

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení glykolů pomocí HPLC
Tomáš Marek

Bakalářská práce
2018

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tomáš Marek**
Osobní číslo: **C15050**
Studijní program: **B2802 Chemie a technická chemie**
Studijní obor: **Chemie a technická chemie**
Název tématu: **Stanovení glykolů pomocí HPLC**
Zadávací 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 zabývající se analytickým stanovením glykolů. Zaměřte se na stanovení pomocí HPLC. Pozornost věnujte i jejich případné derivatizaci pro zvýšení citlivosti.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Aleš Eisner, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce:

doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

20. února 2018


Termín odevzdání bakalářské práce:

4. července 2018



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

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

Byl jsem seznámen 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 24. 6. 2018

Tomáš Marek

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat vedoucímu své bakalářské práce, panu Ing. Alešovi Eisnerovy, Ph.D. za odborné vedení mé práce a cenné rady, které mi pomohly při zpracování této práce.

Dále bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům, kteří při mém studiu záměrně stály a jakýmkoliv způsobem mě při něm podporovali. Speciální poděkování si ode mě zaslouží můj kolega Jaroslav Pochobradský, za jeho cenné technické rady, které jsem využil při zpracování této práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením glykolů pomocí HPLC s různými detektory a u různých druhů vzorků. Budou zde uvedeny dosažené výsledky a možné aplikace jednotlivých metod. Některé metody, které využívají derivatizační krok, budou více popsány, hlavně z pohledu zmiňované derivatizace.

KLÍČOVÁ SLOVA

HPLC, derivatizace, glykoly.

TITLE

Determination of glycols by HPLC.

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the theoretical determination of glycols in various conditions and with different types of samples. Here you will find the results achieved and possible applications of the individual methods. Some methods that utilize the derivatization step will be more fully described, mainly from the point of view of the derivatization mentioned.

KEYWORDS

HPLC, derivatization, glycols.

OBSAH

Seznam obrázků	9
Seznam zkratk	11
Úvod	12
1 Teoretická část	13
1.1 Základní popis vysokoúčinné kapalinové chromatografie	13
1.2 Stanovení diethylglykolu a propylglykolu v léčivech pomocí UV detekce..	14
1.3 Stanovení diethylglykolu v zubní pastě pomocí fluorescenční detekce	16
1.4 Stanovení stopového množství směsi glykolu pomocí UV detekce s následnou hmotností detekcí	18
1.5 Stanovení dinitrátu ethylglykolu v dynamitu po jeho extrakci a následné detekci pomocí UV detekce	20
1.6 Stanovení polyethylglykolu ve vodě pomocí HPLC s obracenými fázemi a UV detekcí	21
1.7 Stanovení diethylglykolu ve víně s detekcí pomocí diferenciálního refraktometru	22
1.8 Stanovení fenoxylethanolu ve směsi s dalšími látkami	23
1.9 Stanovení zbytkového množství ethylglykolu ve zdravotních potřebách sterilizovaných oxiranem pomocí ESI-MS	24
1.10 Stanovení 3,4-dihydroxyfenylglykolu, hydroxytyrosolu a tyrosolu pomocí UV- Vis detekce	25
1.11 Využití metody HPLC pro stanovení dvou izomerů thyminglykolu v oligodeoxynukleotidu	26
1.12 Současné stanovení styren glykolu spolu s kyselinami	27
1.13 Stanovení diethylglykolu a propylglykolu s refraktometrickým detektorem	28
1.14 Stanovení diethylglykolu ve znečištěných mořských vodách pomocí ESI-MS	28
1.15 Identifikace cis a trans isomerů 2-buten-1,4-diolu pomocí detekce UV-Vis	29
1.16 Stanovení bronopolu a produktů jeho rozkladu za detekce pomocí UV-Vis detekce	30

2	Závěr	32
	Použitá literatura	33

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Základní schéma HPLC analýzy	13
Obrázek 2 - Závislost plochy píků na teplotě ^[3]	15
Obrázek 3 - Závislost plochy píků na čase ^[3]	15
Obrázek 4 - Závislost plochy píků na koncentraci TSIC ^[3]	15
Obrázek 5 - Výsledné chromatogramy, Armillarisinu A (C), Armillarisinu B (D), paracetomalového sirupu (E) a sirupu proti kašli (F), pík I značí derivát DEG a pík II značí derivát 1,2-PG ^[3]	16
Obrázek 6 - Účinnost derivatizačních rozpouštědel, dichlormethan (a), chloroform (b), acetonitril (c), toluen (d), aceton (e), dimethyl formamid (f) a dimethyl sulfoxid (g) ^[4]	17
Obrázek 7 - Závislost plochy píků na teplotě ^[4]	17
Obrázek 8 - Závislost plochy píků na čase ^[4]	17
Obrázek 9 - Výsledné chromatogramy, (A) bez použití derivatizace a (B) za použití derivatizace, pík 1 značí PIAA a pík 2 značí derivát DEG ^[4]	18
Obrázek 10 - Výsledný chromatogram s UV detekcí, retenční časy jsou 7.74 EG, 9.00 vnitřní standard, 9.70 1,3-PG, 10.36 1,2-PG a 13.04 2,3-BG ^[5]	19
Obrázek 11 - Výsledný chromatogram s ESI-MS ^[5]	20
Obrázek 12 - Výsledné chromatogramy po vodné extrakci (1) a methanolové extrakci (2), píky značí EGDN (a), dusičnan amonný (h), dibutyl ftalát (i) a neznámý pík (*) ^[7]	21
Obrázek 13 - Výsledný chromatogram ionizovaného vzorku [8]	22
Obrázek 14 - Výsledné chromatogramy (A) standardní směs běžných komponent vína (1-glukóza, 2-fruktóza, 3-glycerol, 4-kyselina octová, 5-butylenglykol a 6-ethanol), (B) čistého vína a (C) vína s přidáním DEG	23
Obrázek 15 - Výsledný chromatogram směsi glykolů a alkoholů ^[11]	24
Obrázek 16 - ESI-MS spektrum EG ^[12]	25
Obrázek 17 - Výsledný chromatogram, (A) plazma, (B) slepý vzorek tkáně bez fenolu a (C) vzorek tkáně, píky značí 1-DHPG, 2-HT a 3-TY ^[15]	26
Obrázek 18 - Výsledné chromatogramy oxidace oligodeoxynukleotidů ^[16]	27
Obrázek 19 - Výsledný chromatogram upraveného vzorku s přidáním kyselinami, 1-kys. fenyglyoxalová, 2-kys. mandlová, 3-styren glykol a 4-kys. hippurová ^[18]	27
Obrázek 20 - Výsledný chromatogram uměle vytvořeného laboratorního kalu ^[19]	28
Obrázek 21 - Výsledný chromatogram mořské vody s přidáním DEG, 1-derivát DEG a 2-vnitřní standard ^[20]	29

Obrázek 22 - Výsledný chromatogram identifikovaných isomerů BEG ^[22]	30
Obrázek 23 - Výsledný chromatogram standardu bronopolu, píky značí (1) 2-bromethanol, (2) bromnitromethan, (3) bronopol a (4) broomnitroethanol ^[28]	31

SEZNAM ZKRATEK

BA	Benzylalkohol
BEG	2-buten-1,4-diol
2,3-BG	2,3-butylenglykol
BH	Butyl hydroxybenzoát
DEG	Diethylenglykol
DHPG	3,4-dihydroxyfenolglykol
EG	Ethylenglykol
EGDN	Dinitrát ethylenglykolu
EGPE	Fenoxyethanol
EH	Ethyl hydroxybenzoát
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (angl. high-performance liquid chromatography)
HT	Hydroxytyrosol
MH	Methyl hydroxybenzoát
PEG	Polyethylen glykol
1,2-PG	1,2-propylenglykol
1,3-PG	1,3-propylenglykol
PH	Propyl hydroxybenzoát
PIAA	N-(2-fenyl-indolyl)-octové kyseliny
TSIC	p-toluensulfonyl isokyanát
TY	Tyrosol

ÚVOD

Glykoly, nebo také dioly, jsou běžnou užívanou skupinou látek v oblasti laboratorních chemikálií tak i v chemickém průmyslu. Své největší využití nacházejí glykoly, jako součást nemrznoucích kapalin do automobilových prostředků. ^[1]

Jedná se o chemické látky, které obsahují ve své molekule dvě hydroxylové skupiny. Jednotlivé glykoly se liší ve svých fyzikálně-chemických vlastnostech, jako jsou například hustota, teplota varu atd.

Cílem této práce je pospat stanovení několika zástupců ze skupiny glykolů pomocí HPLC. Budou popsány metody, které stanovují glykoly v jejich směsi s dalšími zástupci této skupiny, ale také stanovení jednoho určitého glykolu ve směsi s dalšími různorodými látkami.

Také budou popsány metody, které nepotřebují žádnou předešlou úpravu vzorků a zároveň také stanovení, které využívají předúpravu vzorku metodou derivatizace.

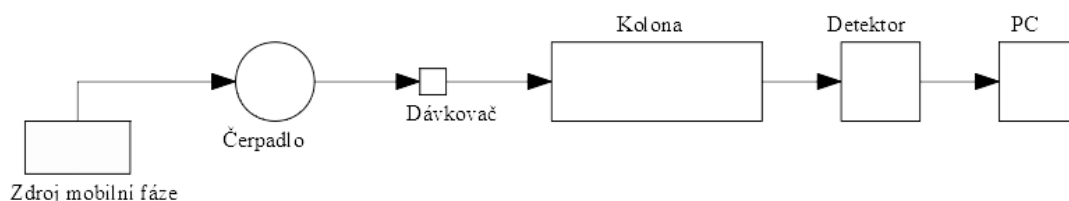
1 Teoretická část

1.1 Základní popis vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Je známo, že kapalinová chromatografie využívá mnohonásobně opakovaného procesu, v němž se stanovovaná látka distribuuje mezi kapalnou mobilní fází a většinou tuhous stacionární fází. V průběhu procesu dochází k migraci stanovované látky různou rychlostí ve směru mobilní fáze a při průchodu chromatografickou kolonou dochází k její separaci.

Jednou z nejrozšířenějších metod kapalinové chromatografie je tzv. vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Komerčně byla tato technika dostupná až v 80. letech minulého století, a to proto, že se nejdříve musely vyřešit problémy s dávkováním malých množství stanovovaných vzorků. Také musely být vyvinuty nové typy stacionárních fází s malými průměry částic a definovanými vlastnostmi. Poté co byly vyřešeny tyto problémy, následoval prudký rozmach ve výzkumu teoretických základů kapalinové chromatografie a její využití v praxi.

V dnešní době je HPLC jednou z nejvyužívanějších technik pro analýzu velmi širokého spektra látek, a to od jednoduchých molekul, přes bílkoviny a peptidy, až po polymerní sloučeniny. Základní schéma HPLC je ukázán na obrázku č. 1.



Obrázek 1 - Základní schéma HPLC analýzy

Základ kapalinového chromatografu tvoří chromatografická kolona naplněná vhodnou stacionární fází. Různé podoby kolon se mohou lišit svojí velikostí a délkou. Platí ale, že kvůli malé distribuci částic, jíž protéká mobilní fáze, je nutné pomocí vysokotlakých čerpadel čerpat mobilní fázi za tlaků, které mohou dosahovat až 30 MPa.

Částice stacionární fáze jsou bázi silikagelu, oxidu hlinitého, oxidu zirkoničitého, uhlíku anebo organických polymerů. Tato matrice je vyráběna tak, aby se vytvořil velmi velký povrch řádově ve stovkách m^2 na 1 g.

Na tuto matrici je pak navázaná vlastní stacionární fáze. Jedná se o látky s různou polaritou od nepolárních stacionárních fází až po stacionární fáze s iontovými skupinami. Dnes se většinou používá stacionární fáze navázaná přes kovalentní vazbu. Volbou vhodné funkční

skupiny reagujícího silanizačního činidla lze pak vyrobit různorodé typy stacionárních fází, která pak mohou separovat látky na základě různých mechanismů, jako například Van der Waalsovy síly, dipól-dipólové, proton akceptorové anebo proton donorové.

Je-li stacionární fáze polárnější než fáze mobilní, mluvíme pak o systémech s normálními fázemi. Je-li tomu ale naopak (stacionární fáze je méně polární než fáze mobilní), pak mluvíme o systémech s obrácenými fázemi.

Další nedílnou složkou kapalinového chromatografu je zařízení, které umožňuje zavádění stanovovaného vzorku do toku mobilní fáze. Toto zařízení musí být dobře zkonstruované, neboť je důležité aby, umožňoval reprodukovatelné zavádění malého množství vzorku (většinou kolem 20 μ l), při tlacích které mohou dosahovat až 30 MPa.

Mobilní fáze, která vytéká z kolony a obsahuje rozseparované látky ze vzorku, je následně vedena do detektoru, kde se na základě různých fyzikálně-chemických principů detekují jednotlivé látky. Tyto principy mohou být založeny na měření optických vlastností (UV/VIS záření, fluorescence anebo index lomu), na záznamu hmotnostních spekter anebo také na elektrochemických vlastnostech (jako je třeba vodivost). Hlavní požadavky, které musí splňovat detektor, jsou například malý objem detekční cely a vysoká rychlost odezvy.

Jako záznam pak dostáváme závislost měřeného signálu na čase a tento záznam se nazývá chromatogram. Z poloh maxima píků, které jsou charakteristické pro určitou strukturu látek, pak můžeme tyto látky identifikovat ve vzorku. Z ploch jednotlivých píků pak lze vyhodnotit kvantitativní údaje. ^[2]

1.2 Stanovení diethylenglykolu a propylenglykolu v léčivech pomocí UV detekce

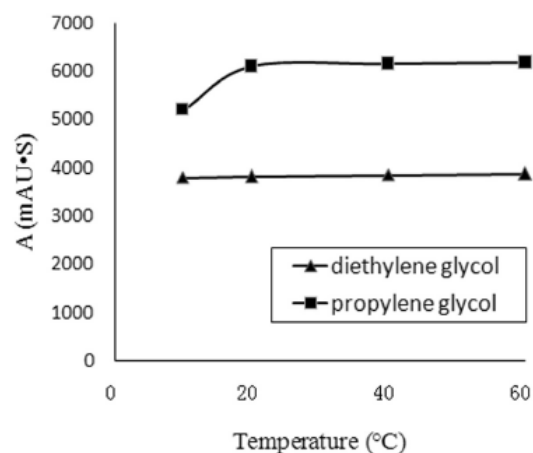
Diethylenglykol (DEG) a 1,2-propylenglykol (1,2-PG) byly analyzovány v léčivech pomocí nového derivatizačního činidla p-toluensulfonyl isokyanátu (TSIC). Tyto glykoly byly analyzovány u dvou druhů léčiva *Armillarisinu* (A a B), paracetamolového sirupu (ve kterém je 1,2-PG přítomen jako pomocná látka) a v sirupu proti kašli (který neobsahoval 1,2-PG). ^[3]

TSIC je látka s velmi silnými nukleofilními vlastnostmi a její reakce s hydroxy skupinami glykolů jsou velmi rychlé. Derivatizační reakce pak poskytuje estery TSIC, které jsou vhodné pro chromatografické stanovení v UV oblasti.

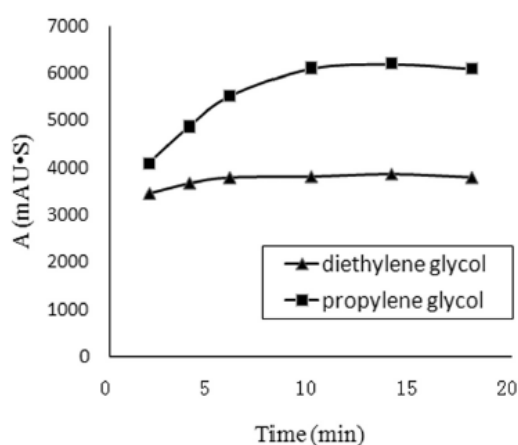
Nejvýznamnějšími parametry, které ovlivňují derivatizaci glykolů jsou teplota, čas a koncentrace TSIC. Pro získání dat závislosti plochy píků na teplotě, byla připravena řada roztoků, kdy TSIC byl přidán do standardních roztoků DEG nebo 1,2-PG ve zkumavkách. Ty pak byly dány do třepačky a poté třepány 10 minut při různých teplotách. Po přidání vody byly roztoky chromatograficky analyzovány a výsledné záznamy ukazovaly, že míra derivatizace roste při teplotách okolo 10 až 20 °C a při větších teplotách se množství vzniklého derivátu nadále nemění. Získané výsledky jsou zobrazeny na obrázku č. 2.

Pro získání dat závislosti plochy píků na čase, byla opět připravena řada roztoků, které byly upraveny stejně jako v předchozím případě. Tentokrát se však roztoky nechaly po promíchání různou dobu stát při stejné teplotě (20 °C). Následně se roztoky chromatograficky analyzovaly a výsledné záznamy ukazovaly, že při teplotě 20 °C je potřebná doba pro dobrou míru derivatizace kolem 10 minut. Získané výsledky jsou zobrazeny na obrázku č. 3.

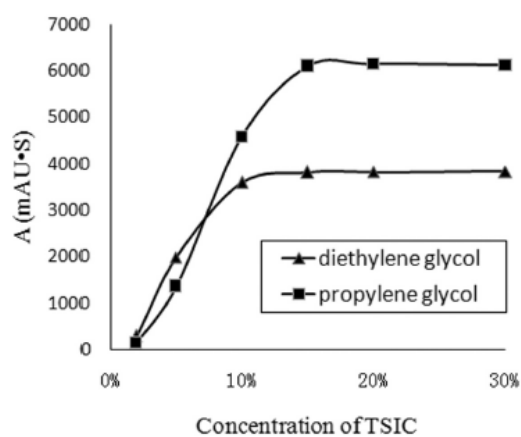
Pro získání dat závislosti plochy píků na koncentraci TSIC, byla připravena řada roztoků o koncentracích 2, 5, 10, 15, 20 a 30% (obj.) TSIC. Ty byly upraveny stejně jako v předchozích případech. Po promíchání byly ponechány 10 minut při teplotě 20 °C. Po chromatografické analýze výsledné záznamy ukazovaly, že při teplotě 20 °C dostatečná koncentrace pro dokončení derivatizace byla 15% TSIC. Získané výsledky jsou zobrazeny na obrázku č. 4.



Obrázek 2 - Závislost plochy píků na teplotě ^[3]

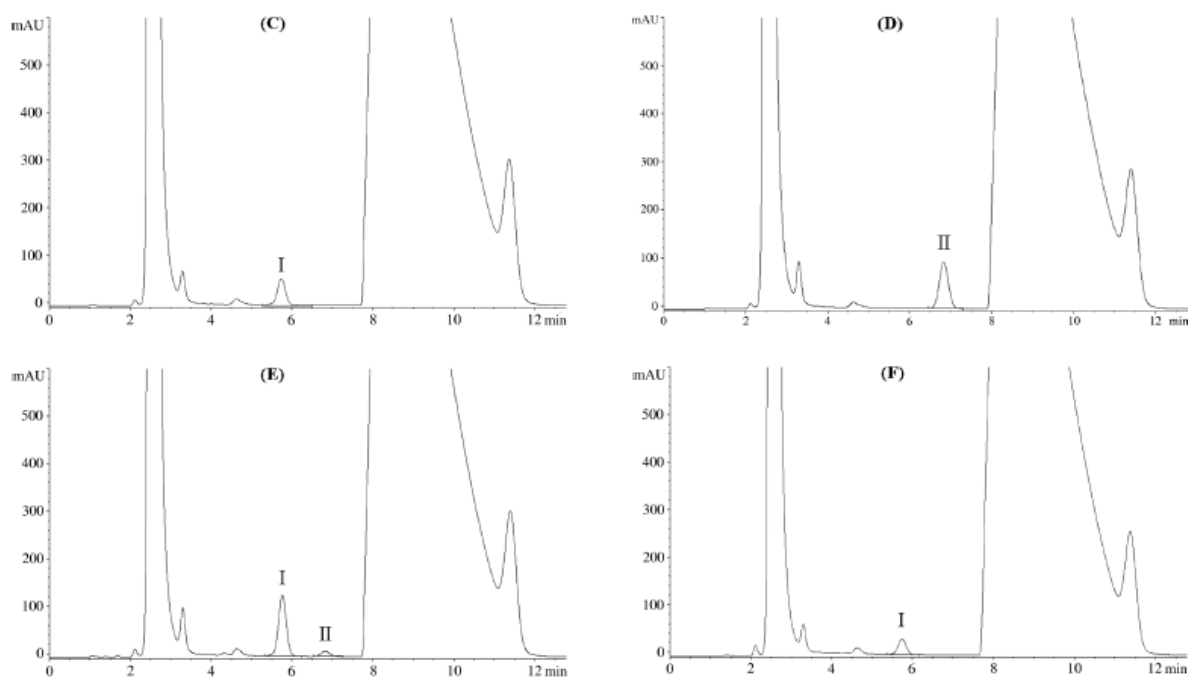


Obrázek 3 - Závislost plochy píků na čase ^[3]



Obrázek 4 - Závislost plochy píků na koncentraci TSIC ^[3]

Analýza byla dokončena po 12,8 minutách a výsledné záznamy analýzy Armillarisinu A a B, paracetamolového sirupu a sirupu proti kašli, jsou uvedeny na obrázku č. 5.



Obrázek 5 - Výsledné chromatogramy, Armillarisinu A (C), Armillarisinu B (D), paracetamolového sirupu (E) a sirupu proti kašli (F), pík I značí derivát DEG a pík II značí derivát 1,2-PG^[3]

Po vyhodnocení píků a optimalizaci reakčních podmínek pro lepší zreagování složek při derivatizaci, lze říci, že metoda HPLC s derivatizací pomocí TSIC je vhodná pro kvantitativní a kvalitativní stanovení obou forem Armillarisinu, paracetamolového sirupu a sirupu proti kašli. Výhodou je i to že produkty derivatizace jsou stále alespoň po dobu 3 dnů.^[3]

1.3 Stanovení diethylenglykolu v zubní pastě pomocí fluorescenční detekce

DEG byl stanoven v komerčně dostupné zubní pastě, za využití syntetizovaného derivatizačního činidla N-(2-fenyl-indolyl)-octové kyseliny (PIAA).^[4]

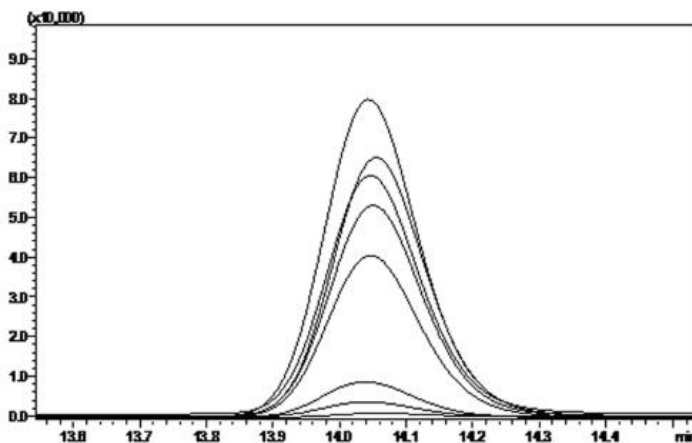
DEG má dvě hydroxy skupiny, takže teoreticky jedna molekula DEG by mohla reagovat se dvěma molekulami PIAA. Pro získání přesných údajů o průběhu derivatizace bylo změřeno hmotnostní spektrum získané pomocí ESI-MS v pozitivním módu. Základní pík by měl být přisuzován k iontu $[M+H]^+$ s m/z 340. Pokud by ale jedna molekula DEG reagovala se dvěma molekulami PIAA, výsledná molekulární hmotnost produktu by měla být 572. Následně bylo zjištěno z hmotnostního spektra, že takový derivát neexistuje.

To naznačuje, že pouze jedna molekula DEG může reagovat pouze s jednou molekulou PIAA. Což je pravděpodobně způsobeno tím, že molekula DEG je krátká a po navázání na PIAA, nemůže být další molekula DEG navázaná kvůli sterickým efektům fenylové skupiny.

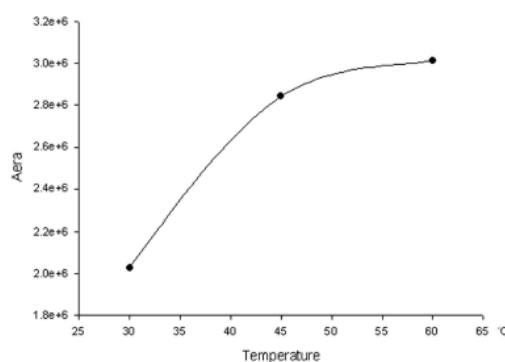
Pro co nejvyšší možnou účinnost derivatizace bylo prozkoumáno několik derivatizačních rozpouštědel (acetonitril, aceton, chloroform, dichlormethan, dimethyl sulfoxid, N,N'-dimethyl formamid a toluen). Výsledky jsou uvedené na obrázku č.6, ze kterého je zřejmé, že dichlormethan poskytoval nejlepší výsledky. Nižší účinnost pak poskytoval chloroform a acetonitril, zatímco dimethyl sulfoxid poskytoval nehorší výsledky. Z toho by bylo zřejmé, že by se mohly použít právě dichlormethan a chloroform, ale nevýhodou je jejich těkavost, která je nepříznivá pro kvantitativní analýzu. A tak se pro analýzu využil právě acetonitril, který navíc umožňuje analyzovat derivatizační směs hned po reakci.

Co se týče teploty, mělo by platit pravidlo, že čím bude teplota reakce vyšší, tím většího výtěžku se dosáhne. Z obrázku č. 7, je patrné, že toto pravidlo lze aplikovat i na derivatizaci. Nutné je si ale uvědomit že acetonitril je těkavý při vyšších teplotách, a tak se pro derivatizaci použilo právě optimálních 60 °C.

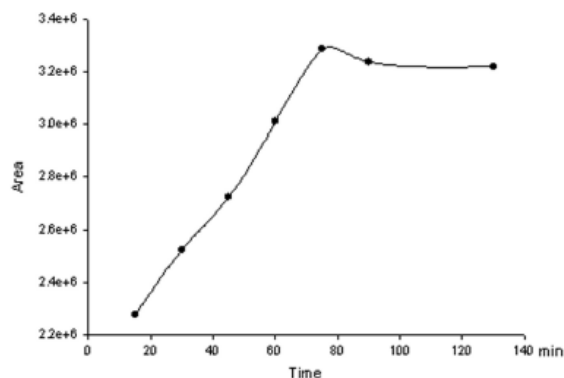
Při studování závislosti času na efektivitě derivatizace se zjistilo, že při překročení 75 minut nastal menší pokles, jak ukazuje obrázek č. 8. To je pravděpodobně důsledek rozkladu derivátu DEG. A i když po 90 minutách nenastala žádná změna, tak se pro derivatizaci zvolila hodnota času právě 75 minut.



Obrázek 6 - Účinnost derivatizačních rozpouštědel, dichlormethan (a), chloroform (b), acetonitril (c), toluen (d), aceton (e), dimethyl formamid (f) a dimethyl sulfoxid (g) [4]

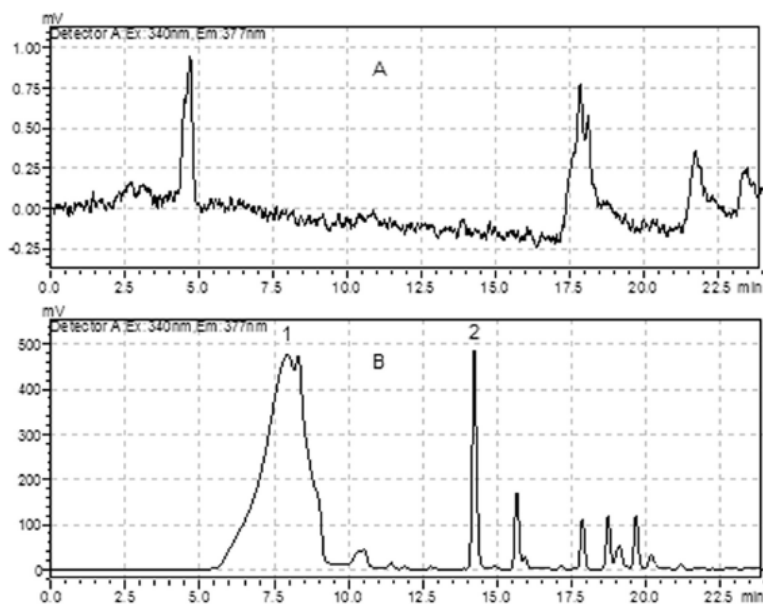


Obrázek 7 - Závislost plochy píků na teplotě [4]



Obrázek 8 - Závislost plochy píků na čase [4]

Výsledek analýzy je uveden na obrázku č. 9. Je z něj vidět jasná odlišitelnost samotného PIAA od derivátu DEG. Na obrázku A je chromatogram vzorku pasty bez předchozí derivatizace a na obrázku B je pak za použití derivatizace. Pík 1 značí PIAA a pík 2 pak derivátu DEG.



Obrázek 9 - Výsledné chromatogramy, (A) bez použití derivatizace a (B) za použití derivatizace, pík 1 značí PIAA a pík 2 značí derivát DEG [4]

Porovnáním s jinými fluorescenčními činidly, má PIAA řadu výhod. Mezi ně můžeme zařadit to, že surové materiály pro syntézu PIAA nejsou toxické, dále stačí použít jednoduchou mobilní fázi (jako třeba acetonitril a vodu) a není nutná žádná další extrakce po derivatizaci, takže směs může být rovnou podrobena analýze. Teoreticky PIAA může rovněž být použito k analýze alkoholů, fenolů a také i aminů. [4]

1.4 Stanovení stopového množství směsi glykolu pomocí UV detekce s následnou hmotností detekcí

Nezderivatizované glykoly jsou velmi polární sloučeniny a jejich separace ze vzorku s velkým obsahem anorganických solí by byla velmi obtížná. Anorganické soli by rovněž mohly zasahovat do detekce pomocí UV ale také i pro následnou hmotností detekcí (ESI-MS). Proto se k derivatizaci použil benzoyl chlorid. [5]

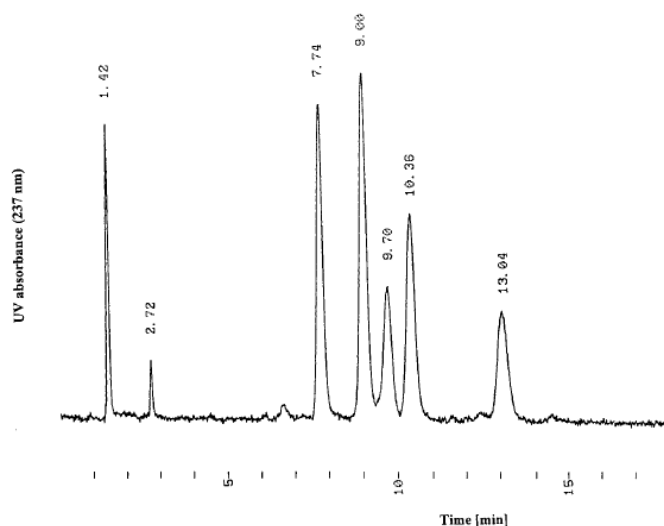
Analyzovaný vzorek pocházel z nukleárního odpadu, takže se v něm vyskytovalo velké množství anorganických solí. Kromě toho vzorek obsahoval řadu glykolů (ethylenglykol (EG), 1,2-PG, 1,3-propylenglykol (1,3-PG) a 2,3-butylenglykol (2,3-BG)).

Derivatizace probíhá dle Schotten-Baumanovy reakce [6], kdy glykol reaguje s benzoyl chloridem ve vodném prostředí za přebytku derivatizačního činidla a v přítomnosti silného alkalického média (NaOH).

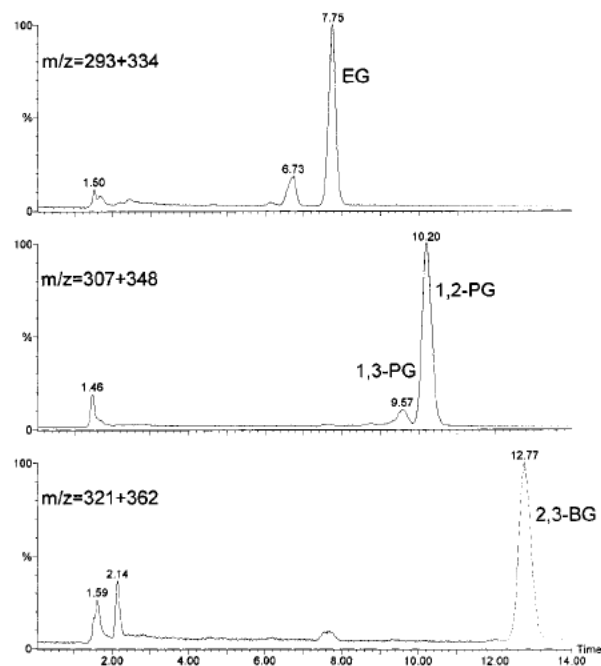
Problémem při analýze byla přítomnost solí ve vzorku a možné vedlejší produkty derivatizace. Mohlo by být možné oddělit produkty derivatizace glykolů přímo v reakční směsi pomocí HPLC, neboť přítomné soli, které obsahoval vzorek, by se vyloučily blízko mrtvého objemu kolony a nijak by nerušily stanovení glykolů. Ale přebytek derivatizačního činidla a vedlejší produkty derivatizace, by se mnohem více zdržovali a mohli by ovlivňovat analýzu. Proto byla směs podrobena extrakci pentanem, aby se odstranily přítomné nečistoty. Získané produkty derivatizace pak byly podrobeny analýze pomocí HPLC.

Na obrázku č. 10 je zobrazen výsledný chromatogram analýzy jednotlivých glykolů spolu s benzoyl alkoholem jako vnitřním standardem, za UV detekce 237 nm.

Na obrázku č. 11 je pak ukázán výsledný chromatogram za použití ESI-MS.



Obrázek 10 - Výsledný chromatogram s UV detekcí, retenční časy jsou 7.74 EG, 9.00 vnitřní standard, 9.70 1,3-PG, 10.36 1,2-PG a 13.04 2,3-BG [5]



Obrázek 11 - Výsledný chromatogram s ESI-MS ^[5]

Přímá derivatizace glykolů pomocí benzoyl chloridu umožňuje extrakci produktů derivatizace do nepolárního rozpouštědla, kde dochází k separaci derivátů od polárních nečistot a anorganických solí. Samotná derivatizace je rychlá a reprodukovatelná.

Silná UV citlivost derivatizovaných glykolů umožňuje UV detekci považovat za vhodnou možnost pro stanovení glykolů. Předpokládá se, že derivatizací pomocí benzoyl chloridu by se dala stanovit další řada látek jako například fenoly, primární a sekundární amíny. ^[5]

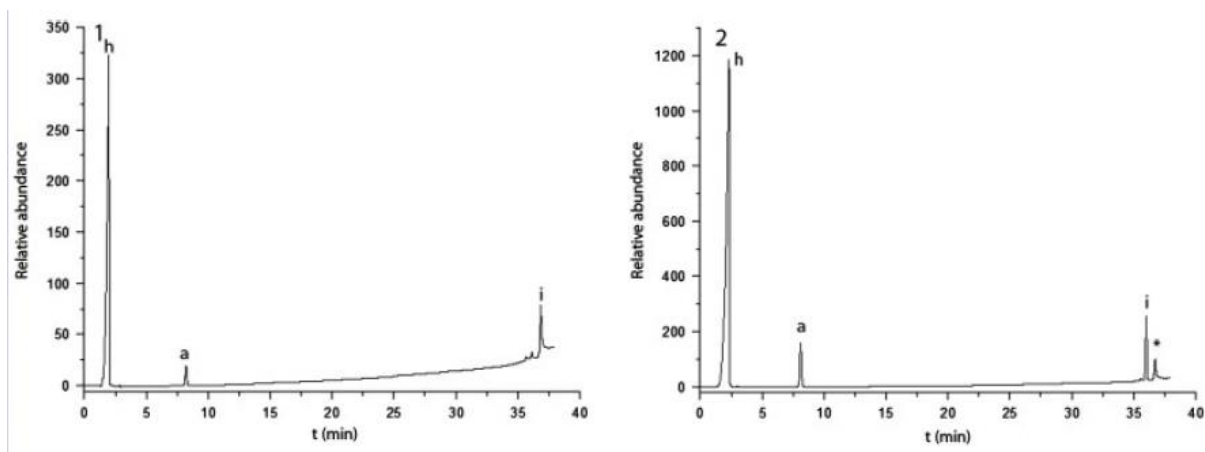
1.5 Stanovení dinitrátu ethylenglykolu v dynamitu po jeho extrakci a následné detekci pomocí UV detekce

Sloučeniny s nitro skupinami jsou nedílnou součástí výbušnin. Jednou z nich je právě dinitrát ethylenglykolu (EGDN). Z důvodu toho, že se v dynamitech vyskytuje několik organických sloučenin, je potřeba nejdříve samotný EGDN podrobit extrakci před jeho vlastní HPLC analýzou. Pro UV detekci byla zvolena vlnová délka 230 nm.

Samotná extrakce probíhala následovně. Ke vzorku o hmotnosti 100 mg bylo přidáno 10 ml vody a následně vzniklá směs byla vložena na 5 minut do ultrazvukové lázně. Vodná fáze byla odebrána a postup byl znovu opakován. Vodná fáze odebrána z obou kroků, byla následně doplněna vodou na objem 25 ml. Ke zbylé pevné fázi bylo přidáno 10 ml methanolu. Postup byl následně stejný jako v předchozím případě. Methanolvé fáze z obou kroků byly opět

doplněny na objem 25 ml pomocí methanolu. Takto připravené roztoky EGDN po jeho extrakci mohou být hned použity pro HPLC analýzu.

Z obrázku č. 12 je zřejmé, že EGDN lze stanovit pomocí HPLC po jeho extrakci z dynamitu. Je vidět, že se EGDN dá stanovit jak ve vodné fázi, tak i v methanolvé fázi.



Obrázek 12 - Výsledné chromatogramy po vodné extrakci (1) a methanolvé extrakci (2), píky značí EGDN (a), dusičnan amonný (h), dibutyl ftalát (i) a neznámý pík (*)^[7]

Takto vytvořená metoda nevyžaduje žádnou derivatizaci EGDN před jeho vlastním stanovením. Pouze jeho extrakci z dynamitu. Samotná HPLC analýza poskytuje přesné výsledky s dobrou selektivitou. Navíc tato metoda dokáže stanovit i jiné látky, jako je například dusičnan amonný a dibutyl ftalát.

Získané výsledky ukazují na možnost využití metody v praxi pro kontrolu kvality plastických trhavin, které obsahují EGDN.^[7]

1.6 Stanovení polyethylenglykolu ve vodě pomocí HPLC s obrácenými fázemi a UV detekcí

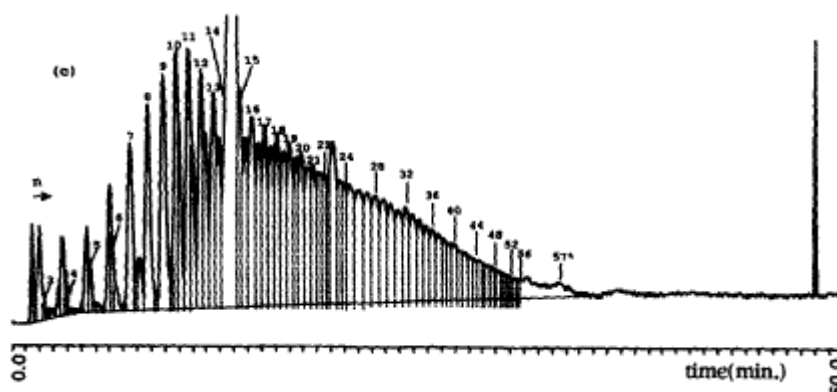
Polyethylen glykoly (PEGs) jsou nejčastěji přítomny ve znečištěné vodě. Ty s nižší molekulovou hmotností jsou biologicky odbouratelné, ale ty s vyšší molekulovou hmotností nejsou zcela biologicky odbouratelné. Jedna z metod, jak stanovit PEGs pomocí HPLC spočívá v jejich ionizaci a následné stanovení produktů ionizace pomocí UV detekce s vlnovou délkou 190 nm.

Před samotnou ionizací se vzorek smíchal s CHCl_3 a po oddělení vrstev se organická vrstva podrobila ionizaci.

Na obrázku č. 13 je ukázán výsledný chromatogram jednoho ze vzorků. V každém získaném chromatogramu byly tři píky, s retenčními časy 3,9, 16 a 24 minut, které se přisuzují nečistotám, kterými mohou být například ftaláty.

Na všech záznamech bylo možné vidět individuální polymery až do $n = 56$, po této hodnotě separace nebyla možná a následné píky polymerů sejevily jako jeden široký pík.

Při porovnání chromatogramu standardní směsi PEGs (bez ionizace) s chromatogramem ionizovaného vzorku se zjistila přítomnost dalších píků u ionizovaného vzorku. Což je pravděpodobně způsobeno tím, že při ionizaci vznikají sloučeniny s jinými funkčními skupinami.



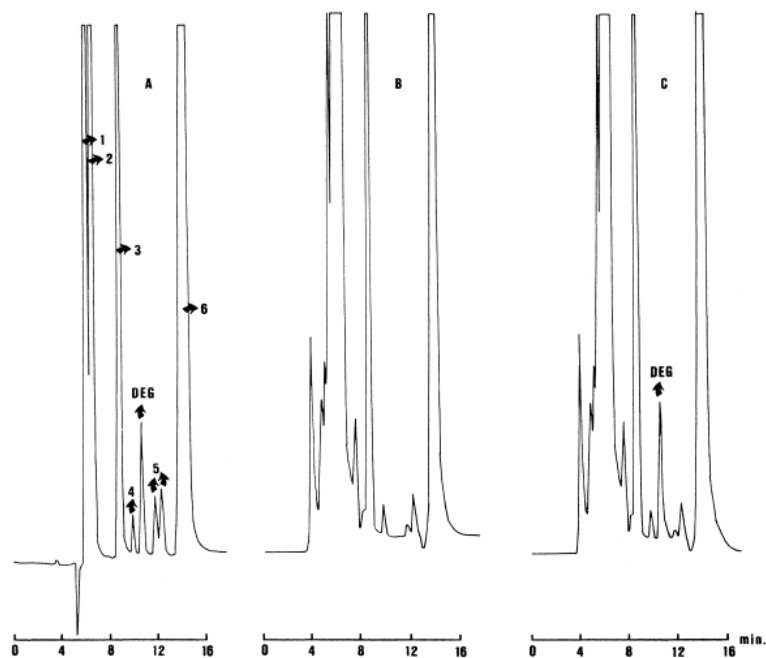
Obrázek 13 - Výsledný chromatogram ionizovaného vzorku [8]

HPLC metoda s obrácenými fázemi je vhodná pro charakterizaci produktů ionizace PEGs. Je možné získat jednotlivé separované polymery PEGs. Navíc je možné určit distribuci molekulárních hmotností. [8]

1.7 Stanovení diethylglykolu ve víně s detekcí pomocí diferenciálního refraktometru

Po navázání na práci od Schwarzenbacha z roku 1982, která se zabývala stanovením organických kyselin ve víně. A následnou její upravením se vyzkoušela metoda po stanovením malých množství DEG ve víně, jako kontrola jejich kvality. Neboť by se DEG neměl kvůli své toxicitě vůbec vyskytovat ve vínech.

Na obrázku č. 14 jsou ukázány jednotlivé chromatogramy. Jedná se o vzorek čistého vína bez jakýkoliv přísad a vzorek vína s přidáním DEG.



Obrázek 14 - Výsledné chromatogramy (A) standardní směs běžných komponent vína (1-glukóza, 2-fruktóza, 3-glycerol, 4-kyselina octová, 5-butylenglykol a 6-ethanol), (B) čistého vína a (C) vína s přidaným DEG

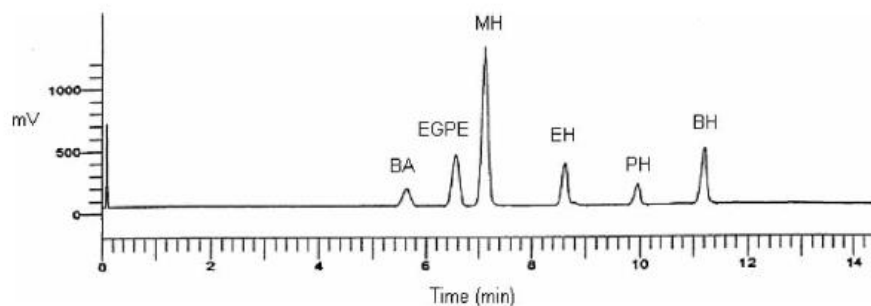
Ačkoliv se dá říct, že využití této metody by bylo zcela minimální, získané výsledky naznačují, že se našla metoda pro rychlé, spolehlivé a přesné stanovení DEG. Je důležité uvědomit si, že metoda závisí na použití charakteristických retenčních časů pro identifikaci sloučenin. Proto by bylo vhodné použít například hmotnostní detektor, pro pozitivní a spolehlivou identifikaci. [10]

1.8 Stanovení fenoxxyethanolu ve směsi s dalšími látkami

Účelem bylo vytvořit metodu pro stanovení fenoxxyethanolu (EGPE) spolu s dalšími látkami (benzylalkohol (BA), methyl hydroxybenzoát (MH), ethyl hydroxybenzoát (EH), propyl hydroxybenzoát (PH) a butyl hydroxybenzoát (BH)). Tyto látky se běžně používají jako součást konzervačních prostředků.

Pro jejich stanovení byla použita metoda HPLC s obrácenými fázemi a UV detekce, při vlnové délce 258 nm.

Na obrázku č. 15 je ukázán výsledný chromatogram, je z něj vidět dobrá odlišitelnost všech šesti stanovaných látek.



Obrázek 15 - Výsledný chromatogram směsi glykolů a alkoholů ^[11]

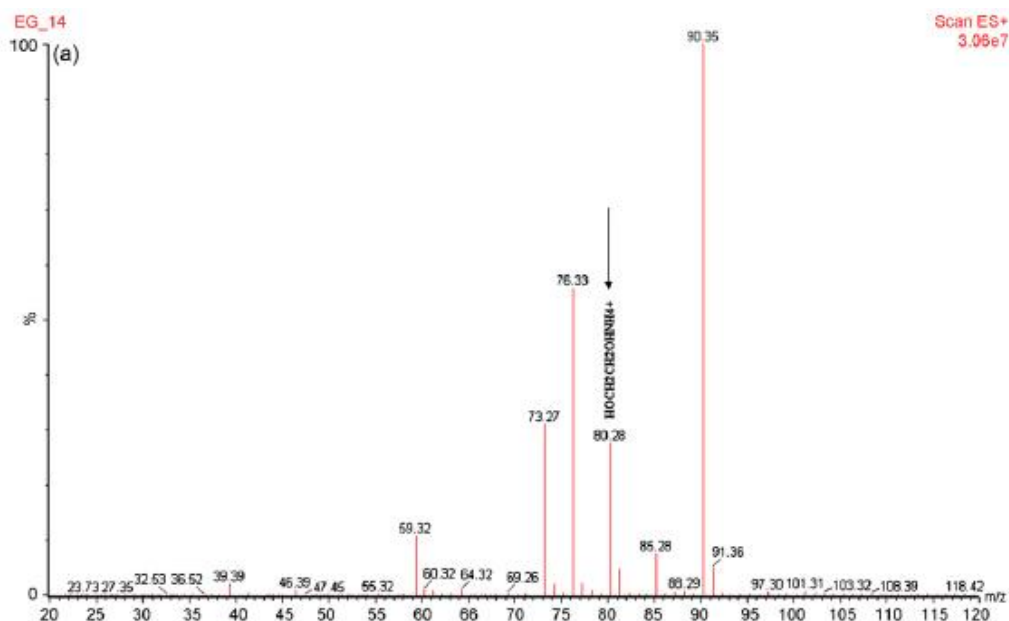
Ze získaných výsledků se dá říct, že metoda je vhodná pro oddělení a stanovení všech šesti látek najednou. Přitom celá analýza trvá méně než 12 minut. Metoda je spolehlivá a vykazuje přesné výsledky. ^[11]

1.9 Stanovení zbytkového množství ethylenglykolu ve zdravotních potřebách sterilizovaných oxiranem pomocí ESI-MS

Výskyt EG ve zdravotních potřebách, které jsou sterilizované oxiranem, je způsoben vedlejším produktem hydrolyzy oxiranu. Jeho přítomnost vadí vzhledem k jeho toxickým vlastnostem.

Ke stanovení EG pomocí HPLC je většinou potřeba jeho derivatizace pomocí benzoylchloridu. Byl ale proveden pokus, pro jeho stanovení bez derivatizačního kroku. Metoda spočívá ve sledování aduktů amonného iontu EG v přítomnosti 0,01 M pufru octanu amonného a methanolu za pomoci detekce ESI-MS. Jako vzorek se použila lékařská tkanina, která byla podrobena extrakci vodou.

Obrázek č. 16 ukazuje získané spektrum celkového proudu iontů EG. Signál s m/z 80,2 a 85 patří aduktu EG s amonným nebo sodným iontem, a právě amonný adukt je považován pro identifikaci EG. Přítomnost sodíku je pravděpodobně způsobena jeho malým obsahem (0,002 %) v octanu amonném, který pak mohl způsobit tvorbu sodíkových aduktů. Signál s m/z 90,3 nemá žádnou spojitost s EG.



Obrázek 16 - ESI-MS spektrum EG ^[12]

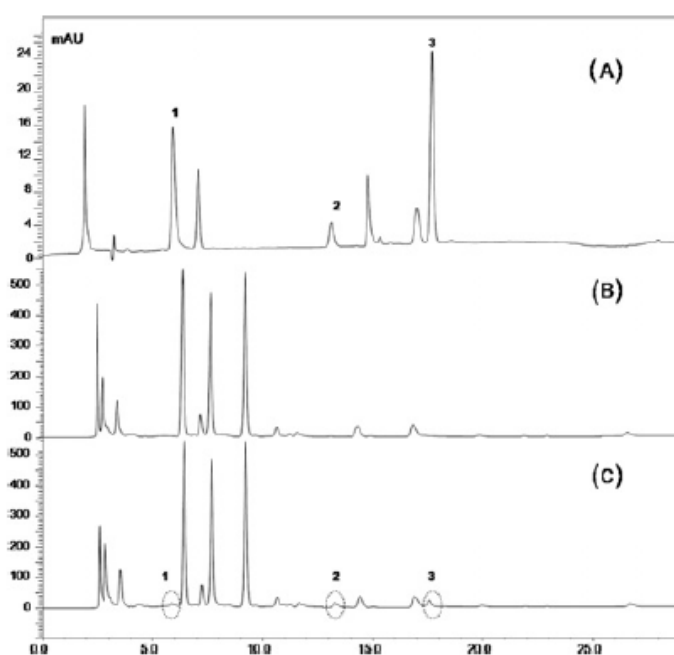
Ukázalo se, že metoda je velmi citlivá, rychlá a jednoduchá na provedení. Metoda se dá jednoduše aplikovat pro rutinní stanovení EG ve zdravotních potřebách, které byly sterilizované oxiranem. ^[12]

1.10 Stanovení 3,4-dihydroxyfenylglykolu, hydroxytyrosolu a tyrosolu pomocí UV-Vis detekce

Existuje řada analytických metod pro stanovení nejrůznějších fenolů, jako je 3,4-dihydroxyfenolglykol (DHPG), hydroxytyrosolu (HT) a tyrosolu (TY). Tyto metody využívají právě HPLC, plynovou chromatografii ^[13] a coulometrické metody ^[14]. Byl proveden experiment pro vytvoření metody, která by jednoduše a najednou dokázala stanovit všechny tři látky. Pro tento pokus byly použity vzorky z krysí plazmy a organické tkáně (například játra). Jako detektor se použil UV-Vis, nastavený na 280 nm.

Všechny tři látky museli být nejdříve extrahovány ze vzorků plazmy a organické tkáně. Pro plazmu byla extrakce založena na extrakci na tuhé fáze. Extrakce pro organickou tkáň byla založena na homogenizaci se zirkonovými kuličky.

Jak je vidět na obrázku č. 17, píky všech tří látek jsou na chromatogramu odděleny vzájemně od sebe, čímž se dá konstatovat jejich dobrá identifikace.



Obrázek 17 - Výsledný chromatogram, (A) plazma, (B) slepý vzorek tkáně bez fenolu a (C) vzorek tkáně, píky značí 1-DHPG, 2-HT a 3-TY ^[15]

Byla vyvinuta citlivá metoda pro stanovení DHPG, HT a TY. Metoda využívá extrakci a následnou HPLC analýzu s detekcí UV-Vis. Po porovnání s jinými detektory, jako je třeba využití UV, se dá říct, že tato metoda dosahuje vyšší citlivosti.

Její využití by se dalo aplikovat v medicíně pro sledování metabolického zpracování těchto sloučenin v lidském těle. Také je možné tuto metodu využít pro analýzu jiných vzorků tkání od různých savců. ^[15]

1.11 Využití metody HPLC pro stanovení dvou izomerů thyminglykolu v oligodeoxynukleotidu

Analytická metoda HPLC se dá využít pro stanovení thyminglykolu, jako hlavního produktu oxidace thyminu. Přesněji se jedná o izolaci obou isomerů (5S, 6R) a (5R, 6S) cis thyminglykolu ze syntetických oligodeoxynukleotidů.

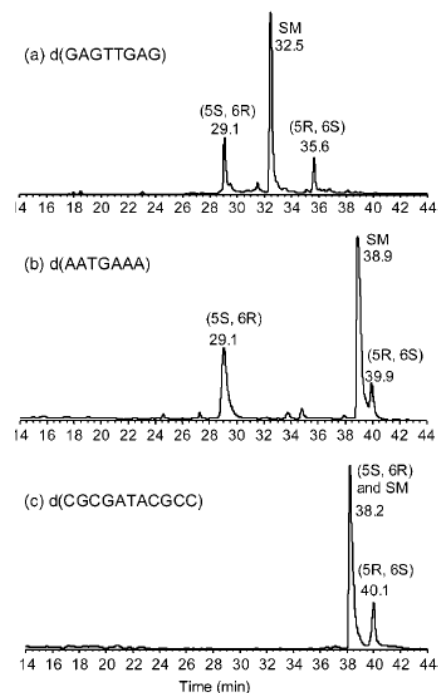
Jako detektor pro HPLC analýzu se použil detektor UV-Vis, nastavené na 260 nm.

Všechny syntetické oligodeoxynukleotidy, které byly zakoupeny nebyly dále čištěny a nijak upravovány. Kromě toho že u nich byla provedena oxidace pomocí oxidu osmičelého. Po oxidaci se přebytečný oxid osmičelý odstranil extrakcí pomocí tetrachlormethanu. Vodná fáze vysušila a po opětovném rozpouštění se použila přímo pro HPLC analýzu.

Na obrázku č. 18 je zobrazen výsledný chromatogramu separovaných produktů oxidace oligodeoxynukleotidů. Podařilo se separovat oba cis isomery thyminglykolu od sebe a od počátečního oligodeoxynukleotidu, který je na chromatogramu značen jako SM. Za povšimnutí stojí to, že isomer (5S, 6R) se vždy eluuje první.

Zjištění toho, že retenční časy obou isomeru jsou rozdílné, je důležité pro biochemiky a biology, pro jejich pochopení toho, jak tyto isomery ovlivňují dvoušroubovici DNA.

Navíc je důležité uvědomit, že oxidací pomocí oxidu osmičelého se poprvé dosáhlo izolace obou isomerů, na rozdíl od předešlých publikací, kdy se izoloval pouze jeden isomer za použití manganistanu draselného jako oxidovadla. [16]



Obrázek 18 - Výsledné chromatogramy oxidace oligodeoxynukleotidů [16]

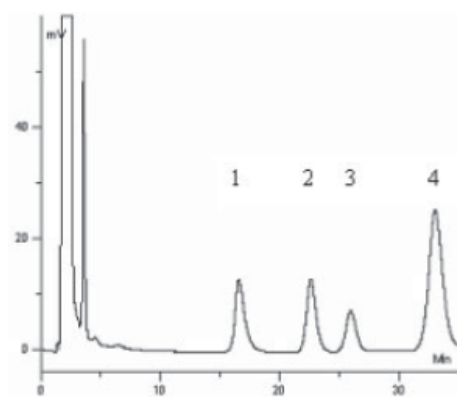
1.12 Současné stanovení styrenglykolu spolu s kyselinami

Nebyly vydané žádné publikace, které by se zabývali současným stanovením styrenglykolu spolu se čtyřmi kyselinami (fenylglyoxalovou, hippurovou a mandlovou) v jaterních buňkách. Vzorek jaterních buněk byl získán z laboratorních kryš, ten byl dále izolován pomocí dvojstupňové perfuzní metody kolagenázy [17] s menší modifikací.

Pro analýzu HPLC se použil UV-Vis detektor, nastavený na 220 nm.

Na obrázku č. 19 je ukázán výsledný chromatogram. Jak je vidět všechny látky mají rozdílné eluční časy, a tak je potvrzena jejich dobrá odlišitelnost.

Tato nová jednoduchá HPLC metoda poskytuje přesné a selektivní výsledky, při současném stanovení všech čtyř látek. Metoda poté byla použita pro studium stereoselektivního metabolismu styrenglykolu a mandlové kyseliny. [18]



Obrázek 19 - Výsledný chromatogram upraveného vzorku s přidáními kyselinami, 1-kys. fenylglyoxalová, 2-kys. mandlová, 3-styrenglykol a 4-kys. hippurová [18]

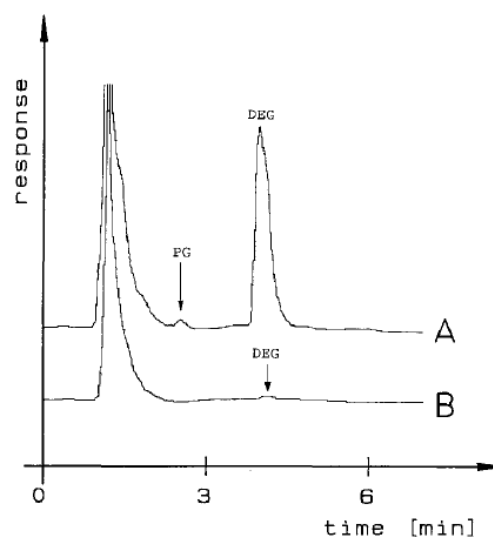
1.13 Stanovení diethylenglykolu a propylenglykolu s refraktometrickým detektorem

Byla vyzkoušena nová metoda pro stanovení glykolů pomocí HPLC s obrácenými fázemi a refraktometrickým detektorem. Metoda byla použita pro prozkoumání biodegradace glykolů v umělém vytvořeném laboratorním aktivovaném kalu.

Na obrázku č. 20 je získaný chromatogram, vtoku (A) a výtoku (B) aktivovaného kalu. Vtok obsahoval definované množství živin, minerálních solí a uměle přidané množství DEG a PG. Jak je vidět DEG i PG lze stanovit, bez jakéhokoliv rušivého efektu. Pík, který se objevuje hned začátku, je přisuzován anorganickým solím.

Lze říci, že takto popsaná metoda, poskytuje přesné výsledky a zároveň metoda není náročná na provedení. Výhodou je i to že není potřeba jakékoliv předešlé úpravy a derivatizace.

Mimo jiné metoda dokáže stanovit i další látky mimo glykolů, mezi ně patří například organické látky, jako jsou povrchově aktivní látky a živiny obsažené v laboratorně připraveném aktivovaném kalu. ^[19]



Obrázek 20 - Výsledný chromatogram uměle vytvořeného laboratorního kalu ^[19]

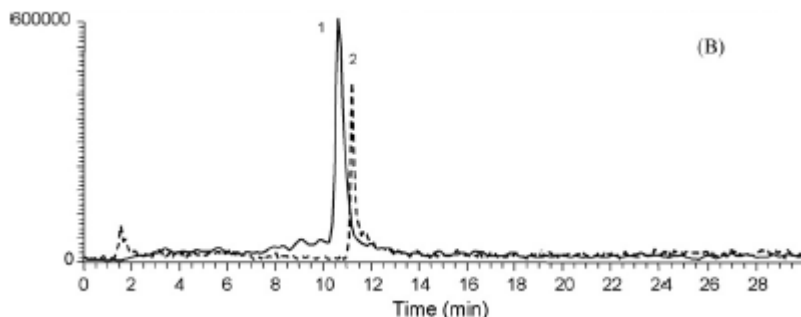
1.14 Stanovení diethylenglykolu ve znečištěných mořských vodách pomocí ESI-MS

Tato metoda se zabývá stanovením DEG v mořské vodě, která byla získána z okolí zařízení na těžbu zemního plynu. Tento průmyslový provoz pro své účely používá právě DEG a někdy se stává, že se DEG dostane do okolí a vážně ohrožuje mořský ekosystém.

Samotná metoda ale nemá dostatečnou citlivost pro stanovení glykolů. Příčina se přisuzuje právě vzorku mořské vody, která obsahuje velké množství minerálních solí. Tomu všemu se dá ale vyhnout, pokud se před samotnou analýzou vzorek podrobí derivatizaci. Opět byla použita už zmíněná derivatizace dle Schotten-Baumanna ^[6], kde se používá benzoyl chlorid jako derivatizační činidlo v přítomnosti alkalického media, kterým je NaOH. Jako vnitřní standard se použil benzoyl alkohol.

Po derivatizaci se výsledná směs podrobila pentanové extrakci, za účelem oddělení zderivatizovaného DEG a vnitřního standardu od přítomných minerálních solí. Extrakt (pentanová fáze) byl následně podroben HPLC analýze.

Na obrázku č. 21 je ukázán výsledný chromatogram vzorku mořské vody. Přítomnost dalšího píku okolo píku pro vnitřní standard je přímý důkaz přítomnosti DEG ve vzorku.



Obrázek 21 - Výsledný chromatogram mořské vody s přidaným DEG, 1-derivát DEG a 2-vnitřní standard ^[20]

Ze získaných výsledků se dá říct, že po derivatizaci DEG pomocí benzoyl chloridu a následnou HPLC analýzou, metoda poskytla dobré výsledky pro monitorování obsahu chemikálií v mořské vodě.

Přesnost a poměrná jednoduchost metody, by umožnilo její využití při standardních kontrolách kvality mořské vody u zařízení na těžbu plynů. ^[20]

1.15 Identifikace cis a trans isomerů 2-buten-1,4-diolu pomocí detekce UV-Vis

2-buten-1,4-diol (BEG) je důležitou součástí produktů v různých odvětvích chemického průmyslu, jako je například farmacie, výroba pesticidů a přípravky pro ochranu rostlin. ^[21]

Byla popsána metoda pro separaci a identifikaci isomerů BEG za použití dvou různých kolon a UV-Vis detekce.

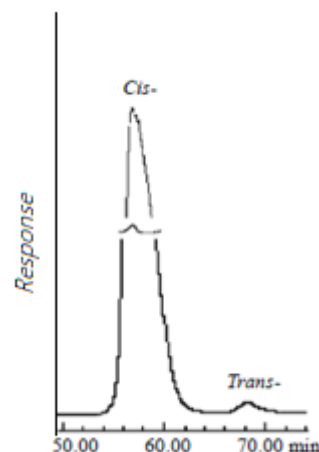
Nejdříve se stanovení vyzkoušelo na klasické koloně naplněné silikagelem, ale zde k žádnému výsledku nedošlo. Následně byla separace vyzkoušena na dvou chirálních kolonách – (S,S)-Whel-O1 a ChiraSpher.

Při měření s první uvedenou kolonou se do mobilní fáze přidal ethanol, který dokázal napomoci stanovení, na rozdíl od vyzkoušeného iso-propanolu. Z naměřených hodnot se zjistila podmínka, že maximální koncentrace ethanolu v mobilní fázi musí být pod 10 %, nad tuto hodnotu nedochází k separaci.

U druhé kolony se kromě ethanolu, přidal do mobilní fáze i diethylamin, který měl sloužit pro úpravu tvaru píků. Opět platilo, že s nižší koncentrací ethanolu se zlepšila separace.

Po porovnání obou kolon se dá říct, že o něco lepší výsledky poskytovala první uvedená kolona. Na obrázku č. 22 je ukázán výsledný chromatogram při použití první uvedené kolony.

Při použití správné kolony a správné koncentrace přidaných látek v mobilní fázi, se dají isomery BEG separovat. Metoda má možnou aplikaci při určování množství isomerů v daném vzorku. [22]



Obrázek 22 - Výsledný chromatogram identifikovaných isomerů BEG [22]

1.16 Stanovení bronopolu a produktů jeho rozkladu za detekce pomocí UV-Vis detekce

Bronopol (2-brom-2-nitropropan-1,3-diol) je velmi používaná chemikálie v kosmetických prostředcích, lécích a různých druzích šamponů [23]. Jeho stanovení v těchto prostředcích je důležitým parametrem kvality. Byly vyzkoušeny různé analytické techniky pro stanovení bronopolu, jako například plynová chromatografie [24], HPLC s UV detekcí [25, 26] a elektrochemické techniky [27]. Některé techniky jsou časově náročné a kvůli rozkladu bronopolu, takže získané výsledky by nemohly být použity.

Byla vyzkoušená nová metoda pro stanovení bronopolu, pomocí HPLC s UV-Vis detekcí, nastavené na 210 nm.

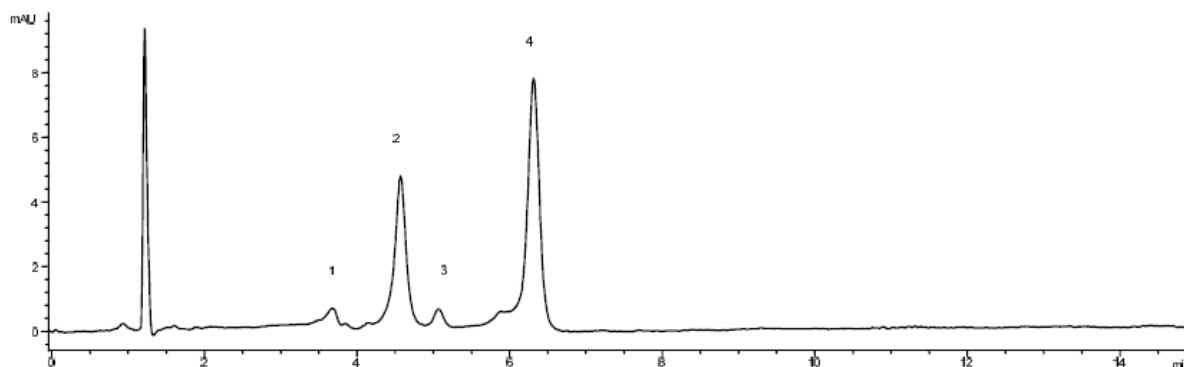
Pokud se jako rozpouštědlo použil methanol a voda v poměru 1:1, získané výsledky ukázali na postupný rozklad bronopolu. Po 24 hodinách se bronopol rozložil z 20 %. Stejně výsledky se získaly při použití acetonitrilu a vody opět v poměru 1:1.

Změna ale nastala při použití methanolu, kde nedošlo k žádnému rozkladu. Připravené roztoky navíc byly stálé po jeden rok, pokud se udržoval při 4 °C. Z tohoto důvodu se methanol zvolil jako nejlepší rozpouštědlo.

Efekt teploty na stabilitu bronopolu byl otestován v rozmezí teplot 40 až 100 °C. Ve vodných roztocích při teplotě 40 °C docházelo k rozkladu na bromnitroethanol a bromnitromethan, v malé míře se objevil i 2-bromethanol. Podobné výsledky byly získány u vodných roztoků při 100 °C, ale stím rozdílem že se neobjevil 2-bromethanol.

Ale pokud se jako rozpouštědlo použil methanol, při 40 °C roztok byl stálý a nedošlo k žádnému rozkladu.

Na obrázku č. 23 je ukázán výsledný chromatogram, změřený z připraveného standardu bronopolu rozpouštěného ve směsi methanolu a vody.



Obrázek 23 - Výsledný chromatogram standardu bronopolu, píky značí (1) 2-bromethanol, (2) bromnitromethan, (3) bronopol a (4) bromnitroethanol [28]

Při použití methanolu, kde je následně bronopol stálý až po jeden měsíc při okolní teplotě, je možné stanovit bronopol ve vzorku pomocí HPLC s reprodukovatelnými výsledky. Navíc produkty rozkladu bromnitroethanol a bromnitromethan mohou být také stanoveny spolu s bronopolem. [28]

2 ZÁVĚR

HPLC je velmi často užívanou metodou pro stanovení velkého počtu chemických látek. Ne vždy se ale dané chemické individuum dokáže stanovit přímo. Běžně se před samotnou analýzou musí vzorek upravit. Tento proces je nazýván derivatizace, a dnes se rozlišujeme tři základní způsoby derivatizace. Jsou to předkolonová, postkolonová a derivatizace v koloně. Samotná derivatizace má za účel zvýšení citlivosti (někdy umožnění detekce, kde by se bez derivatizace daná látka nedokázala stanovit), zvýšení rozlišení vzniklých píků v chromatogramu a zamezení nežádoucí sorpce látek na koloně. [29]

Tato analytická metoda využívá řadu různých detektorů, jako je například UV-Vis, který dokáže měřit při jakémkoliv zvolené vlnové délce. Fluorescenční detektor, který měří vyzářené sekundární záření po absorpci primárního záření. Refraktometrický detektor, založený na měření indexu lomu eluátu. Mezi další skupinu detektorů lze zařadit elektrochemické detektory (amperometrický, coulometrický) a často využívaný elektrospary (ESI). [29]

Nutnost stanovování glykolů se už v minulosti projevila jako velmi důležitá chemická operace. Už jen při kontrole kvality nejrůznějších produktů, speciálně farmaceutických. Mluví zde hlavně o DEG a jeho toxickým vlastnostem pro lidský organismus.

Jako příklad lze uvést únik DEG do farmaceutických produktů vyráběných v Číně kolem dubna roku 2006 [3], která zapříčinil smrt několika lidí. Příčina tehdy byla uvedena jako chyba při výrobě farmaceutické směsi. Starší příklad lze také uvést, další únik DEG tentokrát ale do vína v roce 1985 [10] v Rakousku.

Samozřejmě se nemusí jednat pouze o DEG, kontrola přítomnosti jakýkoliv glykolů se stala důležitou operací a zájmem analytických chemiků. Jednak za účely získání dat kvality produktů, které obsahují chemické sloučeniny z řad glykolů. Tak i pro kontrolu už zmiňovaných produktů, které by neměli žádné glykoly obsahovat. Lze zmínit i kontrolu obsahu glykolů ve vodě, jako parametr pro získání čistoty vod.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] AV EQUEN: *Ethylenglykol* [online]. AV EQUEN, 2018 [cit. 2018-06-22]. Dostupné z: <http://www.av-equen.cz/znalosti/ethylenglykol/>
- [2] CHURÁČEK, Jaroslav a Pavel JANDERA. *Separace látek: kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1981.
- [3] ZHOU, Tao, Haiying ZHANG a Gengli DUAN. Simultaneous determination of diethylene glycol and propylene glycol in pharmaceutical products by HPLC after precolumn derivatization with p-toluenesulfonyl isocyanate. *Journal of Separation Science* [online]. 2007, **30**(16), 2620-2627 [cit. 2018-06-22]. DOI: 10.1002/jssc.200700097. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200700097>
- [4] WU, Jiangang, Jinbin YUAN, Qian LIU, Fei TANG, Li DING, Jun TAN a Shouzhuo YAO. New derivatizing reagent for analysis of diethylene glycol by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Separation Science* [online]. 2008, **31**(22), 3857-3863 [cit. 2018-06-22]. DOI: 10.1002/jssc.200800433. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200800433>
- [5] HOLČAPEK, M., H. VIRELIZIER, J. CHAMOT-ROOKE, P. JANDERA a C. MOULIN. Trace Determination of Glycols by HPLC with UV and Electrospray Ionization Mass Spectrometric Detections. *Analytical Chemistry* [online]. 1999, **71**(13), 2288-2293 [cit. 2018-06-23]. DOI: 10.1021/ac981087y. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac981087y>
- [6] Vollmer, P. A.; Harty, D. C.; Erickson, N. B.; Balhon, A. C.; Dean, R. A. *J. Chromatogr., B* **1996**, 685, 370.
- [7] SÁIZ, Jorge, Juan Carlos BRAVO, Esperanza Velasco ÁVILA, Mercedes TORRE a Carmen GARCÍA-RUIZ. Determination of ethylene glycol dinitrate in dynamites using HPLC: Application to the plastic explosive Goma-2 ECO. *Journal of Separation Science* [online]. 2011, **34**(23), 3353-3358 [cit. 2018-06-23]. DOI: 10.1002/jssc.201100523. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201100523>
- [8] MOLDOVAN, Z., Maria V. DELGADO LUQUE, Emilia Otal SALAVERRI, Ana SUÁREZ, R. ANDREOZZI, A. INSOLA a J. Lebrato MARTÍNEZ. Determination of

- polyethylene glycols in water by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 1996, **723**(2), 243-249 [cit. 2018-06-23]. DOI: 10.1016/0021-9673(95)00848-9. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967395008489>
- [9] SCHWARZENBACH, R., 1982. High Performance Liquid Chromatography of Carboxylic Acids. *J. Chrom.* **251**, 339-558.
- [10] VAN ROOYEN, T.J. a C.J. VAN WYK. *A Rapid and Quantitative HPLC Method for Determination of Diethylene Glycol* [online]. 2017, **7**(1), - [cit. 2018-06-23]. DOI: 10.21548/7-1-2344. ISSN 22247904. Dostupné z: <http://www.journals.ac.za/index.php/sajev/article/view/2344>
- [11] SHABIR, Ghulam A. *Method Development and Validation of Preservatives Determination (Benzyl Alcohol, Ethylene Glycol Monophenyl Ether, Methyl Hydroxybenzoate, Ethyl Hydroxybenzoate, Propyl Hydroxybenzoate, and Butyl Hydroxybenzoate) using HPLC* [online]. 2007, **30**(13), 1951-1962 [cit. 2018-06-23]. DOI: 10.1080/10826070701386553. ISSN 1082-6076. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826070701386553>
- [12] HARI, P.R., C.P. NASEERALI a K. SREENIVASAN. A sensitive estimation of residual ethylene glycol in ethylene oxide sterilized medical devices by HPLC with electrospray ionization mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography B* [online]. 2009, **877**(3), 328-332 [cit. 2018-06-23]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.12.016. ISSN 15700232. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023208009136>
- [13] Xie, S., Suckow, R. F., & Cooper, T. B. (1996). Determination of 3,4-dihydroxyphenyl glycol in plasma by gas chromatography-mass spectrometry and highperformance liquid chromatography methods. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Application*, **677**, 37-43.
- [14] Karege, F., Gaillard, J. M., Tissot, R., Azorin, J. M., & Valli, M. (1987). Determination of 3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG) by HPLC with coulometric detection, and correlation with 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) in human plasma. *Biomedical Chromatography*, **2**, 30-33.

- [15] RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, Guillermo, Sharon WOOD, Juan FERNÁNDEZ-BOLAÑOS GUZMÁN, Garry G. DUTHIE a Baukje DE ROOS. Determination of 3,4-dihydroxyphenylglycol, hydroxytyrosol and tyrosol purified from olive oil by-products with HPLC in animal plasma and tissues. *Food Chemistry* [online]. 2011, **126**(4), 1948-1952 [cit. 2018-06-23]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.044. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610016535>
- [16] WANG, Yinsheng. HPLC Isolation and Mass Spectrometric Characterization of Two Isomers of Thymine Glycols in Oligodeoxynucleotides. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2002, **15**(5), 671-676 [cit. 2018-06-23]. DOI: 10.1021/tx0155855. ISSN 0893-228X. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx0155855>
- [17] Guguen-Guillouzo C and Guillouzo A. *Isolated and Culture Hepatocytes*. Eurotext: Paris, 1986;1.
- [18] WANG, Jin-Zhao, Xin-Yan LU, Na-Ping ZHAO, Yi-Yu CHENG a Su ZENG. Simultaneous determination of phenylglyoxylic acid, mandelic acid, styrene glycol and hippuric acid in primary culture of rat hepatocytes incubate by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography* [online]. 2007, **21**(5), 497-501 [cit. 2018-06-23]. DOI: 10.1002/bmc.783. ISSN 02693879. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmc.783>
- [19] NITSCHKE, L. a L. HUBER. Determination of glycols by HPLC with refractive index detection. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* [online]. 1994, **349**(6), 451-453 [cit. 2018-06-23]. DOI: 10.1007/BF00322932. ISSN 0937-0633. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00322932>
- [20] CAPPIELLO, A., G. FAMIGLINI, P. PALMA, V. TERMOPOLI, H. TRUFELLI, R. DIMITO a M. MANNOZZI. *LC-ESI-MS determination of diethylene glycol pollution in sea water samples collected around gas extraction platform plants* [online]. [cit. 2018-06-23]. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.06.067. ISBN 0039-9140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003991400900527X>
- [21] Chen, W. Q., Xu, D. Y., 2003. Lafutidine, a novel antiulcer drug. *Chinese J. New Drugs Clin. Rem.*, **4**:247-250 (in Chinese).

- [22] PAN, Chun-xiu, Xiu-zhu XU, Hong-mei HE, Xiao-jun CAI a Xue-jun ZHANG. Separation and identification of cis and trans isomers of 2-butene-1,4-diol and lafutidine by HPLC and LC-MS. *Journal of Zhejiang University SCIENCE* [online]. 2005, **6B**(1), 74-78 [cit. 2018-06-23]. DOI: 10.1631/jzus. 2005. B0074. ISSN 1009-3095. Dostupné z: <http://www.zju.edu.cn/jzus/article.php?doi=10.1631/jzus.2005.B0074>
- [23] K. M. Wallhausser, in: M. M. Rieger (Ed.), *Surfactants in Cosmetics*, Marcel Dekker, New York, 1985, p. 228.
- [24] D. M. Bryce, B. Crowshaw, J. E. Hall, V. R. Holland, B. Lessel, *J. Soc. Cosmetic Chem.* 29 (1978) 3-24.
- [25] V. Ferioli, F. Vezzalini, C. Rustichelli, G. Gamberini, *H. Farmaco.* 47 (1992) 833-839
- [26] H. Z. Lian, W. B. Zhang, J. Miao, Q. Jiang, L. Mao, L. Zong, Li, X. X. Wu, R. M. Cheng, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 667-671.
- [27] S. Scalia, S. Simeoni, E. Bousquet, *Pharmazie* 56 (4) (2001) 318-320.
- [28] WANG, Huafu, Gordon J PROVAN a Keith HELLIWELL. Determination of bronopol and its degradation products by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2002, **29**(1-2), 387-392 [cit. 2018-06-23]. DOI: 10.1016/S0731-7085(02)00078-X. ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073170850200078X>
- [29] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.