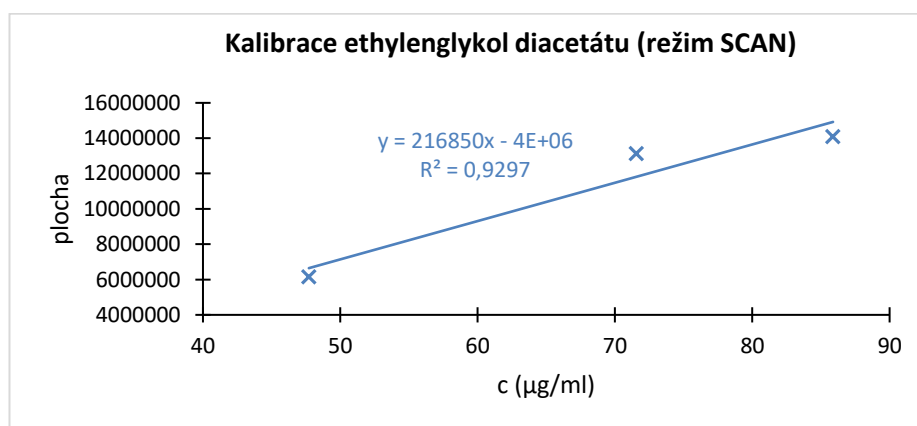
Nejlepší hodnoty validace, z měřených látek, má pro tuto metodu pentaerytritol tetraacetát. Naopak nejhorší hodnoty má v obou režimech propylenglykol diacetát. Z naměřených hodnot vyplývá, že tato metoda má nízkou míru validity.

V grafech 1 až 6 jsou kalibrační závislosti stanovovaných látek. V těchto grafech jsou použity pouze hodnoty, které byly vyhodnoceny jako validní. V tabulce 10 je uveden lineární rozsah, mez stanovitelnosti (LOQ) a koeficient spolehlivosti (R^2) pro stanovované látky, které byly derivatizovány touto metodou.

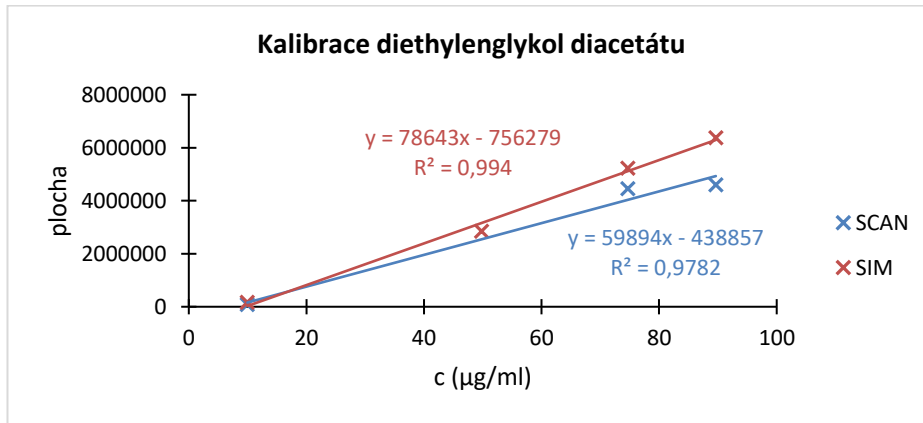
Tabulka 10: Rozsah kalibrace, mez stanovitelnosti a koeficient spolehlivosti pro stanovované látky v obou režimech

	SCAN			SIM		
	Rozsah kalibrace (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	R^2	Rozsah kalibrace (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	R^2
Ethylenglykol diacetát	47,71 – 85,88	47,71	0,9297			
Diethylenglykol diacetát	9,96 – 89,64	9,96	0,9782	9,96 – 89,64	9,96	0,9940
Glycerol triacetát	15,53 – 46,58	15,53	0,9922	3,11 – 46,58	3,11	0,9900
Diethylenglykol monobutyl ether acetát	61,37 – 122,74	61,37	0,9961	61,37 – 122,74	61,37	0,9725
Triethylenglykol diacetát	23,26 – 70,54	23,26	0,9994			
Pentaerytritol tetraacetát	24,70 – 88,93	24,70	0,9320	24,70 – 88,93	24,70	0,9978

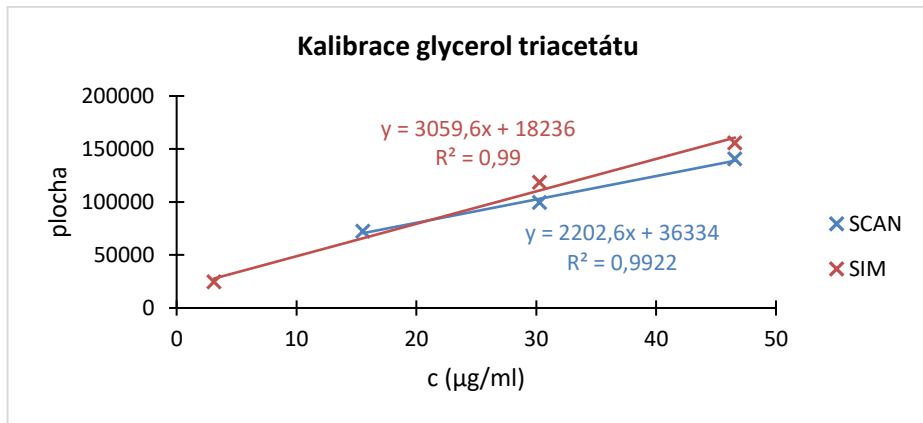
Graf 1: Kalibrace ethylenglykol diacetátu, měřeného v režimu SCAN



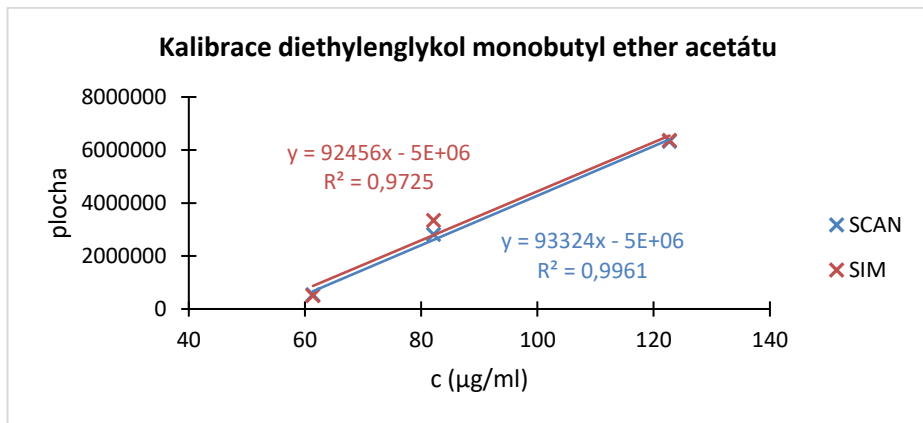
Graf 2: Kalibrace diethylenglykol diacetátu



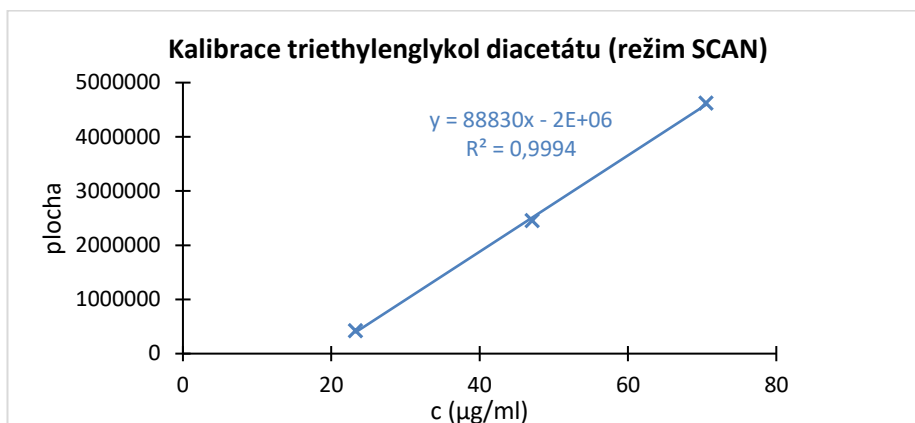
Graf 3: Kalibrace glycerol triacetátu



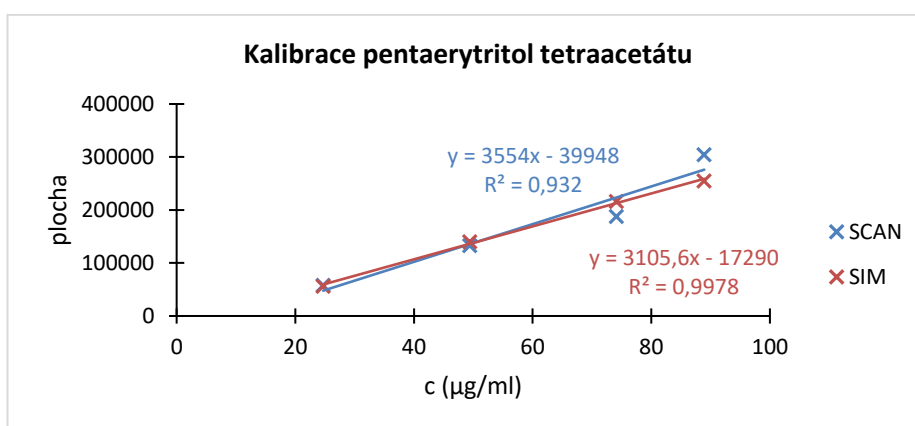
Graf 4: Kalibrace diethylenglykol monobutyl ether acetátu



Graf 5: Kalibrace triethylenglykol diacetátu. Měřeno v režimu SCAN



Graf 6: Kalibrace pentaerytritol tetraacetátu



Z kalibračních závislostí vyplývá, že nejlepší hodnoty pro validaci má derivát glycerolu. Naopak metoda použitá pro derivát propylenglykolu není validní. Další metody, které nejsou validní jsou v režimu SIM pro derivát ethylenglykolu a triethylenglykolu, proto nejsou v tabulce 10 uvedeny. Koeficient spolehlivosti pro režim SCAN a režim SIM vychází dost podobně. U všech stanovovaných látek se zvýšila mez stanovitelnosti, pouze u derivátu glycerolu, měřeného v režimu SIM, zůstala stejná.

6.2. Silylace

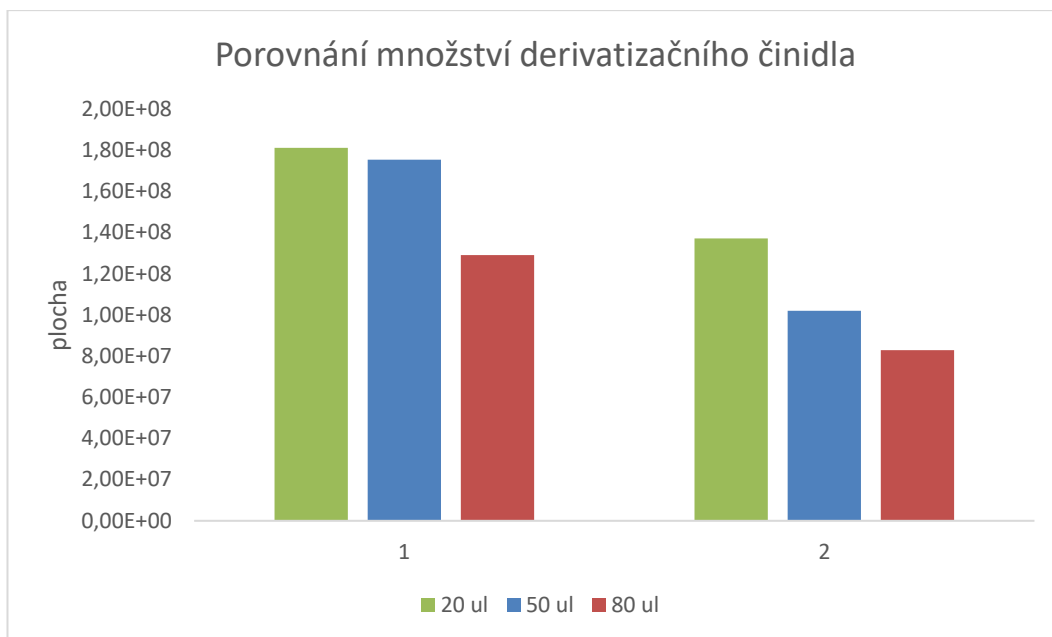
Byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci okolo 5000 µg/ml. V tabulce 11 jsou uvedeny přesné hmotnosti navážek stanovovaných látek a přesné koncentrace zásobních roztoků, které byly použity při derivatizaci.

Tabulka 11: Navážka a koncentrace zásobních roztoků

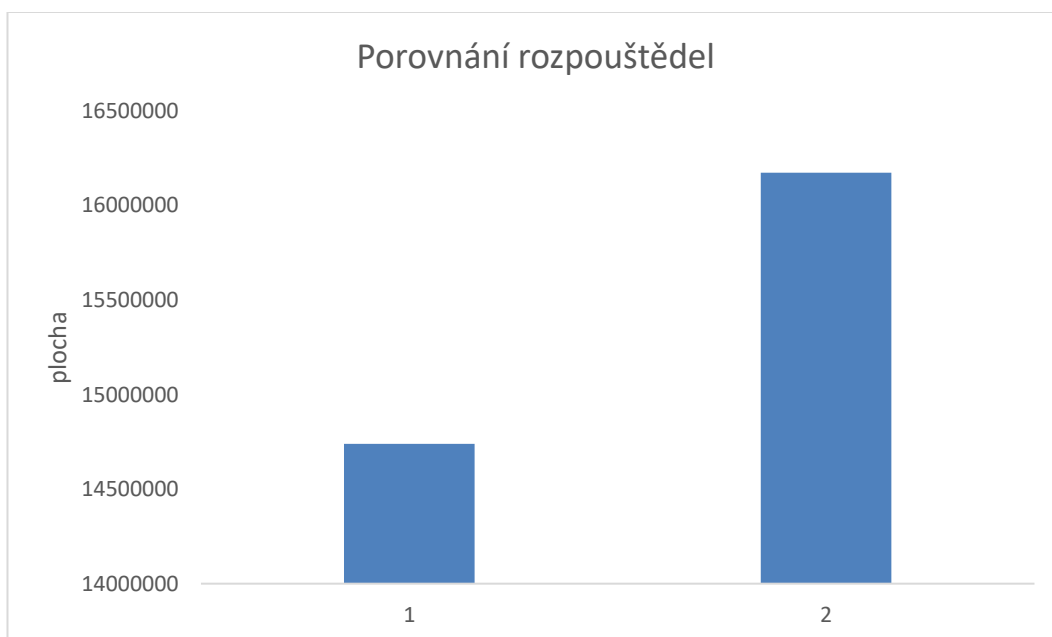
	navážka (mg)	koncentrace (µg/ml)
Ethylenglykol	26,1	5220
Diethylenglykol	24,7	4940
Triethylenglykol	25,8	5160
Propylenglykol	25,6	5120
Glycerol	50,9 ¹	5090
DEGMBE	27,4	5480
PENTA	25,3	5060

Nejprve bylo optimalizovány podmínky analýzy, aby došlo k dostatečnému rozseparování stanovovaných látek. Jako rozpouštědlo se zkusil aceton a acetonitril. Dále se zkoušelo množství derivatizačního činidla, které se přidalo ke směsi (20 µl, 50 µl a 80 µl). Toto porovnání je zobrazeno na obrázku 11. Nejvhodnější bylo přidávání 20 µl činidla, ale množství vzniklého derivátu bylo velmi malé. Proto se derivát zkusil naředit v methanolu nebo hexanu. Methanol reagoval s derivatizačním činidlem, takže nebyl vhodný pro toto použití. Použil se hexan (100 µl). Pro výplach mikrostříkačky Hamilton byl zvolen hexan. Ze změřených hodnot (obrázek 12) vyplývá, že vhodnějším rozpouštědlem je aceton.

¹ Naváženo do 10 ml odměrné baňky a doplněno po rysku



Obrázek 11: Porovnání množství derivatizačního činidla použitého k derivatizaci roztoku glycerolu o koncentraci 50 µg/ml. V 1 jsou stanovované látky před derivatizací rozpuštěny v acetonitrilu. Ve 2 jsou stanovované látky rozpuštěny v acetonu.



Obrázek 12: Porovnání acetonitrilu (1) a acetonu (2) jako rozpouštědla pro roztok glycerolu o koncentraci 100 µg/ml, který byl derivatizován 20 µl činidla. Ke vzniklému derivátu se napipetovalo 100 µl hexanu.

Ze zásobních roztoků byla poté připravena pětibodová kalibrační řada. Obvykle byla pro každou látku nejprve zvolena koncentrace 50 µg/ml. Tento roztok byl zderivatizován, bylo

k němu přidáno 100 µl hexanu a následně byl proměřen. Podle toho, jak vypadal chromatogram daného derivátu se volily další koncentrace. Každý derivát byl měřen 2x v režimu SCAN a 2x v režimu SIM. V tabulce 12 jsou uvedeny průměrné plochy píků při různých koncentracích v obou režimech. Derivát triethylenglykolu a diethylenglykolu monobutyl etheru byl měřen na koloně RTx-TNT 15 m x 0,18 mm x 0,20 µm tloušťka filmu. Zbývající deriváty byly měřeny na plynovém chromatografu GCMS-QP2010 Plus, kde byla použita kolona ZB-5HT inferno o délce 30 m, průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 µm. Při měření na této koloně byly retenční časy posunuty o 2 minuty. V přílohách L až R jsou kalibrační závislosti těchto derivátů v obou režimech.

Z kalibračních závislostí vyplývá, že koeficienty spolehlivosti měření jsou v režimu SIM i SCAN velmi podobné. Největší rozdíl mezi měřeními v režimu SIM a režimu SCAN je zase u derivátu triethylenglykolu. V režimu SCAN má hodnotu 0,8716 a v režimu SIM 0,9459. Proti předchozí metodě má derivát ethylenglykolu velmi nízký koeficient spolehlivosti.

Oproti derivatizaci, kdy se použilo acylační činidlo je metoda pro tyto látky méně citlivá, a i koeficienty spolehlivosti jsou nižší. Naopak je u této metody lepší relativní směrodatná odchylka.

Tabulka 12: Průměrné plochy píků stanovovaných látek, které jsou derivatizovány silylačním činidlem, měřené 2x v režimu SCAN a 2x v režimu SIM. Údaje jsou uváděny se směrodatnou odchylkou a jsou zjištěny z režimu TIC.

Ethylenglykol bistrimethylsilyl ether					
koncentrace (µg/ml)	239,46	287,36	335,25	383,14	478,93
SCAN	1868 ± 269	8631 ± 402	565139 ± 28418	12757927 ± 740679	13685027 ± 176303
SIM	2701 ± 94	9297 ± 165	561578 ± 14851	13487586 ± 397443	14803642 ± 3387
1,2-propylenglykol bistrimethylsilyl ether					
koncentrace (µg/ml)	195,31	244,14	292,97	341,80	390,63
SCAN	15812 ± 124	608236 ± 36001	963562 ± 41327	5463748 ± 224612	14279635 ± 12431
SIM	20896 ± 601	627227 ± 7060	1048900 ± 1385	6024158 ± 96217	16247980 ± 200894

Diethylenglykol bistrimethylsilyl ether					
koncentrace (µg/ml)	202,43	253,04	303,64	354,25	404,86
SCAN	3600753 ± 12022	5636017 ± 63035	6622218 ± 98545	7054110 ± 33882	9802618 ± 17042
SIM	2177449 ± 27173	5805439 ± 12421	8865763 ± 8162	9232198 ± 41128	12406371 ± 438419
Glycerol tristrimethylsilyl ether					
koncentrace (µg/ml)	24,56	49,12	73,67	98,23	122,79
SCAN	420346 ± 5669	938732 ± 12940	937605 ± 3652	1369460 ± 8958	1736682 ± 37252
SIM	1065136 ± 91707	1398793 ± 44206	1623672 ± 16091	1778947 ± 181478	1964226 ± 86712
Diethylenglykol monobutyl ether trimethylsilyl ether					
koncentrace (µg/ml)	45,62	68,43	114,05	136,86	273,72
SCAN	1182 ± 90	28659 ± 501	44428 ± 1043	360141 ± 6526	1554212 ± 183989
SIM	1136 ± 71	3021 ± 419	5446 ± 53	431002 ± 9566	1593508 ± 260893
Triethylenglykol 2 TMS derivát					
koncentrace (µg/ml)	72,67	87,21	96,90	121,12	145,35
SCAN	2470 ± 261	624085 ± 11663	1353931 ± 72059	3333288 ± 217553	10456190 ± 176980
SIM	3017 ± 44	628729 ± 16586	1493950 ± 9530	3899021 ± 63252	8510912 ± 147110
Pentaerytritol 4 TMS derivát					
koncentrace (µg/ml)	74,11	98,81	123,52	148,22	197,63
SCAN	1024899 ± 30227	2316389 ± 55108	6086533 ± 110099	6065482 ± 43514	18651718 ± 758265
SIM	946790 ± 9147	2534378 ± 25439	8119043 ± 5658	7613826 ± 124467	25033847 ± 1754213

V tabulce 13 je uveden rozsah kalibrace, mez stanovitelnosti (LOQ) a koeficient spolehlivosti (R^2) pro stanovované látky. Tyto hodnoty byly zjištěny z kalibračních závislostí sestavených z hodnot, které byly vyhodnoceny jako validní.

Tabulka 13: Rozsah kalibrace, mez stanovitelnosti a koeficient spolehlivosti pro stanovované látky, které byly silylovány.

	Rozsah kalibrace ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	R^2 (SCAN)	R^2 (SIM)
Ethylenglykol bistrimethylsilyl ether	239,46 – 478,93	239,46	0,7744	0,7816
1,2-Propylenglykol bistrimethylsilyl ether	195,31 – 390,63	195,31	0,7736	0,7667
Diethylenglykol bistrimethylsilyl ether	202,43 – 404,86	202,43	0,9378	0,9517
Glycerol tristrimethylsilyl ether	24,56 – 122,79	24,56	0,9475	0,9762
Diethylenglykol monobutyl ether trimethylsilyl ether	45,62 – 273,72	45,62	0,9272	0,9231
Triethylenglykol 2 TMS derivát	72,67 – 145,35	72,67	0,8716	0,9459
Pentaerytritol 4 TMS derivát	74,11 – 197,63	74,11	0,8953	0,8893

6.2.1. Validace metody

Stejně jako u předchozí derivatizace se pro stanovované látky při různých koncentracích počítaly relativní odchylky. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce 14, kde jsou červeně označeny nevyhovující hodnoty.

Tabulka 14: Spočítané hodnoty pro silylační metodu. Průměrné hodnoty ploch pík jsou odečteny z režimu TIC.

Ethylenglykol bistrimethylsilyl ether										
	SCAN					SIM				
skutečná koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	239,46	287,36	335,25	383,14	478,93	239,46	287,36	335,25	383,14	478,93
průměrná plocha	1868	8631	565139	12757927	13685027	2701	9297	561578	13487586	14803642
spočítaná koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	280,61	280,70	288,51	459,56	472,57	260,62	260,70	267,90	436,31	453,46
relativní odchylka (%)	17,18	2,32	13,94	19,95	1,33	8,84	9,28	20,09	13,88	5,32

1,2-Propylenglykol bistrimethylsilyl ether										
	SCAN					SIM				
skutečná koncentrace (µg/ml)	195,31	244,14	292,97	341,8	390,63	195,31	244,14	292,97	341,8	390,63
průměrná plocha	15812	608236	963562	5463748	14279635	20896	627227	1048900	6024158	16247980
spočítaná koncentrace (µg/ml)	292,76	301,43	306,62	372,45	501,39	258,27	266,09	271,53	335,71	467,60
relativní odchylka (%)	49,90	23,46	4,66	8,97	28,35	32,24	8,99	7,32	1,78	19,70
Diethylenglykol bistrimethylsilyl ether										
	SCAN					SIM				
skutečná koncentrace (µg/ml)	202,43	253,04	303,64	354,25	404,86	202,43	253,04	303,64	354,25	404,86
průměrná plocha	3600753	5636017	6622218	7054110	9802618	2177449	5805439	8865763	9232198	12406371
vypočítaná koncentrace (µg/ml)	205,07	279,58	315,69	331,51	432,14	194,45	271,32	336,17	343,93	411,19
relativní odchylka (%)	1,30	10,49	3,97	6,42	6,74	3,94	7,23	10,71	2,91	1,56
Glycerol tristrimethylsilyl ether										
	SCAN					SIM				
skutečná koncentrace (µg/ml)	24,56	49,12	73,67	98,23	122,79	24,56	49,12	73,67	98,23	122,79
průměrná plocha	420346	938732	937605	1369460	1736682	1065136	1398793	1623672	1778947	1964226
vypočítaná koncentrace (µg/ml)	20,75	62,30	62,21	96,83	126,27	17,19	54,81	80,16	97,66	118,55
relativní odchylka (%)	15,52	26,84	15,55	1,42	2,84	30,01	11,58	8,81	0,58	3,45
Diethylenglykol monobutyl ether trimethylsilyl ether										
	SCAN					SIM				
skutečná koncentrace (µg/ml)	45,62	68,43	114,05	136,86	273,72	45,62	68,43	114,05	136,86	273,72
průměrná plocha	1182	28659	44428	360141	1554212	1136	3021	5446	431002	1593508
vypočítaná koncentrace (µg/ml)	72,30	76,14	78,35	122,48	289,41	73,05	73,30	73,63	131,00	287,71
relativní odchylka (%)	58,48	11,27	31,31	10,51	5,73	60,12	7,12	35,44	4,28	5,11

Triethylenglykol 2 TMS derivát										
	SCAN					SIM				
skutečná koncentrace (µg/ml)	72,67	87,21	96,90	121,12	145,35	72,67	87,21	96,90	121,12	145,35
průměrná plocha	2470	624085	1353931	3333288	10456190	3017	628729	1493950	3899021	8510912
vypočítaná koncentrace (µg/ml)	72,23	76,72	81,99	96,28	147,72	76,92	82,26	89,65	110,20	149,60
relativní odchylka (%)	0,61	12,03	15,39	20,51	1,63	5,84	5,67	7,48	9,02	2,93
Pentaerytritol 4 TMS derivát										
	SCAN					SIM				
skutečná koncentrace (µg/ml)	74,11	98,81	123,52	148,22	197,63	74,11	98,81	123,52	148,22	197,63
průměrná plocha	1024899	2316389	6086533	6065482	18651718	946790	2534378	8119043	7613826	25033847
vypočítaná koncentrace (µg/ml)	79,31	88,60	115,72	115,57	206,11	110,70	119,09	148,60	145,93	237,99
relativní odchylka (%)	7,01	10,33	6,32	22,03	4,29	49,37	20,52	20,31	1,54	20,42

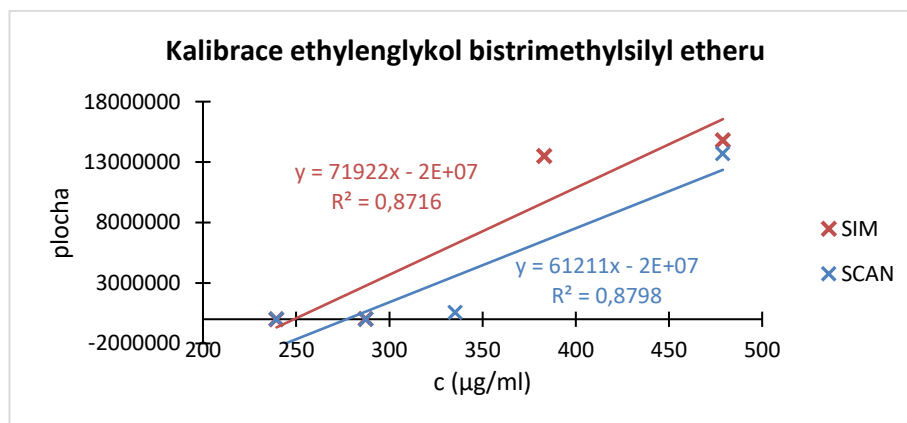
Oproti předcházející derivatizaci má derivát pentaerytritolu v režimu SIM velmi nízkou validitu. Nejvyšší validita byla spočítána u derivátu diethylenglykolu, kde se všechny hodnoty vešly do stanovených mezí, a proto se může považovat za validní.

V tabulce 15 je uveden rozsah kalibrace, mez stanovitelnosti (LOQ) a koeficient spolehlivosti (R^2) pro stanovované látky, které byly silylovány. Grafy kalibračních závislostí, kde byly použity hodnoty vyhodnocené jako validní, jsou zobrazeny v grafech 7-12.

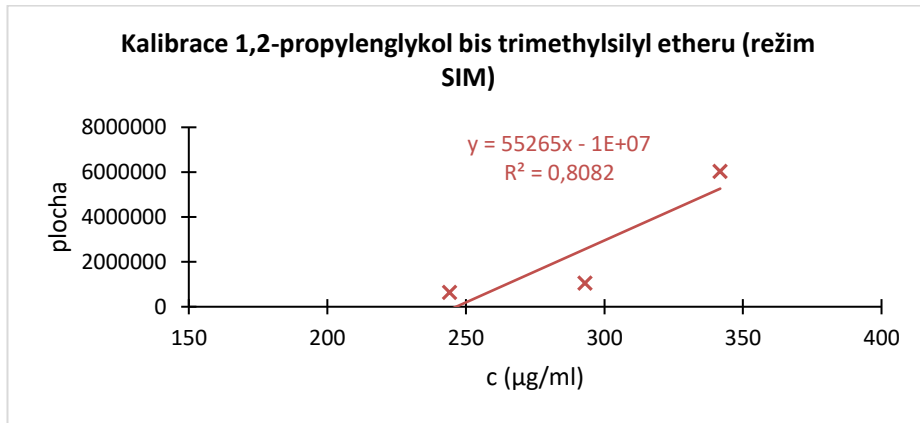
Tabulka 15: Rozsah kalibrace, mez stanovitelnosti a koeficient spolehlivosti

	SCAN			SIM		
	Rozsah kalibrace ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	R^2	Rozsah kalibrace ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	R^2
Ethylenglykol bistrimethylsilyl ether	239,46 – 458,75	239,46	0,8798	239,46 – 458,75	239,46	0,8716
1,2-Propylenglykol bistrimethylsilyl ether				244,14 – 341,80	244,14	0,8082
Glycerol tristrimethylsilyl ether	24,56 – 122,79	24,56	0,9990	24,56 – 98,23	24,56	0,9721
Diethylenglykol monobutyl ether trimethylsilyl ether	68,43 – 273,72	68,43	0,9844	68,43 – 273,72	68,43	0,995
Triethylenglykol 2 TMS derivát	72,67 – 145,35	72,67	0,9813			
Pentaerytritol 4 TMS derivát	74,11 – 197,63	74,11	0,9787			

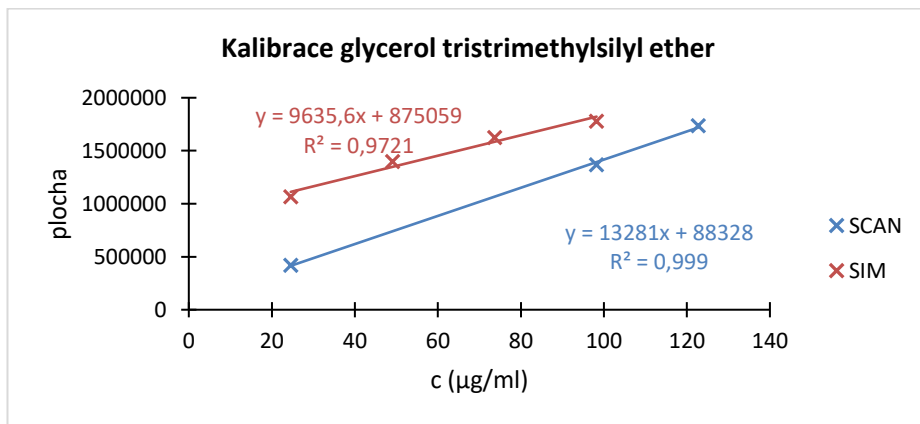
Graf 7: Kalibrace ethylenglykol bistrimethylsilyl etheru



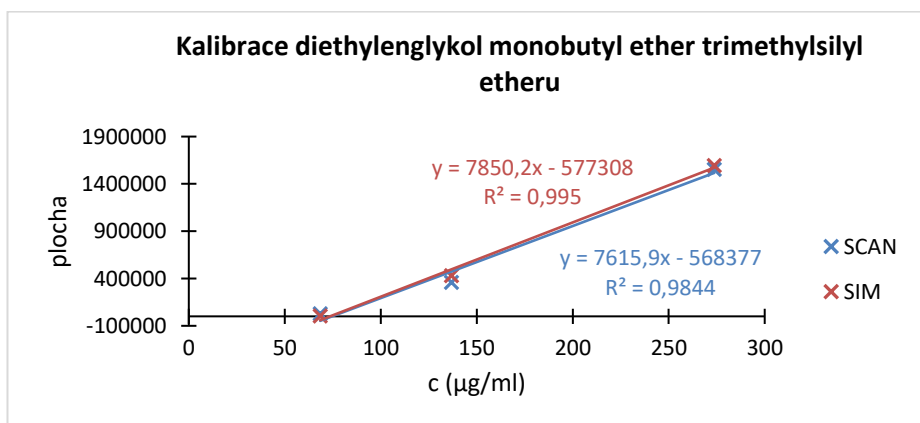
Graf 8: Kalibrace derivátu propylenglykolu. Měřeno v režimu SIM



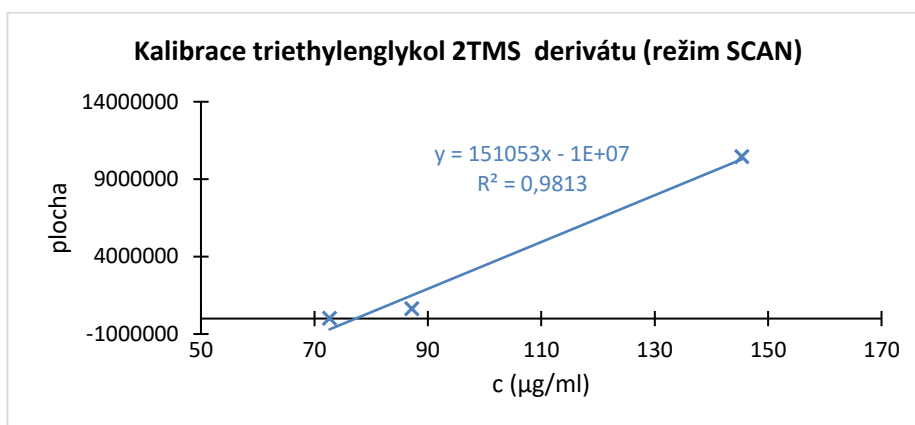
Graf 9: Kalibrace glycerol tris(trimethylsilyl) etheru



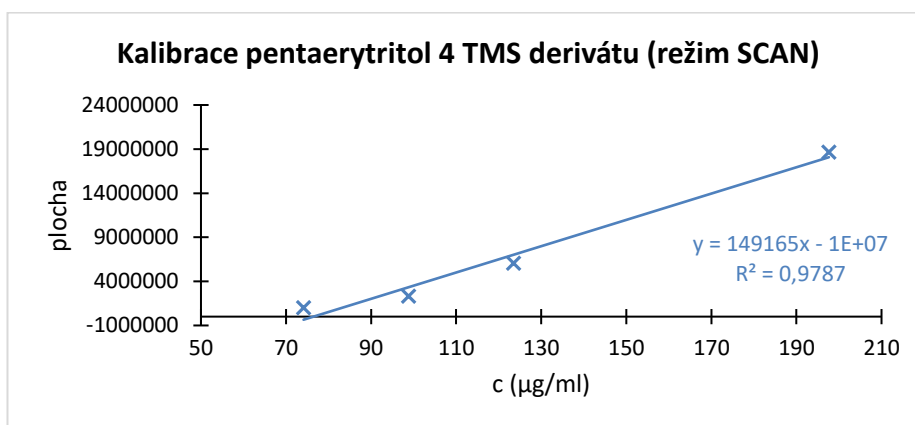
Graf 10: Kalibrace derivátu DEGMBE



Graf 11: Kalibrace derivátu triethylenglykolu. Měřeno v režimu SCAN



Graf 12: Kalibrace pentaerytritol 4 TMS derivátu. Měřeno v režimu SCAN



Z naměřených hodnot vyplývá, že tato metoda derivatizace má nejlepší validaci pro glycerol. Propylenglykol má naopak nejhorší hodnoty validace. Nízké hodnoty má také ethylenglykol. Hodnoty, které se nezměnily (derivát diethylenglykolu) nebo neodpovídaly podmínkám validace v tabulce 15 nejsou zmíněny. Koeficienty spolehlivosti pro režim SCAN a SIM vycházejí podobně. Mez stanovitelnosti se zvýšila, o jeden bod kalibrační řady, pro derivát propylenglykolu a derivát DEGMBE, u ostatních látek zůstala stejná.

6.3. Stanovení modelových vzorků

Nejprve bylo potřeba zjistit, které z rozpouštědel je pro vybranou derivatizační metodu nejvhodnější. Proto byly připraveny roztoky glycerolu o koncentraci 50 µg/ml rozpuštěného v různých rozpouštědlech. Takto připravené roztoky byly acylovány, změřeny a následně porovnány. V tabulce 16 jsou uvedeny výsledky účinnosti této metody pro jednotlivá rozpouštědla.

Tabulka 16: Výtěžnost pro jednotlivá rozpouštědla, kdy byl derivatizován roztok glycerolu o koncentraci 50 µg/ml. Měřeno v režimu SCAN a odečteno z TIC.

	methanol	acetonitril	aceton
čistý roztok	422557	216484	109552
roztok s terčíkem	146071	61650	8305
výtěžnost (%)	34,6	28,5	77,9

Ze změřených hodnot vyplývá, že nejvhodnější je použít jako rozpouštědlo aceton.

Ke zjištění výtěžnosti metody pro jednotlivé látky byly připraveny roztoky o koncentraci 50 µg/ml. Do první Eppendorfovy zkumavky bylo odpipetováno vypočítané množství zásobního roztoku, ke kterému bylo přidáno 1,5 ml acetonu. Do druhé Eppendorfovy zkumavky byl vložen terčík, na který bylo odpipetováno stejné množství zásobního roztoku. Následně bylo do této zkumavky odpipetováno 1,5 ml acetonu, tak aby byl celý terčík ponořen. Tyto zkumavky byly vloženy na třepačku YellowLine, kde byla nastavena frekvence 1600 otáček za minutu, po dobu 2 minut. Z takto připraveného roztoku byl odpipetován 1 ml do nádoby, která byla následně vložena do systému EVATERM, aby mohl být tento roztok odpařen pod dusíkem. Během odpařování byl vzorek vyhříván na teplotu 40 °C, aby se rozpouštědlo odpařilo rychleji. K suchému vzorku se přidalo 30 µl pyridinu a 30 µl acetanhydridu. Poté se uzavřená nádoba dala na 45 min do sušárny, která byla nastavena na teplotu 90 °C. Po vychladnutí bylo ke vzorku napipetováno 0,5 ml ethylacetátu. Takto připravený derivát byl dávkován do plynového chromatografu. Deriváty byly 2x proměřeny v režimu SCAN a 2x v režimu SIM. Průměrné hodnoty ploch píků jsou uvedeny v tabulce 17 a 18. Z těchto hodnot byla spočítána výtěžnost, kdy se porovnávalo množství látky, které

zůstalo na terčíku. Měření derivátu pentaerytritolu a triethylenglykolu probíhalo na koloně RTx-TNT. Zbylé deriváty byly měřeny na koloně ZB-5HT inferno.

Tabulka 17: Výtěžnost metody měřené 2x v režimu SCAN. Průměrné hodnoty ploch píků z režimu TIC jsou uváděny se směrodatnou odchylkou.

	EG	DEG	PG	TEG	GLY	PENTA	DEGMBE
čistý roztok	13598721 ± 502779	19294127 ± 247286	8774116 ± 495263	12017 ± 451	24927086 ± 158352	42222 ± 6385	17766586 ± 7473416
roztok s terčíkem	2850224 ± 41740	15154345 ± 8624113	5771928 ± 16108	10504 ± 1543	21894400 ± 195242	32849 ± 2893	6360569 ± 36171
výtěžnost (%)	20,96	78,54	65,78	87,41	87,83	77,80	35,80

Tabulka 18: Výtěžnost metody měřené 2x v režimu SIM. Průměrné hodnoty ploch píků z režimu TIC jsou uváděny se směrodatnou odchylkou.

	EG	DEG	PG	TEG	GLY	PENTA	DEGMBE
čistý roztok	10084746 ± 74934	14192045 ± 153808	4184556 ± 7658	2304 ± 51	1370879 ± 235632	48865 ± 2666	4789234 ± 42986
roztok s terčíkem	2732395 ± 111537	11426027 ± 46260	6053706 ± 182611	1906 ± 22	12254448 ± 28082	34826 ± 1689	1338899 ± 102942
výtěžnost (%)	27,09	80,51	69,12	82,73	89,39	71,27	27,96

Z takto změřených hodnot vyplývá, že největší účinnost měla tato metoda pro glycerol, a to v obou režimech. Naopak nejnižší výtěžnost měla tato metoda pro ethylenglykol. Pokud by se porovnála výtěžnost v režimu SIM a SCAN tak u většiny látek je vyšší v režimu SIM.

Závěr

Hlavním cílem této diplomové práce bylo provést literární rešerši zaměřenou na stanovení glykolů a jiných vícesytných alkoholů pomocí plynové chromatografie. Dále nalézt vhodný způsob derivatizace a optimalizovat podmínky pro stanovení těchto látek pomocí této metody, aby měla metoda co nejvyšší citlivost.

Teoretická část je zaměřena na rešerši o stanovení vybraných látek. V experimentální části byly provedeny dva typy derivatizace, a to acetylace a silylace. Nejprve byla provedena optimalizace podmínek plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru, tak aby byl splitovací poměr co nejnižší (konkrétně 1:5) a tím se dosáhlo co nejnižšího limitu detekce po provedení derivatizace. U silylace se optimalizoval i způsob derivatizace, protože při samostatné derivatizaci se připravilo pouze 20 μl derivátu. Toto množství se nedá použít, pokud chceme vzorek dávkovat pomocí autosampleru, aby byla metoda reprodukovatelná. Z tohoto důvodu se derivát zředil 100 μl hexanu. Pro oba způsoby derivatizace byl jako rozpouštědlo zvolen aceton. Methanol se použil pouze u pentarytritolu, protože to bylo jediné rozpouštědlo, kde se tato pevná látka rozpustila. Obě metody derivatizace se použily i pro dioxan, ale bohužel se ho ani v jednom případě nepodařilo zderivatizovat.

Každá látka byla derivatizována a měřena zvlášť, aby byla data co nejpřesnější. Ze změřených dat se sestrojily kalibrační závislosti jednotlivých látek, a to pro metodu SIM a SCAN. Z dat vyplývá, že vyšší citlivost má acetylace a přesnější je obvykle měření v režimu SIM. Proto na ověření účinnosti byla zvolena, jako vhodnější metoda, acetylace. Z kalibračních závislostí se počítaly i relativní odchylky pro jednotlivé deriváty, aby se zjistila validita metody. Z těchto hodnot vyplývá, že ani jedna z těchto metod nemá velkou validaci. Tyto výsledky mohly být důsledkem toho, jak byly připravovány deriváty. Když byl roztok odpařen pod dusíkem tak se mohla stanovovaná látka rozptýlit po stěnách derivatizační nádoby a tyto zbytky pak nemusely být adekvátně zderivatizovány. Další snížení vzniklého derivátu mohlo vzniknout během zahřívání, kdy nemuselo být víčko pokaždé pořádně utaženo a látka se tak mohla odpařit.

Ověření metody na reálných vzorcích nebylo možné, protože se během měření změnil filament hmotnostního spektrometru. Dalším důvodem je měření na dvou přístrojích, protože se současně měřila jiná diplomová práce a bylo potřeba se na přístrojích prostřídat. Byla změřena alespoň účinnost této metody. Ze zásobního roztoku byl připraven roztok

o koncentraci 50 µg/ml, který se zderivatizoval a následně změřil. Stejně koncentrovaný roztok byl aplikován i na terčík, zderivatizován a změřen. Oba výsledky byly porovnány a dopočítala se účinnost metody pro jednotlivé látky. Nejúčinnější je metoda pro glycerol (v režimu SCAN 87,83 % a režimu SIM 89,39 %), naopak nejnižší účinnost měla pro ethylenglykol (v režimu SCAN 20,96 % a v režimu SIM 27,09 %).

Seznam literatury:

1. Forkner, M. W., Robson, J. H., Snellings, W. M., Martin, a. E., Murphy, F. H. and Parsons, T. E. (2000) 'Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology', *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 12, pp. 644–682. doi: 10.1002/0471238961
2. Al, E. T., Chan, K., Jensen, N. and Brien, P. J. O. (2008) 'Structure – activity relationships for thiol reactivity and rat or human hepatocyte toxicity induced by substituted p -benzoquinone compounds', *Journal of applied toxicology: JAT*, 28(October 2007), pp. 608–620. doi: 10.1002/jat
3. Sullivan, C. J., Kuenz, A. and Vorlop, K. (2018). Propanediols. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. doi:10.1002/14356007.a22_163.pub2
4. Christoph, R. , Schmidt, B. , Steinberner, U. , Dilla, W. and Karinen, R. (2006). Glycerol. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, (Ed.). doi:10.1002/14356007.a12_477.pub2
5. Gail, E., Gos, S., Kulzer, R., Lorösch, J., Rubo, A., Sauer, M., Kellens, R., Reddy, J., Steier, N. and Hasenpusch, W. (2012) 'Cyano Compounds, Inorganic', *Ullmanns Encyclopedia of Industrial chemistry*, (January), pp. 673–710. doi: 10.1002/14356007.a08
6. Dostupné z : <https://listserv.arb.ca.gov/consprod/regact/2010ra/degbe112345.pdf>
7. Hunter, W. N. (2000). Alcohols, Polyhydric. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, (Ed.). doi:10.1002/0471238961.0112031508211420.a01
8. Johnson, K. A., Baker, P. C., Kan, H. L., Maurissen, J. P., Spencer, P. J. and Marty, M. S. (2005) 'Diethylene glycol monobutyl ether (DGBE): Two- and thirteen-week oral toxicity studies in Fischer 344 rats', *Food and Chemical Toxicology*, 43(3), pp. 467–481. doi: 10.1016/j.fct.2004.12.003
9. Mallya, K., Mendis, T., & Guberman, A. (1986). Bilateral Facial Paralysis Following Ethylene Glycol Ingestion. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 13(4), 340-341. doi: 10.1017/S0317167100036702
10. Schep, L. J., Slaughter, R. J., Temple, W. A. and Beasley, D. M. G. (2009) 'Diethylene glycol poisoning', *Clinical Toxicology*, 47(6), pp. 525–535. doi: 10.1080/15563650903086444

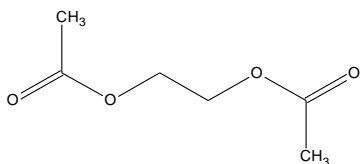
11. Zar, T., Graeber, C. and Perazella, M. A. (2007) 'Recognition, treatment, and prevention of propylene glycol toxicity', *Seminars in Dialysis*, 20(3), pp. 217–219. doi: 10.1111/j.1525-139X.2007.00280.x
12. Kano, H., Umeda, Y., Kasai, T., Sasaki, T., Matsumoto, M., Yamazaki, K., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S. (2009) 'Carcinogenicity studies of 1,4-dioxane administered in drinking-water to rats and mice for 2 years', *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier Ltd, 47(11), pp. 2776–2784. doi: 10.1016/j.fct.2009.08.012
13. Smyth Jr., H.F., Carpenter, C.P., 1948. Further experience with the range-finding test in the industrial toxicology laboratory. *Journal of Industrial Hygiene and Toxicology* 30, 63–68.
14. Kolomnikov, I. G., Efremov, A. M., Tikhomirova, T. I., Sorokina, N. M. and Zolotov, Y. A. (2018) 'Early stages in the history of gas chromatography', *Journal of Chromatography A*. Elsevier B.V., 1537, pp. 109–117. doi: 10.1016/j.chroma.2018.01.006
15. Martin, A.J.P, Synge, ., R.L.M. A new form of chromatogram employing two liquid phases. 1. A theory of chromatography, 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins, *Biochem. J.* 35 (1941) 1358–1368
16. Gremlich, H.-U. (2012) 'Infrared and Raman Spectroscopy', *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 21, pp. 85–138. doi: 10.1002/14356007.b05
17. Kurganov, A. (2013) 'Monolithic column in gas chromatography', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier B.V., 775, pp. 25–40. doi: 10.1016/j.aca.2013.02.039
18. Golay M. J. E. in D. Detsy (ed.) : *Gas Chromatography*, Butterworths, London 1958, p. 36.
19. Linscheid, M. (2001). Mass Spectrometry. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (Ed.). doi:10.1002/14356007.b05_515
20. Poole, C. F. (2015) 'Ionization-based detectors for gas chromatography', *Journal of Chromatography A*. Elsevier B.V., 1421, pp. 137–153. doi: 10.1016/j.chroma.2015.02.061
21. Kumirska, J., Plenis, A., Łukaszewicz, P., Caban, M., Migowska, N., Białk-Bielińska, A., Czerwicka, M. and Stepnowski, P. (2013) 'Chemometric optimization of derivatization reactions prior to gas chromatography-mass spectrometry analysis', *Journal of Chromatography A*, 1296, pp. 164–178. doi: 10.1016/j.chroma.2013.04.079

22. Schummer, C., Delhomme, O., Appenzeller, B. M. R., Wennig, R. and Millet, M. (2009) 'Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis', *Talanta*, 77(4), pp. 1473–1482. doi: 10.1016/j.talanta.2008.09.043
23. Röper, M. , Gehrler, E. , Narbeshuber, T. and Siegel, W. (2000). Acylation and Alkylation. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, (Ed.). doi:10.1002/14356007.a01_185
24. Ahuja, S. (1976) 'Derivatization in gas chromatography', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(2), pp. 163–182. doi: 10.1002/jps.2600650203
25. Saravanan, P. and Singh, V. K. (1999) 'An efficient method for acylation reactions', *Tetrahedron Letters*, 40(13), pp. 2611–2614. doi: 10.1016/S0040-4039(99)00229-4
26. Pape, P. G. (2017). Silylating Agents. In Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, John Wiley & Sons, Inc (Ed.). doi:10.1002/0471238961.1909122516011605.a01.pub3
27. Dasgupta, A., Blackwell, W., Griego, J., Malik, S., (1997) 'Gas chromatographic-mass spectrometric identification and quantitation of benzyl alcohol from human serum and postmortem blood after derivatization with 4-carbethoxy hexafluorobutyryl chloride: a novel derivative.', *Journal of forensic sciences*, 42(4), pp. 697–700. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9243835>
28. Meyer, M. R., Weber, A. A. and Maurer, H. H. (2011) 'A validated GC-MS procedure for fast, simple, and cost-effective quantification of glycols and GHB in human plasma and their identification in urine and plasma developed for emergency toxicology', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(2), pp. 411–414. doi: 10.1007/s00216-011-4760-6
29. Lau, B. P. Y. and Weber, D. (1987) 'Determination of Diethylene Glycol in Wines by High-Resolution Gas Chromatography/Mass Spectrometry', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(3), pp. 412–417. doi: 10.1021/jf00075a032
30. Ehlers, A., Morris, C., Krasowski, M. D. (2013) 'A rapid analysis of plasma / serum ethylene and propylene glycol by headspace gas chromatography', *SpringerPlus*, 2013, 203, doi: 10.1186/2193-1801-2-203
31. Shen, Y. and Xu, Z. (2013) 'An improved GC-MS method in determining glycerol in different types of biological samples', *Journal of Chromatography B: Analytical*

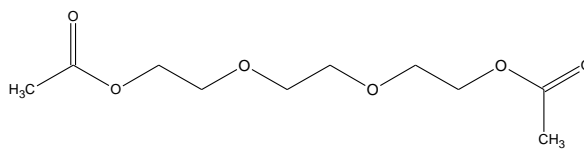
- Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. Elsevier B.V., 930, pp. 36–40. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.04.034
32. Isaacson, C., Mohr, T. K. G. and Field, J. A. (2006) ‘Quantitative determination of 1,4-dioxane and tetrahydrofuran in groundwater by solid phase extraction GC/MS/MS’, *Environmental Science and Technology*, 40(23), pp. 7305–7311. doi: 10.1021/es0615270
33. Shin, H. S. and Lim, H. H. (2011) ‘Determination of 1,4-dioxane in water by isotopic dilution headspace GC-MS’, *Chromatographia*, 73(11–12), pp. 1233–1236. doi: 10.1007/s10337-011-2031-5
34. Suchanec, R. R. (1965) ‘Gas Chromatographic Separation and Determination of Pentaerythritol System by Trimethylsilyl Ether Derivatives.’, *Analytical Chemistry*, 37(11), pp. 1361–1365. doi: 10.1021/ac60230a019
35. Challinor, J. M. (1989) ‘A pyrolysis-derivatisation-gas chromatography technique for the structural elucidation of some synthetic polymers’, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 16(4), pp. 323–333. doi: 10.1016/0165-2370(89)80015-4.
36. Sulej-Suchomska, A. M., Polkowska, Z., Kokot, Z. J., de la Guardia, M. and Namieśnik, J. (2016) ‘Determination of antifreeze substances in the airport runoff waters by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry method’, *Microchemical Journal*, 126, pp. 466–473. doi: 10.1016/j.microc.2016.01.003
37. Maurer, H. H., Peters, F. T., Paul, L. D. and Kraemer, T. (2001) ‘Validated gas chromatographic-mass spectrometric assay for determination of the antifreezes ethylene glycol and diethylene glycol in human plasma after microwave-assisted pivalylation’, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 754(2), pp. 401–409. doi: 10.1016/S0378-4347(01)00022-6
38. Vollmer P.A., Harty D.C., Erickson N.B., Balhon A.C, Dean R.A.(1996) Serum ethylene glycol by high-performance liquid chromatography *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, ISSN: 0378-4347, Vol: 685, Issue: 2, Page: 370-74 doi: org/10.1016/S0378-4347(96)00173-9

Přílohy:

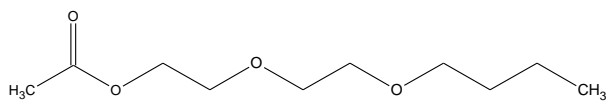
Příloha A: a) ethylenglykol diacetát, b) triethylenglykol diacetát, c) diethylenglykol monobutyl ether acetát, d) diethylenglykol diacetát, e) glycerol triacetát, f) pentaerytritol tetraacetát, g) Propylenglykol diacetát



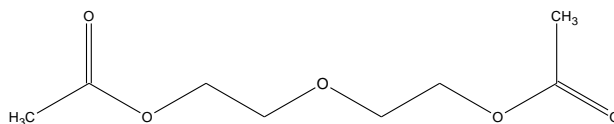
a)



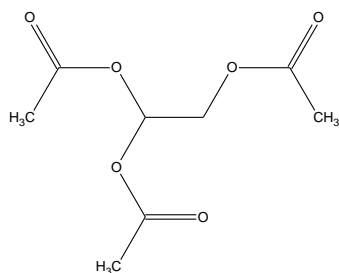
b)



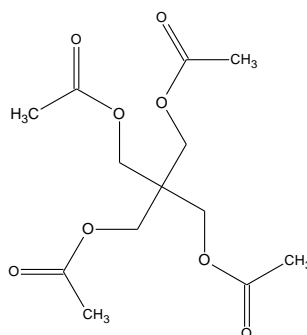
c)



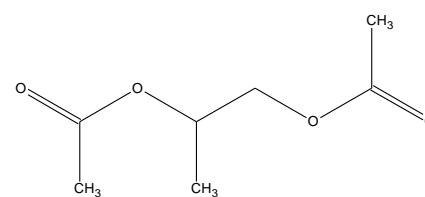
d)



e)

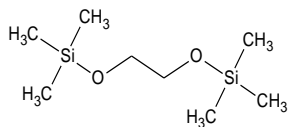


f)

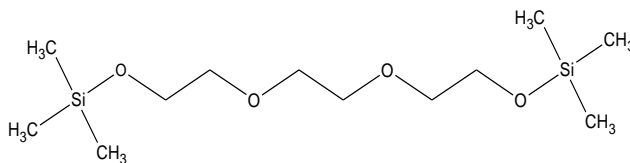


g)

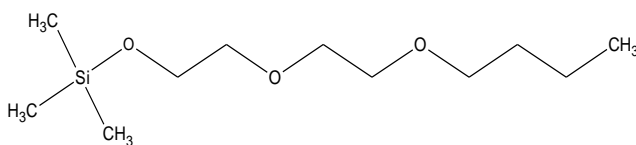
Příloha B: a) ethylenglykol bistrimethylsilyl ether, b) triethylenglykol 2 TMS derivát, c) diethylenglykol monobutyl ether trimethylsilyl ether, d) diethylenglykol bistrimethylsilyl ether, e) glycerol tris(trimethyl) ether, f) pentaerytritol TMS, g) 1,2-Propylenglykol bistrimethylsilyl ether



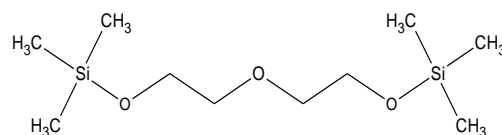
a)



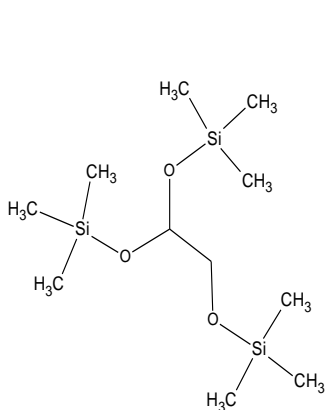
b)



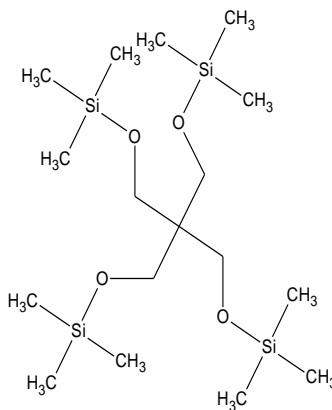
c)



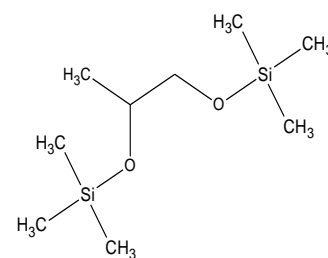
d)



e)

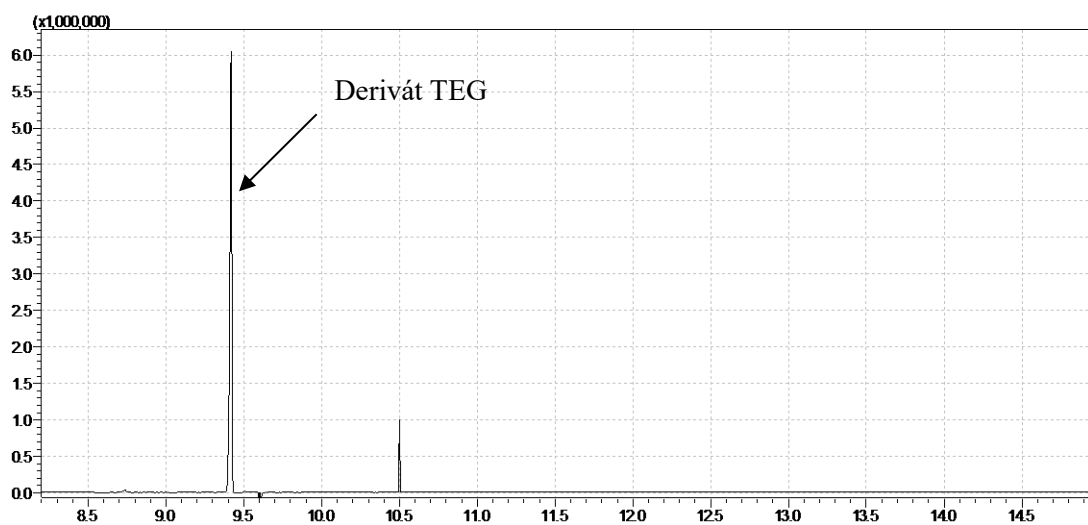


f)

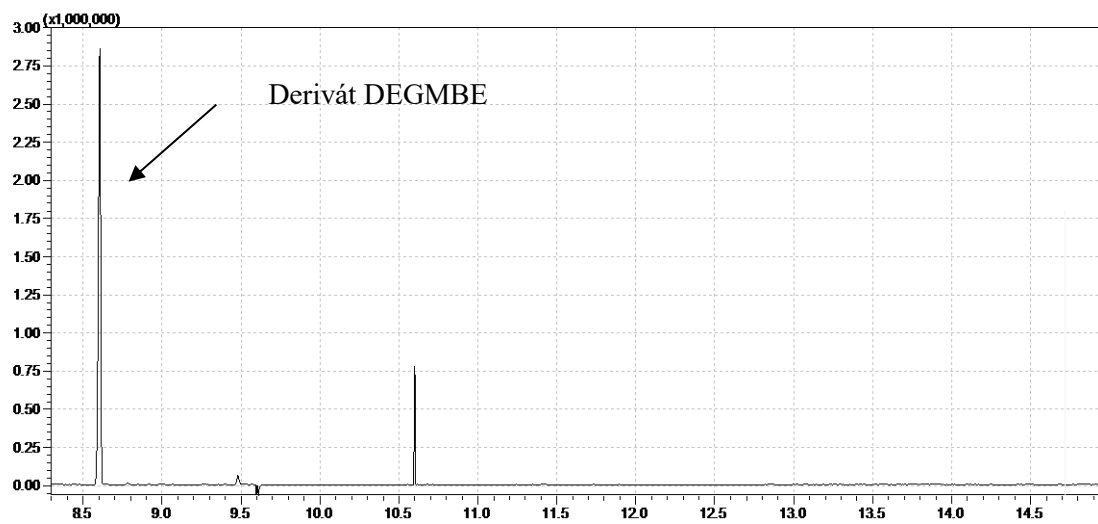


g)

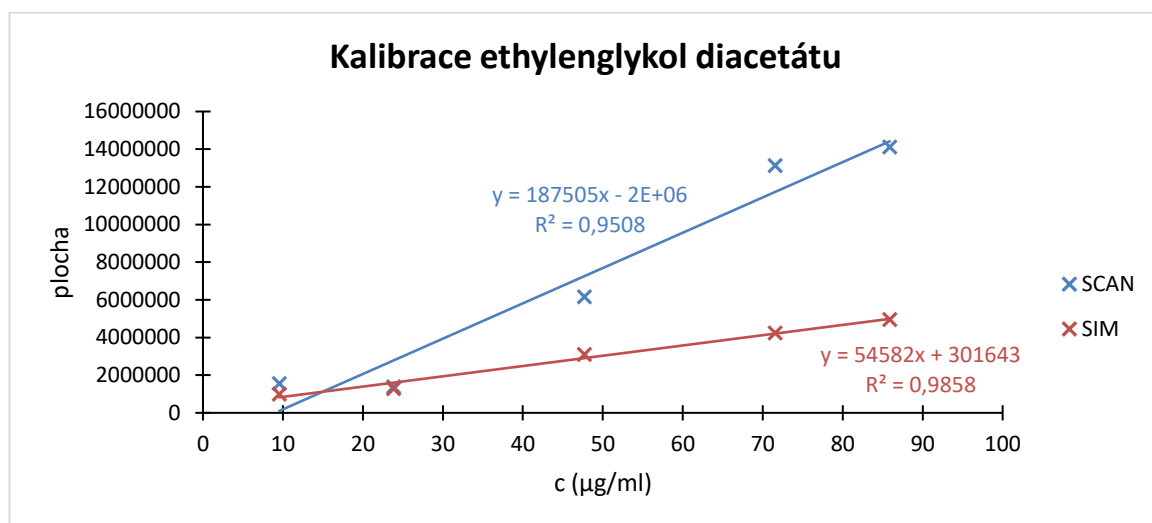
Příloha C: Derivát triethylglykolu měřený v režimu SCAN, splitovací poměr 1:5, koncentrace 90 µg/ml



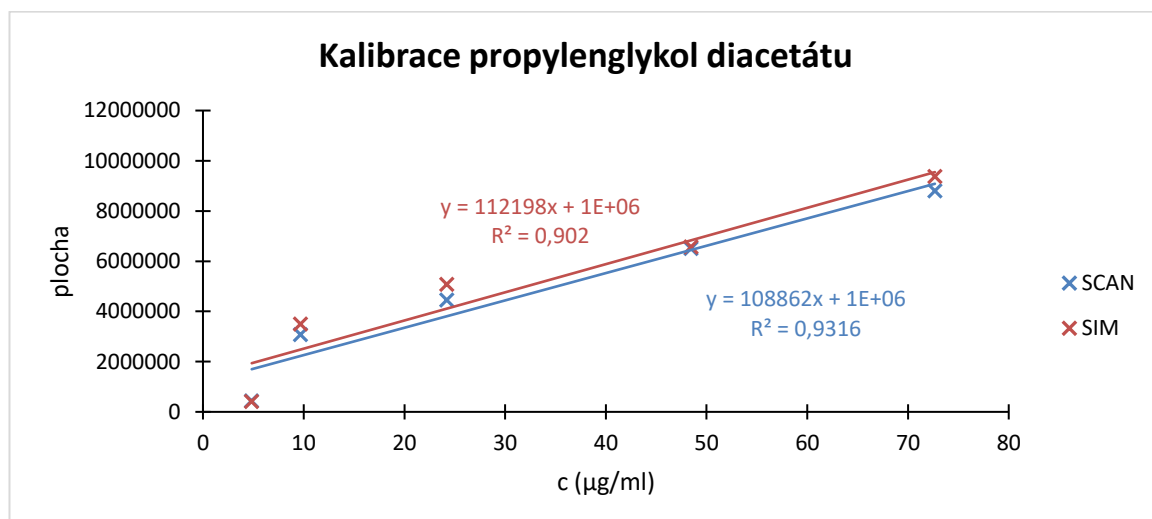
Příloha D: Derivát DEGMBE. Měřeno v režimu SCAN, splitovací poměr 1:5, koncentrace 150 µg/ml



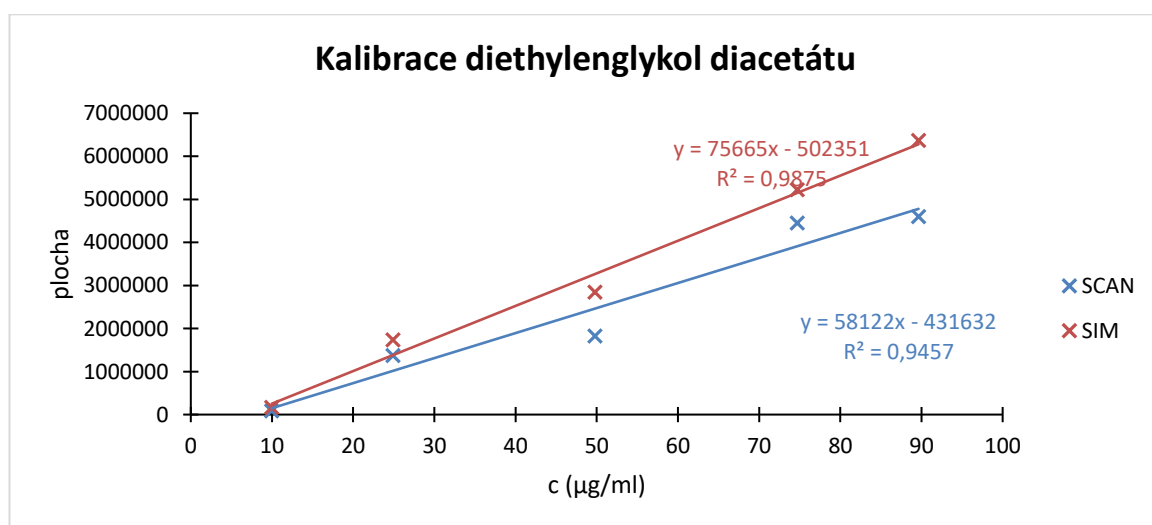
Příloha E: Kalibrace derivátu ethylenglykolu



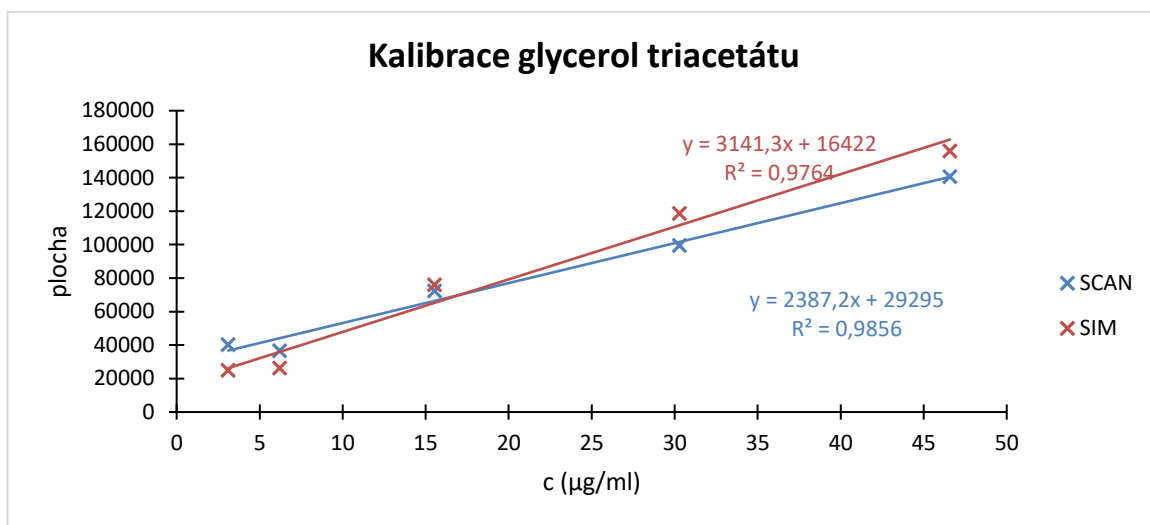
Příloha F: Kalibrace derivátu propylenglykolu



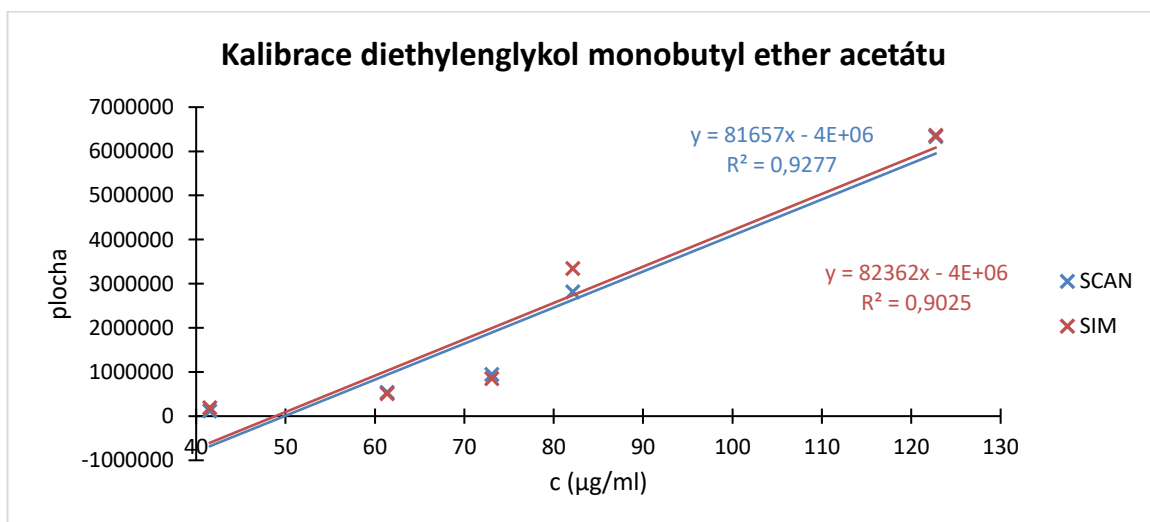
Příloha G: Kalibrace derivátu diethylenglykolu



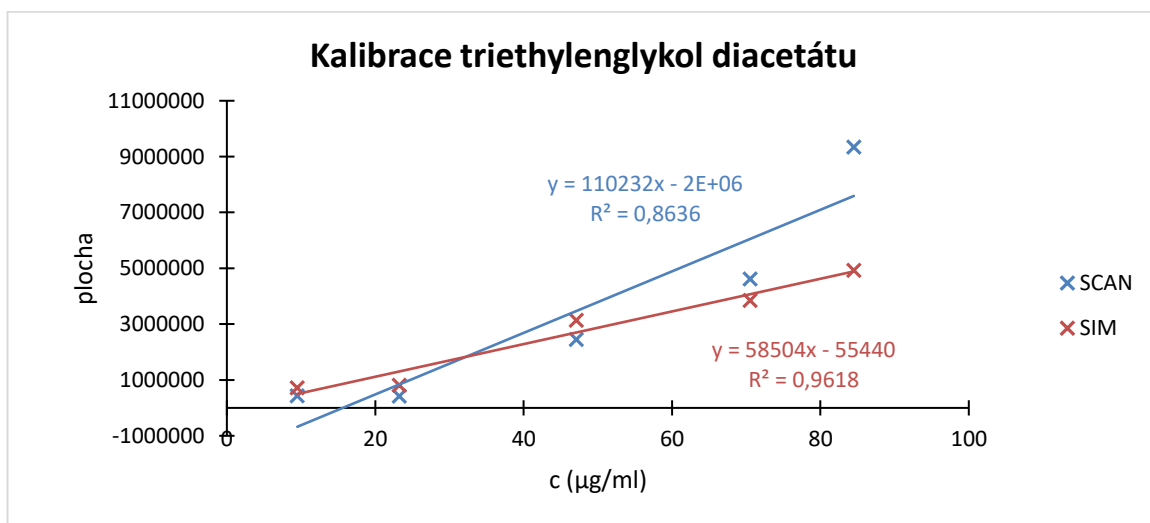
Příloha H: Kalibrace derivátu glycerolu



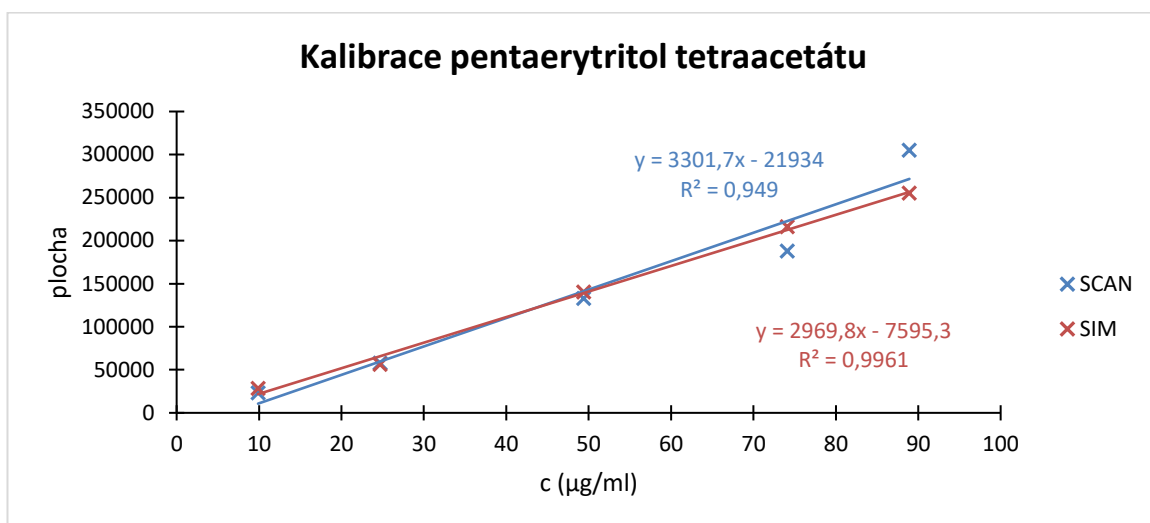
Příloha I: Kalibrace derivátu DEGMBE



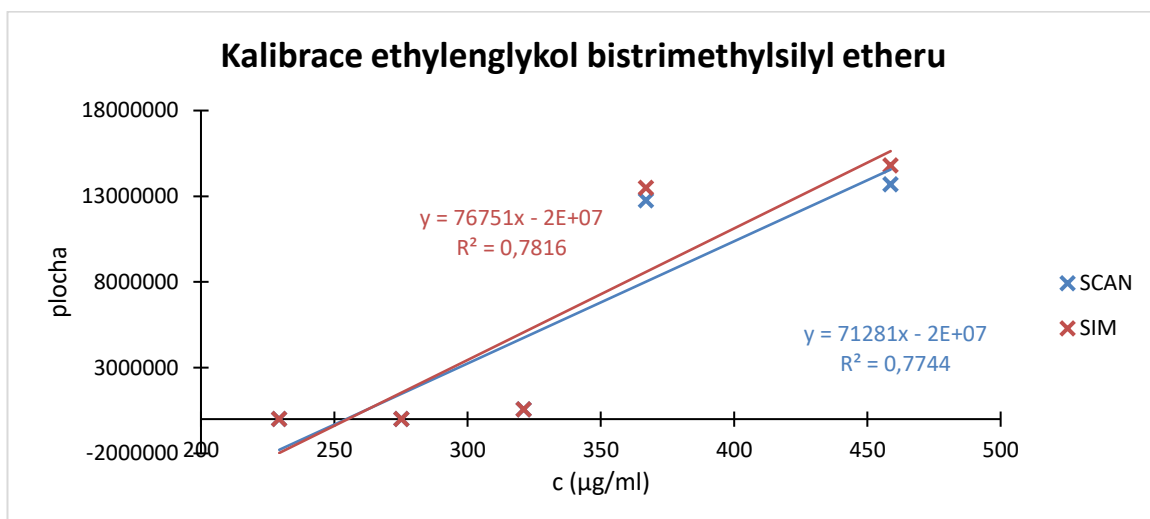
Příloha J: Kalibrace derivátu triethylenglykolu



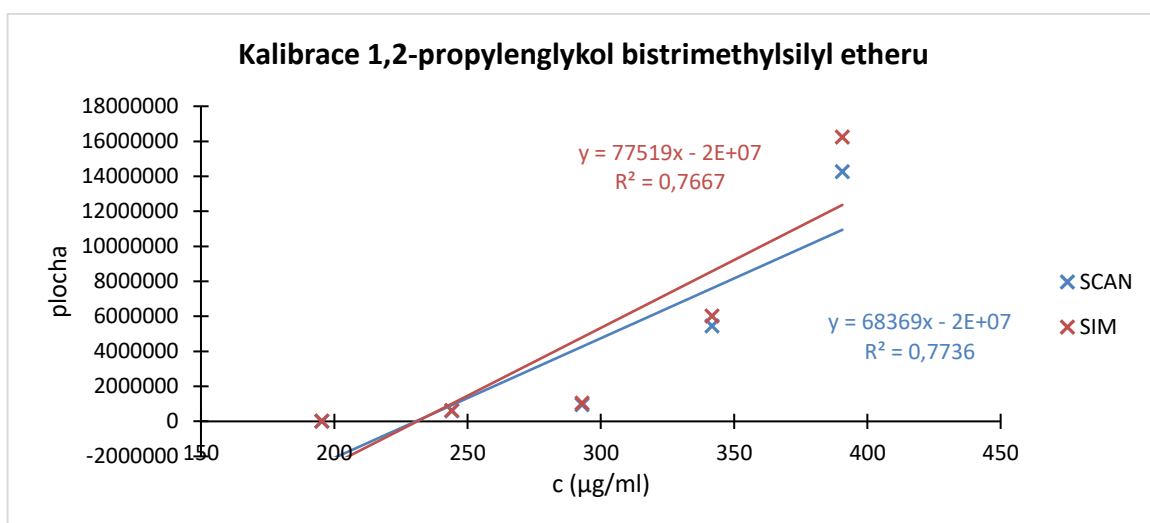
Příloha K: Kalibrace derivátu pentaerytritolu



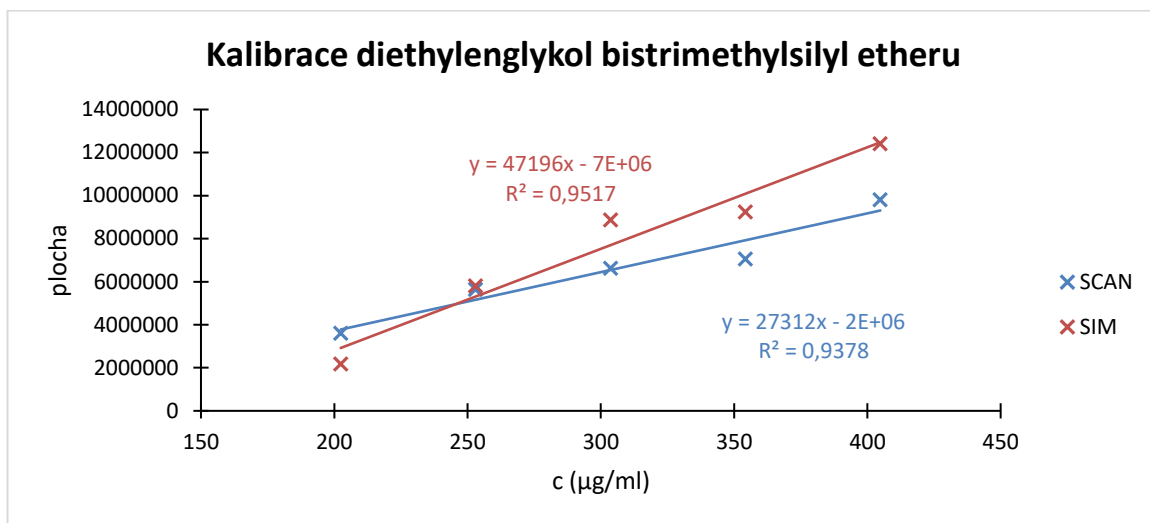
Příloha L: Kalibrace derivátu ethylenglykolu



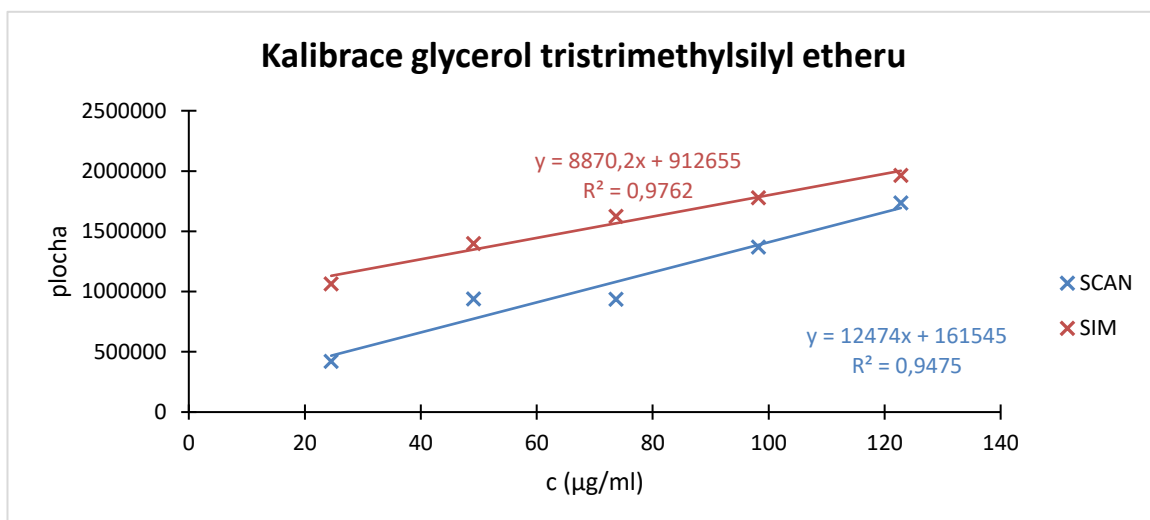
Příloha M: Kalibrace derivátu propylenglykolu



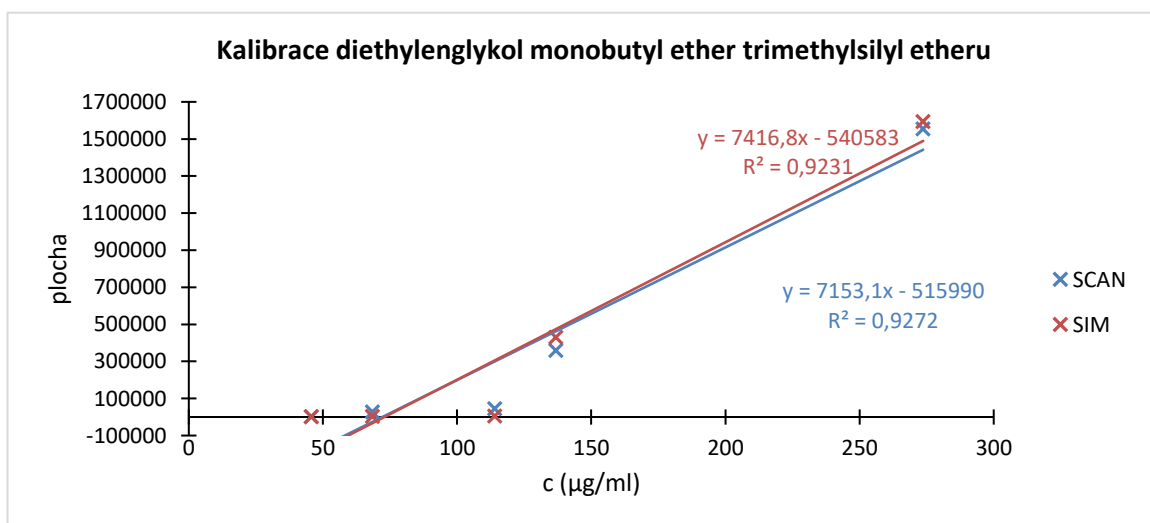
Příloha N: Kalibrace derivátu diethylenglykolu



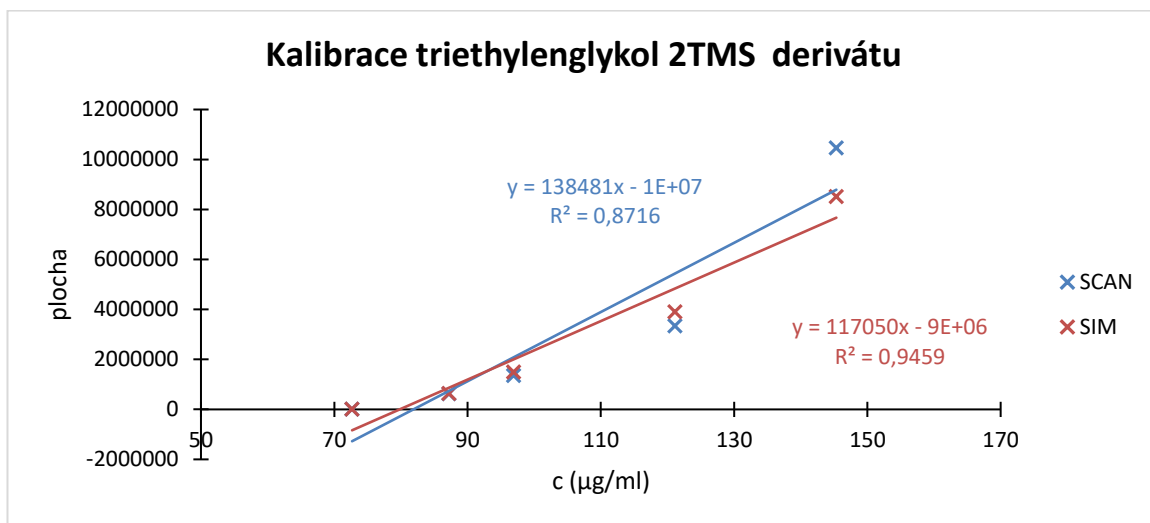
Příloha O: Kalibrace derivátu glycerolu



Příloha P: Kalibrace derivátu DEGMBE



Příloha Q: Kalibrace derivátu triethylenglykolu



Příloha R: Kalibrace derivátu pentaerytritolu

