

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

STANOVENÍ REZIDUÁLNÍCH LÁTEK Z PŘÍPRAVY KOLOIDNÍCH
SYSTÉMŮ NA BÁZI BIOPOLYMERŮ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

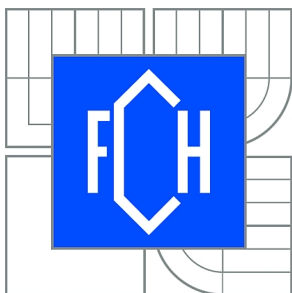
TEREZA BORŮVKOVÁ

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

STANOVENÍ REZIDUÁLNÍCH LÁTEK Z PŘÍPRAVY KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ NA BÁZI BIOPOLYMERŮ

DETERMINATION OF RESIDUAL SUBSTANCES FROM THE PREPARATION OF COLLOIDAL
SYSTEMS BASED ON BIOPOLYMERS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

TEREZA BORŮVKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0842/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Tereza Borůvková	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805R002)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:	doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.	

Název bakalářské práce:

Stanovení reziduálních látek z přípravy koloidních systémů na bázi biopolymerů

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracovat rešerši zaměřenou na problematiku analýzy těkavých polárních organických látek.
2. Provést optimalizaci metody mikroextrakce tuhou fází a plynové chromatografie pro stanovení 2-methylpropan-2-olu v pevné matrici
3. Optimalizovanou metodu aplikovat pro stanovení 2-methylpropan-2-olu po lyofilizaci směsi voda / 2-methylpropan-2-ol / biopolymer
4. Výsledky využít k optimalizaci procesu lyofilizace

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Tereza Borůvková
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

doc. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Těkavé organické látky lze izolovat a zakoncentrovat z vodného roztoku metodami, které jsou založeny na analýze rovnovážné plynné fáze, právě díky jejich těkavosti. Cílem této bakalářské práce je stanovení množství reziduálního terc-butanolu patřícího mezi těkavé organické látky, ve vzorcích po lyofilizaci. Vzorky byly připraveny smísením hydrofobní sondy a hydrofilního hyaluronanu. Aby ke smísení došlo, je třeba přidat organické rozpouštědlo terc-butanol, který zajišťuje stabilní prostředí. Právě díky němu dojde k homogennímu smísení sondy a hyaluronanu. Následnou lyofilizací vzorku dojde k narušení vodného obalu hyaluronanu a nepolární vodíky, které jsou v něm ukryté, mohou interagovat s hydrofobní sondou. Navázání sondy je důležité v oblasti onkologie, kdy tento fakt může být využit v oblasti cílené distribuce léčiv. Ve výsledném produktu je však terc-butanol nežádoucí, zejména v oblastech medicínských aplikací. Předmětem této práce je minimalizace reziduálního množství terc-butanolu ve výsledném lyofilizačním koláči. Ke stanovení jeho obsahu byla použita metoda analýzy rovnovážné plynné fáze (statický Head-Space) pomocí plynové chromatografie s plamenovou ionizační detekcí (GC/FID).

ABSTRACT

Volatile organic compounds could be isolated and concentrated from liquid solution using methods, which are based on analysis of equilibrium gas phase, because of their volatility. The aim of this bachelor's thesis is determination the amount of residual tert-butanol, belonging to volatile organic compounds, in the samples after lyophilisation. Samples were prepared by mixing hydrofobic sonde and hydrophilic hyaluronan. For mixing these components it is necessary to add organic solvent tert-butanol, which ensures stable environment. Thanks to its presence mixing of probe and hyaluronan occurs. Consecutive lyopfilisation of the sample leads to the disruption of a water cover of hyaluronan and nonpolar hydrogen atoms, which are hidden in it, can interact with hydrofobic probe. Bonding the probe is important in oncology, where this fact could be used in targeted distribution of pharmaceuticals. However presence of tert-butanol is unacceptable in the final product, mainly in medical applications. The object this study is the minimization of residual tert-butanol amount in final lyophilised cake. The method of equilibrium gas phase analysis (static Head-Space) by gas chromatography with flame ionization detection (GC/FID) was used for the determination of its content.

KLÍČOVÁ SLOVA

Těkavé organické látky, terc-butanol, lyofilizace, SPME , Head-Space analýza, GC/FID

KEYWORDS

Volatile organic compounds, tert-butanol, lyophilisation, SPME, Head-Space analysis, GC/FID

BORŮVKOVÁ, T. *Stanovení reziduálních látek z přípravy koloidních systémů na bázi biopolymerů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 55 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studentky

Poděkování:

Ráda bych poděkovala panu doc. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc. za velmi cenné rady, věcné připomínky, vstřícnost a ochotu při konzultacích a zpracování práce.

Poděkování patří také Ing. Petře Michalické za přínosné konzultace a za pomoc při přípravě vzorků.

V neposlední řadě bych chtěla také poděkovat své rodině a přátelům za neustálou podporu, trpělivost a lásku.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	9
2.1	Izolace těkavých organických látek a jejich zakoncentrování	9
2.1.1	Extrakce plynem	9
2.1.2	Extrakce tuhým sorbentem (SPE).....	12
2.1.3	Mikroextrakce tuhou fází (SPME – Solid-Phase Microextraction).....	12
2.2	Plynová chromatografie	18
2.2.1	Mobilní fáze – nosný plyn	18
2.2.2	Retenční charakteristiky	19
2.2.3	Plynový chromatograf	20
2.2.4	Kolony v plynové chromatografii.....	21
2.2.5	Detektory v plynové chromatografii.....	22
2.2.6	Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení	24
2.3	Hyaluronan (kyselina hyaluronová).....	26
2.3.1	Struktura v roztoku	26
2.3.2	Možnosti využití hyaluronanu v oblasti cílené distribuce léčiv	27
2.4	Lyofilizace	28
2.4.1	Průběh lyofilizace	28
2.4.2	Lyofilizační zařízení	29
2.4.3	Korozpouštědlo.....	29
3	Experimentální část.....	30
3.1	Chemikálie	30
3.2	Použité přístroje a pomůcky.....	30
3.2.1	Plynová chromatografie.....	30
3.2.2	SPME.....	30
3.2.3	Lyofilizace	30
3.2.4	Ostatní pomůcky.....	30

3.3	Pracovní postup.....	30
3.3.1	Příprava zásobních roztoků potřebných pro přípravu vzorků	30
3.3.2	Příprava pracovního roztoku pro optimalizaci metod	31
3.3.3	Příprava reálných vzorků.....	31
3.4	Optimalizace podmínek SPME.....	32
3.4.1	Výchozí podmínky SPME	32
3.4.2	Volba SPME vlákna	33
3.4.3	Volba sorpční doby.....	33
3.4.4	Volba sorpční teploty.....	33
3.5	Stanovení analytů v reálných vzorcích	34
3.5.1	Zpracování vzorků metodou HS-SPME	34
3.5.2	Zpracování vzorku metodou analýzy rovnovážné plynné fáze	35
3.6	Optimalizace podmínek separace	35
3.6.1	Volba chromatografické kolony	35
3.6.2	Podmínky GC analýzy.....	35
3.7	Kvantifikace	36
3.7.1	Mez detekce a kvantifikace	36
3.7.2	Opakovatelnost metody	36
3.7.3	Metoda standardního přídatku	37
4	Výsledky a diskuze	38
4.1	Optimalizace podmínek SPME.....	38
4.1.1	Aktivace vlákna	38
4.1.2	Volba SPME vlákna	38
4.1.3	Volba sorpční doby.....	40
4.1.4	Volba sorpční teploty.....	40
4.2	Stanovení analytů v reálných vzorcích	41
4.2.1	Stanovení reziduálního terc-butanolu ve vzorcích metodou HS-SPME	41
4.2.2	Stanovení reziduálního terc-butanolu ve vzorcích metodou analýzy rovnovážné plynné fáze (Head-Space).....	44
4.2.3	Závislost množství reziduálního terc-butanolu na čase.....	47

4.3	Opakovatelnost metody, Mez detekce, Mez kvantifikace	48
4.3.1	Opakovatelnost metody – Head-Space analýza.....	48
4.3.2	Mez detekce	48
4.3.3	Mez kvantifikace	49
5	Závěr.....	50
	Seznam použitých zdrojů.....	51
	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	55

1 ÚVOD

V předkládané práci je řešena problematika analýzy těkavých organických látek. K izolaci a zakoncentrování těchto látek z vodného roztoku jsou vhodné metody založené na analýze rovnovážné plynné fáze.

Terc-butanol patří mezi těkavé organické látky a jeho reziduální množství ve vzorcích po lyofilizaci je vhodné analyzovat z plynné fáze právě díky jeho těkavosti. Ve vzorcích zajišťuje terc-butanol stabilní prostředí a díky němu je možné homogenní smísení hydrofobní sondy s hydrofilním hyaluronanem. Následuje proces lyofilizace, kdy dojde k narušení vodného obalu hyaluronanu a nepolární vodíky, které jsou pod ním ukryty, mohou interagovat s hydrofobní sondou. Navázání sondy na hyaluronan je důležité zejména v oblasti cílené distribuce léčiv, což se stalo v posledních letech velmi diskutovaným tématem v oblasti onkologie a předmětem zkoumání mnoha výzkumných center. Bylo zjištěno, že buněčné nádory obsahují receptory, na něž se váže právě hyaluronan a díky tomu je imunitní systém nepovažuje za hrozbu a nebrání se. Právě díky tomuto jevu je hyaluronan vhodný jako nosič cytotoxických látek, protože na rozdíl od cytostatik vnášených do těla samostatně bez nosiče, působí tento systém cíleně a nehubí zdravé buňky, jako samostatná cytostatika.

Ve výsledném produktu je výskyt terc-butanolu nežádoucí, zejména z hlediska medicínských aplikací, proto je snaha jeho množství v lyofilizačním koláči minimalizovat.

Ke stanovení reziduálního množství ve vzorku byly použity metody izolace analytu pomocí mikroextrakce tuhou fází (SPME) se vzorkováním rovnovážné plynné fáze a přímá analýza rovnovážné plynné fáze pomocí plynové chromatografie s plamenovou ionizační detekcí (GC/FID). Analytický postup byl optimalizován. Závěr práce poskytne přehled o reziduálním množství terc-butanolu v připravených vzorcích.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Izolace těkavých organických látek a jejich zakoncentrování

2.1.1 Extrakce plynem

Extrakce plynem je metoda, při které není zapotřebí rozpouštědla. V kombinaci s GC je často používána ke stanovení těkavých složek v plynné fázi a ke stanovení stopových prvků ve vzorcích, které nemohou být stanoveny běžnou analýzou GC. Koncentrace látky v plynné fázi je ovlivněna několika faktory. Množství analytu i v parním prostoru je dáno jeho parciálním tlakem p_i . Parciální tlak sám o sobě je ovlivněn následujícími faktory:

- tlakem par čisté složky p_{i0} ,
- koncentrací analytu i (x_i),
- aktivitním koeficientem y_i analyzovaného vzorku. Parciální tlak je dán rovnicí (2–1):

$$p_i = x_i \cdot y_i \cdot p_{i0} \quad (2-1)$$

Plocha píku F_i udává míru zastoupení i -té složky v plynné fázi $F_i = (p_i)$ a je dána vztahem (2–2):

$$F_i = f(x_i \cdot y_i \cdot p_{i0}) \quad (2-2)$$

Koncentrace analytu v plynné fázi je ovlivněna teplotou a dobou temperace. Protože je tlak par závislý na teplotě, je velmi důležité ji dodržet a regulovat. Dále je třeba vzít v úvahu i dobu potřebnou k dosažení rovnováhy tlaku páry, která je závislá na druhu stanovovaného analytu [1].

Zde jsou uvedeny dvě metody analýzy plynné fáze:

- *statická* – Analýza rovnovážné plynné fáze (Head-Space),
- *dynamická* – Vynášení plynem (stripování – Purge and Trap) [2].

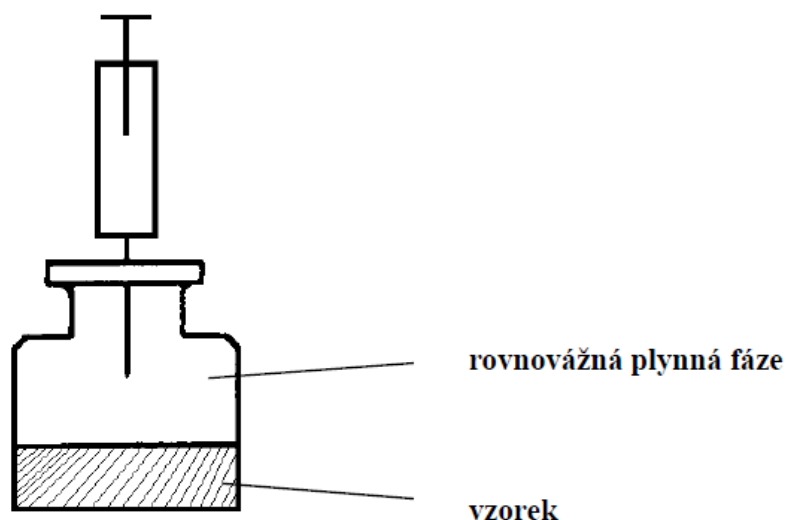
Analýza rovnovážné plynné fáze (statický Head-Space)

Analýza probíhá v uzavřeném systému, kde dochází k ustavení rovnováhy mezi analyzovaným vzorkem a plynnou fází [1]. Jednoduchý náskres zařízení je uveden na Obrázku 1. Malý objem plynné fáze se po dosažení rovnováhy v systému dávkuje do GC. Ustavení rovnováhy je ovlivněno fyzikálními vlastnostmi matrice. V rovnovážném stavu je rozdělovací koeficient K dán následující rovnicí (2–3):

$$K = \frac{c_s}{c_g}, \quad (2-3)$$

kde c_s je koncentrace analytu ve vzorku a c_g je koncentrace analytu v plynné fázi.

Vhodný vzorek pro metodu extrakce plynem by měl obsahovat co nejvyšší koncentraci těkavých látek, které snadno přejdou do plynné fáze a co nejméně látek, které by mohly stanovení rušit. Zvolením vhodné teploty se zlepší přenos těkavých analytů do plynné fáze.



Obrázek 1: Náskres zařízení pro statický Head-Space [2]

Princip:

Do vialky, která je uzavřena septem (teflonovou folií dovnitř) se umístí potřebné množství vzorku. Vialka se nechá určitou dobu temperovat ve vodní lázni při teplotě, která se odvíjí od bodu varu analytu. Temperuje se zpravidla do dosažení rovnováhy systému, což se stanovuje experimentálně. Do plynné fáze přejdou těkavé látky.

Po dosažení rovnováhy je pomocí plynotěsné stříkačky odebráno alikvotní množství plynné fáze, a to je analyzováno pomocí plynové chromatografie (manuální provedení). Aby plynná fáze nekondenzovala, musí být teplota plynotěsné stříkačky vyšší než teplota vodní lázně. Při automatické analýze je alikvotní množství odebráno automatickým dávkovačem [2, 3].

Vynášení plynem (stripování – Purge and Trap)

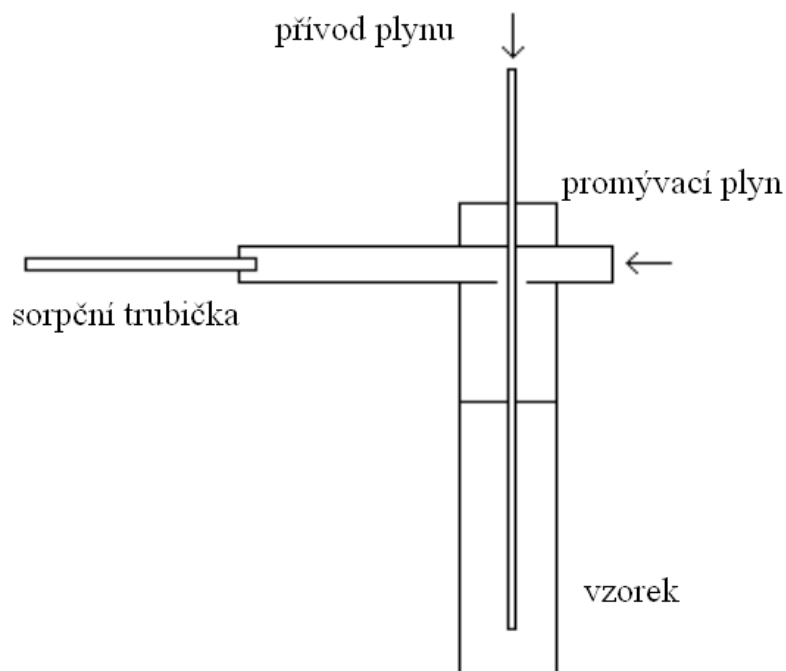
Tato metoda umožňuje kvantitativní stanovení těkavých složek při velmi nízkých mezích detekce.

Princip:

Principem je extrakce plynem se zakoncentrováním na tuhém sorbentu. Vzorek se nadávkuje do skleněné nádoby, k jejímuž dnu je zavedena jehla a z té probublává vynášecí (inertní) plyn. Plyn postupuje směrem vzhůru a je veden do sorpční trubičky, ve které se analyt adsorbuje na vhodném sorbentu. Náskres zařízení je uveden na Obrázku 2. Následuje termální desorpce exponovaných trubiček. Teplota a délka desorpce se volí v závislosti na použitém sorbentu. Může být provedena dvěma způsoby:

- a) Při použití speciálního desorbéru v GC je trubička zapojena do proudu nosného plynu před injektor. Ve speciálním termostatu jsou zachycené látky tepelně desorbovány a převedeny přímo na kolonu, kde proběhne analýza [2]. Před kolonu může být umístěn tzv. kryotrap, což je vymrazovací zařízení, které řeší problémy s rozdílnými průtoky nosného plynu skrz sorpční trubičky. Kolona je ochlazená na nízkou teplotu a zachycené těkavé látky jsou zde zafokusovány (zkondenzují). Vstupní průtok plynu je snížen na hodnotu průtoku kolonou, zachycené látky jsou prudce ohřáty z důvodu přestupu do plynné fáze a pokračují na kolonu [4]. Výhodou je převedení celé hmotnosti izolované látky.

- b) Látky, které jsou naadsorbovány se z trubičky eluují malým množstvím organického rozpouštědla a následuje přímý nástřik do injektoru GC [2].



Obrázek 2: Schéma uspořádání metody Purge and Trap [4]

Extrakce kapalinou patří mezi techniky dělicí a je široce využívána při studiu přírodních látek. Je založená na rovnovážné distribuci látky mezi dvě nemísitelné fáze (organická a vodná fáze). Distribuci látky je možno charakterizovat distribučním koncentračním poměrem (2–4):

$$D_{c,A} = \frac{(c_A)_{\text{org}}}{(c_A)_{\text{aq}}}, \quad (2-4)$$

kde $(c_A)_{\text{org}}$ a $(c_A)_{\text{aq}}$ vyjadřují stechiometrické součty koncentrací všech složek, které obsahují látku A ve fázi organické a vodné. Cílem je převést co největší podíl látky A do organické fáze, ve které ji lze snadno izolovat a stanovit.

Těkavé analyty jsou extrahovány z vodného prostředí do organického rozpouštědla. Vzhledem k tomu, že se obě fáze nemísí, vrstva s vyšší hustotou je spodní. Správnou volbou rozpouštědla se analyt přednostně zkoncentruje jen v jedné fázi, čímž se zvýší účinnost extrakce. Obecně platí pravidlo „podobné rozpouští se v podobném“, které říká, že pokud extrahujeme nepolární látky z vody, budeme používat málo polární nebo nepolární rozpouštědla.

Polární rozpouštědla často bývají částečně rozpustná ve vodě, proto bude extrakce kapalinou vhodná především pro zkoncentrování nepolárních látek z vody pomocí rozpouštědla jako je například hexan nebo dichlormethan.

Používané rozpouštědlo by mělo splňovat následující požadavky:

- mělo by být málo rozpustné ve vodě,
- mělo by mít takové chemické vlastnosti, díky kterým bude mít sledovaný analyt vyšší afinitu k rozpouštědлу než k vodě,
- v případě koncentračního kroku, který následuje po extrakci, se musí brát v úvahu i těkavost extrakčního rozpouštědla.

Nevýhodou této techniky je, že všechny sloučeniny (těkavé, semivolatilní i netěkavé) jsou extrahovány během stejné extrakční doby a při odpařování mohou nastat ztráty vysoce těkavých látek [1, 3].

2.1.2 Extrakce tuhým sorbentem (SPE)

Tato metoda je známa pod pojmem „Solid Phase Extraction“. Její hlavní využití je v případech, kdy koncentrace polutantů ve vodě je nižší, než je mez stanovitelnosti použité analytické metody. SPE je založena na rovnovážné distribuci analytu mezi tuhou fází a vodou, přičemž rovnováha je výrazně posunuta ve prospěch tuhé fáze.

Vodný roztok obsahující analyt se přivede do kontaktu s tuhým sorbentem, který má za úkol nasorbovat analyt. Sorpce ostatních složek roztoku je nežádoucí. Po projití roztoku sorpční kolonou je zachycený analyt uvolněn elucí vhodným rozpouštědlem. Lze použít uspořádání *statické*, kdy je roztok vzorku míchán se sorbentem, který je následně odfiltrován. Druhé a využívanější je uspořádání *dynamické*, při kterém roztok vzorku protéká přes sorpční kolonku, která obsahuje vhodné množství sorbentu (řádově miligramy až gramy) [3].

2.1.3 Mikroextrakce tuhou fází (SPME – Solid-Phase Microextraction)

Mikroextrakce tuhou fází (dále jen SPME) je moderní a účinná sorpční/desorpční metoda vhodná pro izolaci analytu a stanovení organických molekul pocházejících z různých druhů matric. Tato technika eliminuje potřebu použití organických rozpouštědel nebo komplikovaných aparatur, proto je její nepřekonatelnou výhodou jednoduchost použití a operativnost. Je šetrná k životnímu prostředí a spoří náklady na provoz.

SPME je snadno reprodukovatelná a výrazně zkracuje čas potřebný pro izolaci stanovovaných sloučenin ve vzorku [5].

Metodu vyvinul tým vědců pod vedením profesora Janusze Pawliszyna na Univerzitě (University of Waterloo) v Kanadském Ontariu. Cílem této techniky je získání analytu v množství, které je detekovatelné, dostatečné a bez dalších nežádoucích příměsí [7].

Princip SPME

SPME je metoda izolační, při které je složka vzorku sorbována na vhodné vlákno (délka 1 až 2 cm), které je pokryto polymerem (vhodná sběrná fáze) a ukryto uvnitř duté ocelové jehly SPME držáku. Tloušťka vrstvy sběrné fáze na povrchu křemenného vlákna je 7 až 100 μm . Jehla slouží k ochraně vlákna před mechanickým poškozením a otěrem a k propíchnutí septa umístěného v uzávěru vialky naplněné analyzovanou matricí.

SPME se od klasických extrakčních technik liší tím, že analyt není ze vzorku extrahován s co nejvyšším výtěžkem, ale pouze do dosažení rovnovážného stavu.

Rovnovážný stav SPME je z fyzikálně chemického hlediska závislý na typu a tloušťce polymeru, kterým je pokryto křemenné vlákno. Množství nasorbovaného analytu závisí na distribuční konstantě, a to tak, že distribuční konstanta s rostoucím bodem varu a molekulovou hmotností analytu roste. Platí, že analyt s nejvyšší distribuční konstantou určuje dobu extrakce.

Obecně se těžké látky lépe sorbují na silnější vrstvu polymeru a semivolatilní látky na vrstvu tenčí. Při práci s kapalnými vzorky je množství analytu sorbované na vlákne v rovnovážném stavu přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku [5, 8]:

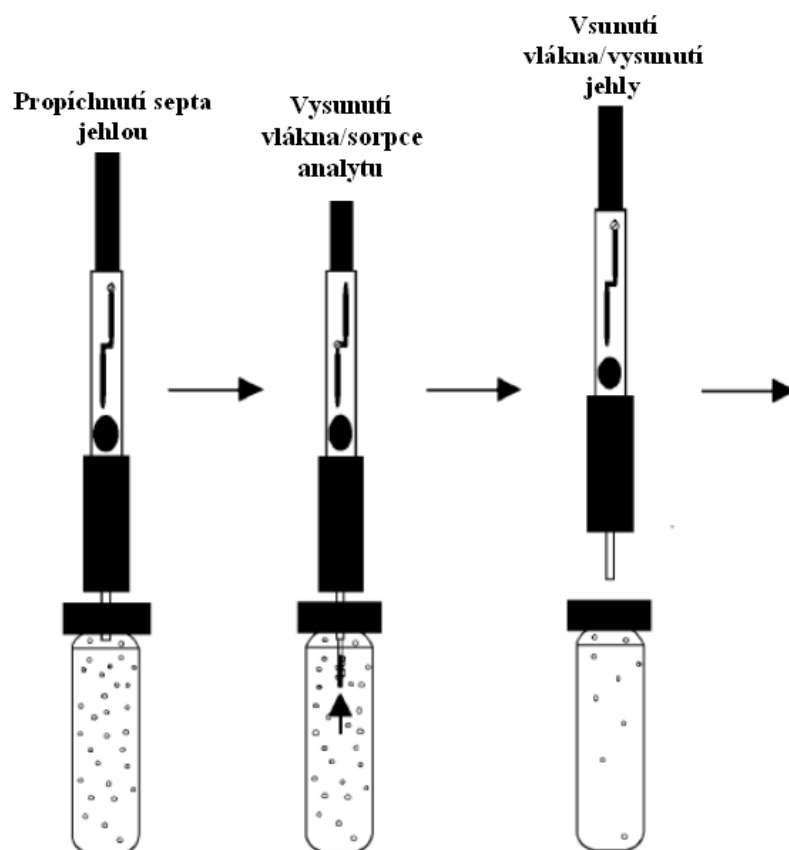
$$n = \frac{K_{vs} \cdot V_v \cdot c_0 \cdot V_s}{K_{vs} \cdot V_v + V_s}, \quad (2-5)$$

kde n udává množství sorbovaného analytu, K_{vs} je rozdělovací koeficient (polymer – voda), c_0 počáteční koncentrace analytu, V_s objem sběrného média (pokrytí) a V_v objem vzorku.

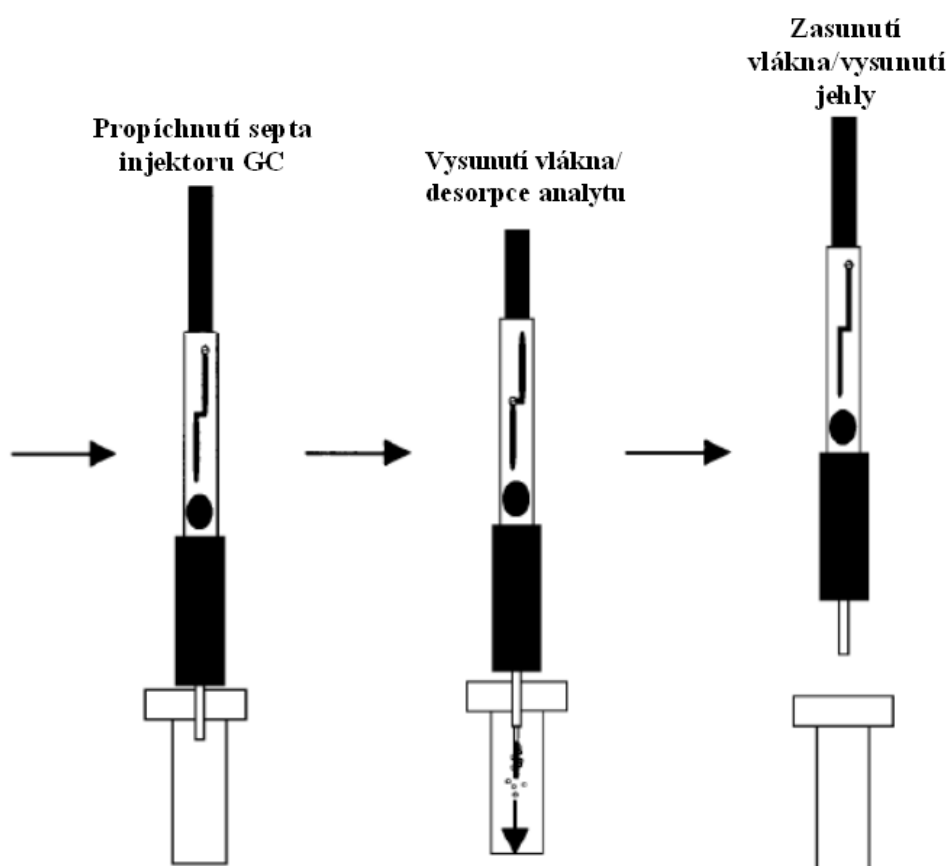
Rovnice (2–5) značí lineární vztah mezi počáteční koncentrací analytu ve vzorku a množstvím analytu sorbovaného na vrstvě polymeru. Organické látky, které tvoří vrstvu vlákna, jsou vybírány podle hodnoty rozdělovacího koeficientu K_{vs} . Čím vyšší rozdělovací koeficient, tím vyšší má vlákno sorpční schopnost [5, 8].

Sorpce analytu je možná buď přímým ponořením vlákna do roztoku (u kapalných vzorků) nebo vzorkováním z rovnovážné plynné fáze (pevné i kapalně vzorky) [2]. Princip SPME je znázorněn na Obrázku 3 a 4.

Touto metodou lze provádět stanovení kvantitativní i kvalitativní. SPME analýza je použitelná v kombinaci s plynovou chromatografií a adaptér SPME-HPLC umožňuje využití i s kapalinovou chromatografií [7].



Obrázek 3: Princip SPME – přímá sorpce [5]



Obrázek 4: Princip SPME – desorpce [5]

Optimalizace SPME

Vhodná volba vlákna zaručuje stanovení látek s nízkou koncentrací a vysoce reprodukovatelné výsledky. Při vlastní aplikaci na analýzu sledovaných látkách je nutné provést optimalizaci extrakčních parametrů. Pro dosažení reprodukovatelnosti výsledků je potřeba dodržet všechny podmínky extrakce a detekce [7, 8]:

Typ SPME vlákna – tloušťka

Rovnovážný stav SPME je závislý na tloušťce a typu polymeru, který pokrývá křemenné vlákno. Množství nesorbovaného analytu závisí na tloušťce vrstvy polymeru a na distribuční konstantě. Silnější vrstva je schopna zachytit větší množství analytu a proto je vhodná na sorpci těkavějších látek. Naopak je tomu u vrstvy tenčí, kde probíhá rychlejší difúze a při tepelné desorpci jsou výše-vroucí látky uvolňovány rychleji [6].

Polarita vlákna, specifický povrch a porozita

Vlákna s nepolárním povrchem sorbují účinněji nepolární analyty a naopak. Do polymerů se přidávají sorbenty - například silně polární Carbowax®PEG v divinylbenzenovém polymeru, který zvětšuje specifický povrch a tím zvyšuje účinnost extrakce malých polárních molekul [6].

Velikost sorpční vialky

Při přímé metodě, kde se ponořuje vlákno přímo do kapalného vzorku, se doporučuje minimalizovat prostor plynné fáze ve vialce [6].

Přídavek soli a hodnota pH

Pokud se před extrakcí přidá do vzorku 25-30 % hmotnostních chloridu sodného nebo se upraví pH vzorku, zvýší se iontová síla a sníží se rozpustnost analytů. Především u látek těkavých a polárních se přídavkem soli výrazně zvýší iontová síla a tím i účinnost extrakce. Naopak u vysokomolekulárních látek se zvýšení iontové síly nedoporučuje, jelikož mohou zapříčinit vznik interferujících píků. Změnou pH je také ovlivněna rozpustnost analytů a to tak, že kyselé složky jsou lépe extrahovány v kyselém prostředí a bazické naopak. Je důležité vhodně zvolit hodnotu pH a vliv iontové síly, aby byla extrakce co nejúčinnější [6, 8].

Míchání vzorku

Míchání usnadňuje transport vzorkovaných molekul ke sběrné fázi, čímž je doba extrakce snížena a účinnost zvýšena. Je žádoucí hlavně u molekul s vyšším difúzním koeficientem [5].

Extrakční mód

Těkavé analyty mohou být vzorkovány dvěma způsoby: buď ponořením vlákna přímo do vzorku, nebo extrakcí na vlákno z rovnovážné plynné fáze. Netěkavé analyty musí být extrahovány pouze ponořením vlákna do vzorku [9].

Dostupné typy vláken a jejich vlastnosti

V následující Tabulce 1 je uveden souhrn vláken, které jsou v dnešní době na trhu dostupná. Jednotlivé sběrné fáze se liší polaritou a sorpčními vlastnostmi. Příprava vzorků metodou SPME má své výhody i nevýhody. Nevýhodou může být nízká schopnost zachytit malé těkavé molekuly, protože tyto látky dosahují rovnováhy rychle a mají nízkou distribuční konstantu. Naopak výhodný je poměrně nízký detekční limit [5].

Tabulka 1: Přehled dostupných SPME vláken [10]

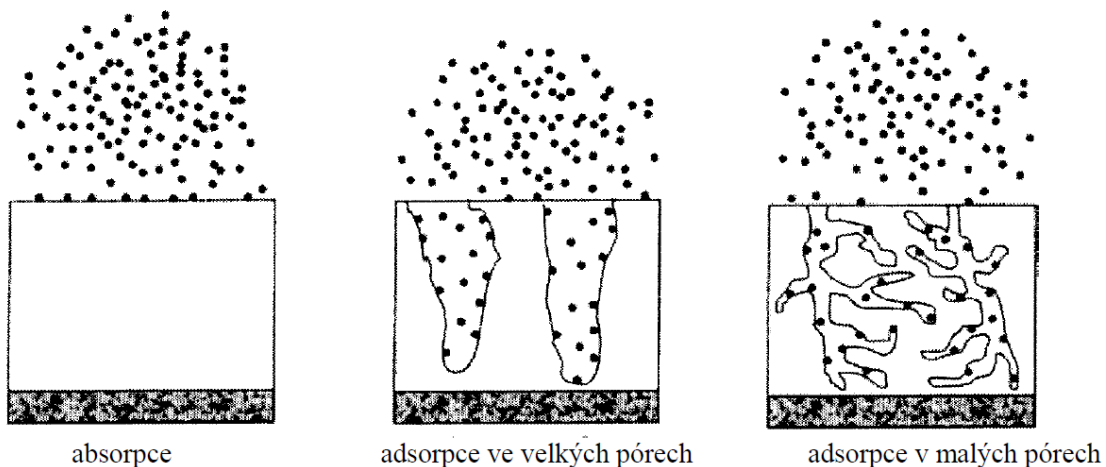
Stacionární fáze	Tloušťka vrstvy	Druh analýzy
Carboxen TM /polydimethylsiloxan (CAR TM /PDMS)	75 µm/StableFlex 85 µm	Plyny a sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, stopové koncentrace těkavých látek
Polydimethylsiloxan (PDMS)	100 µm	Těkavé látky
	30 µm	Nepolární, semivolatilní látky
	7 µm	Nepolární látky s vysokou molekulovou hmotností, slabě polární až nepolární semivolatilní látky
Polydimethylsiloxan/divinylbenzen (PDMS/DVB)	65 µm	Těkavé látky, amino a nitro aromáty
Polyakrylát (PA)	85 µm	Polární, semivolatilní látky
Carbowax TM (PEG) (CW TM)	60 µm	Alkoholy a polární látky
Divinylbenzen/Carboxen TM / polydimethylsiloxan na StableFlex vlákně (DVB/CAR TM /PDMS)	50 µm/30 µm	Těkavé a semivolatilní látky C ₃ –C ₂₀
Divinylbenzen/Carboxen TM nebo polydimethylsiloxan na StableFlex vlákně	50 µm/30 µm délka 2 cm	Stopová analýza složek
polydimethylsiloxan/divinylbenzen (PDMS/DVB)	60 µm	Aminy a polární látky (pouze pro HPLC)

Pozn.: StableFlexTM je nový typ křemenného vlákna s přídavkem polymeru, který zlepšuje mechanické vlastnosti. Carboxen a StableFlex jsou registrované obchodní značky Sigma-Aldrich Co. Carbowax je registrovaná obchodní značka Carbide Corp [10].

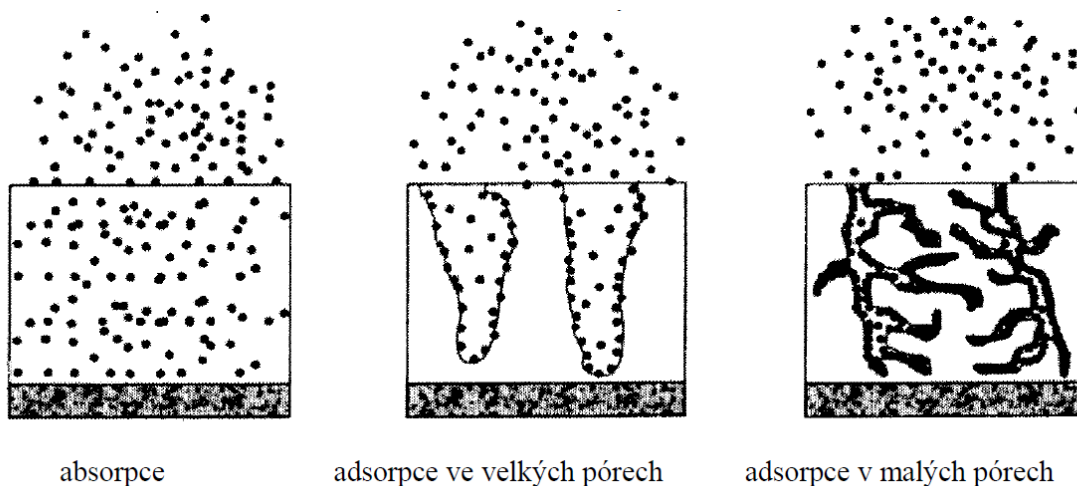
Stacionární fáze

- absorbenty – homogenní čisté polymery (analyt je na vlákně zachycen na základě absorpce),
- adsorbenty – porézní částice suspendované v polymeru (analyt je na vlákně zachycen na základě adsorpce).

Mechanismy sorpce v počátku a v rovnovážném stavu jsou znázorněny na následujících Obrázcích 5 a 6.:



Obrázek 5: Počátek sorpce [6]



Obrázek 6: Rovnovážný stav [6]

Metody vyhodnocení

Metody vyhodnocení jsou blíže popsány v kapitole 2.2.6. V této práci byla aplikována metoda standardního přídávku.

Pro získání shodných a přesných výsledků je nutné optimalizovat desorpční parametry jednotlivých analytů: teplota nástřiku, hloubka vsunutí vlákna do nástřiku, desorpční čas [8]. Jednotlivé kroky při optimalizaci metody jsou zahrnuty v Tabulce 2:

Tabulka 2: Doporučené kroky při optimalizaci metody [6]

			Doporučená metoda kvantifikace		
Skupenství analytu	Typ analytu	Metoda vzorkování	Externí kalibrace	Metoda interního standardu	Metoda standardního přídatku
plyn	jednoduchý	z parní fáze	x		
	komplexní	z parní fáze	x	x	
kapalina	jednoduchý	z parní fáze	x		
		ponoření	x	x	
	komplexní	z parní fáze		x	x
		ponoření			x
tuhá látka	jednoduchý	z parní fáze		x	x
	komplexní	z parní fáze			x

Je důležité uvážit *skupenství vzorku*, zda jde o plyn, kapalinu nebo tuhou látku. Příkladem plynného vzorku může být vzduch získaný při monitoringu životního prostředí. Mezi frekventované kapalně vzorky patří vzorky pitné, odpadní nebo povrchové vody, dále mořská voda, krevní vzorky aj. Mezi tuhé vzorky patří půda, kaly, popel, rybí tkáň a řada dalších.

Dále je nutné posoudit *typ vzorku*, zda se jedná o vzorek jednoduchý nebo o směs látek. Jednoduché vzorky jsou homogenní s nízkým obsahem pevných částic a organických látek (pitná voda). Za směs látek se považují vzorky, které obsahují široké koncentrační rozmezí organických látek a vysoký obsah pevných částic, mohou obsahovat i lipidy a proteiny (způsobují interference na vlákně) [1, 6, 8].

2.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie patří mezi separační metody. Principem je rovnovážné rozdělení složek mezi fází *mobilní* (inertní plyn = nosný plyn) a fází *stacionární* (kapalina nebo tuhá látka), přičemž složky jsou separovány vždy ve fázi plynné [11]. Interakce mezi molekulou plynu (páry) a stacionární fází je dána určitým druhem intermolekulárních sil (rozpuštění, adsorpce) a difúzí [12].

Aby mohl být vzorek touto metodou analyzován, musí být všechny jeho složky vypařeny definovaným způsobem a při vypařování se nesmějí rozkládat. Obecně je GC vhodná zejména pro organické látky s teplotou varu do 400 °C. Je možné analyzovat i látky anorganické, ale jen ty, které splňují podmínku těkavosti. Pokud se jedná o anorganické látky netěkavé, mohou být převedeny na těkavější deriváty a poté analyzovány [11].

2.2.1 Mobilní fáze – nosný plyn

Úloha nosného plynu je důležitá a poměrně jednoduchá. Zajišťuje transport složek kolonou (působí jako přenašeč), přičemž se neúčastní separačního procesu.

Jako nosné plyny se převážně používají permanentní plyny (helium, dusík, vodík, argon). Tyto plyny se v kapalně stacionární fázi nerozpouští.

Stlačitelnost plynu do určité míry ovlivňuje základní výpočty parametrů v GC a samotný separační proces. Aby plyn proudil kolonou, která představuje určitý odpor, je třeba, aby tlak na začátku kolony byl vyšší než tlak na jejím konci, kde bývá převážně tlak atmosférický. Objem plynu je při vyšším tlaku menší. Pokud má chromatografická kolona stále stejný průměr, tak je průtoková rychlost plynu na začátku kolony menší než v místě, kde plyn vychází. K nejrychlejšímu poklesu tlaku dochází ke konci kolony.

Díky proměnné hodnotě tlaku v koloně nelze jednoduše spočítat objemový průtok a tím ani eluční objem, proto se měří tzv. retenční čas složky t_r , průtoková rychlost na výstupu z kolony F_m a vstupní tlak p_i . Výstupní tlak p_0 bývá shodný s tlakem atmosférickým [11].

2.2.2 Retenční charakteristiky

Časové:

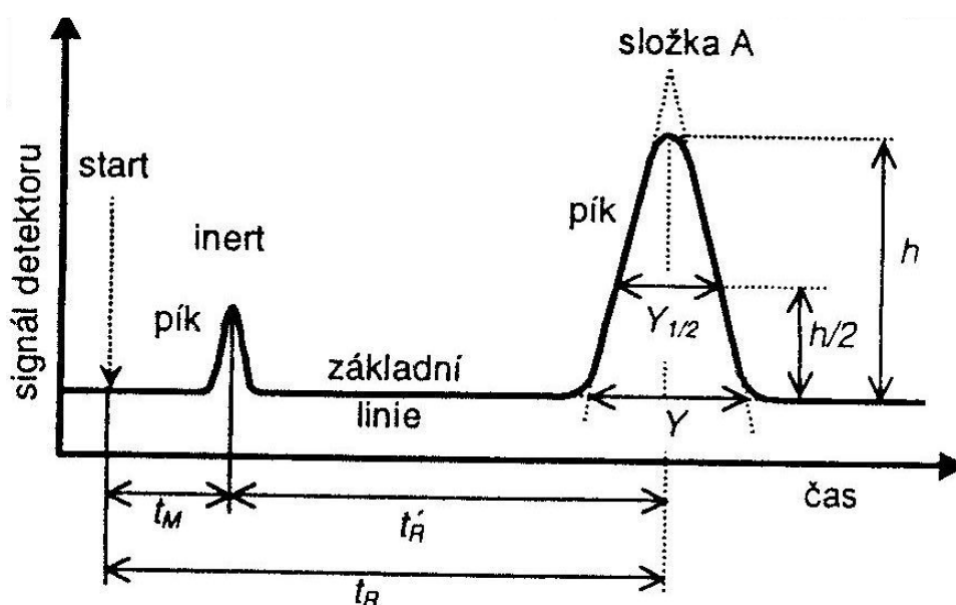
Retenční čas t_r : čas od nástřiku vzorku na kolonu po maximum příslušného píku.

Mrtvý čas t_m : retenční čas nezadržované složky.

Redukovaný retenční čas t'_r : čas strávený ve stacionární fázi.

Zde platí: $t_r = t_m + t'_r$ [13].

Na Obrázku 7 je znázorněna časová charakteristika na příkladu chromatogramu při elučním vyvíjení.



Obrázek 7: Znázornění retenční časové charakteristiky [14]

kde Y je šířka píku v základně (šířka píku v polovině výšky $Y_{1/2}$), h výška píku, A plocha píku [13].

Objemové:

Retenční objem V_r : $V_r = t_r \times F_m$

Mrtvý objem V_m : $V_m = t_m \times F_m$

Redukovaný retenční objem V'_r : $V'_r = V_r - V_m$

Průtoková rychlost mobilní fáze F_m : průchod plynu kolonou je dán přetlakem na vstupu, kde je průtoková rychlost menší.

Při průchodu kolonou dochází k dekompresi. Z rovnosti $(p \cdot V)_{vstup} = (p \cdot V)_{výstup}$ vyplývá, že s klesajícím tlakem se zvyšuje průtok kolonou, což je nežádoucí vliv, který se eliminuje pomocí čistého retenčního objemu V_n .

Čistý retenční objem V_n : $V_n = j \times V_r'$

Kompresibilitní faktor j : koriguje vliv tlakového spádu v koloně a tím i hodnotu redukovaného retenčního objemu.

$$j = \frac{3}{2} \cdot \frac{\left(\frac{p_i}{p_0}\right)^2 - 1}{\left(\frac{p_i}{p_0}\right)^3 - 1} \quad (2-6)$$

Retenční faktor k (kapacitní faktor): poměr časů, které sloučenina během separace stráví ve fázi stacionární a mobilní.

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t_r'}{t_m} = \frac{V_r - V_m}{V_m} \rightarrow \frac{m_s}{m_m} \quad (2-7)$$

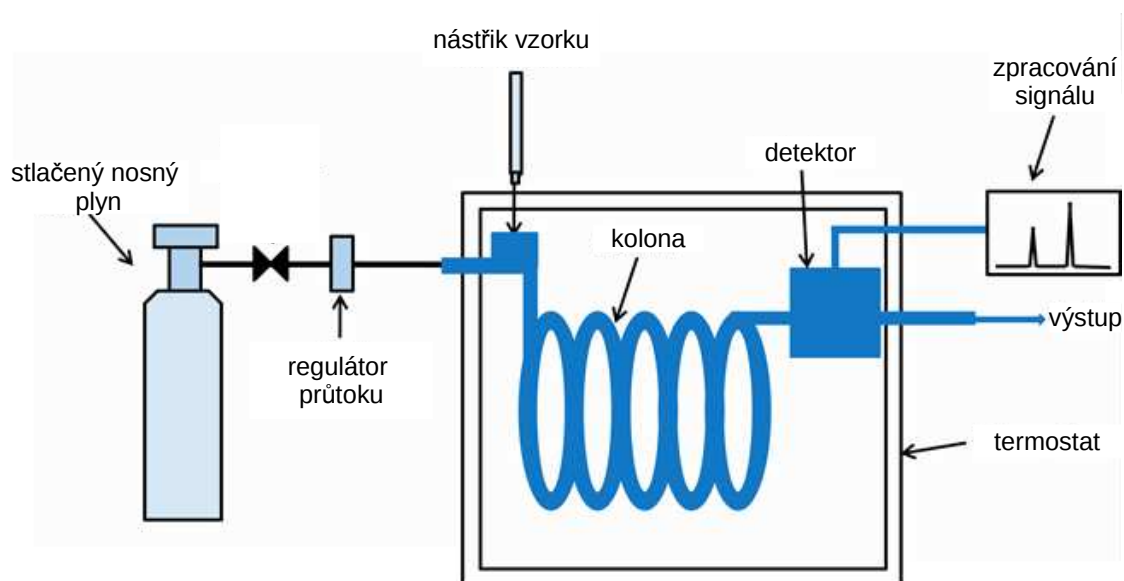
$$k = K_d \times \frac{V_s}{V_m} = K_d \times \beta,$$

kde m_m a m_s jsou hmotnosti separované složky v mobilní a stacionární fázi a β je fázový poměr chromatografického systému.

Distribuční konstanta K_d : naznačuje, jakým způsobem lze ovlivňovat retenci v GC, faktor k se zvyšující se retencí roste [13].

2.2.3 Plynový chromatograf

Na Obrázku 8 je schematicky znázorněn plynový chromatograf. Mezi jeho základní části patří: zdroj nosného plynu (tlaková lahev), zařízení pro regulaci a měření průtoku nosného plynu, injektor, chromatografická kolona, termostat, detektor a zařízení pro zesílení, záznam a vyhodnocení signálu [11].



Obrázek 8: Schéma plynového chromatografu [15]

Nosný plyn

Zdrojem bývá nejčastěji tlaková lahev opatřená regulátorem tlaku (redukčním ventilem). Nosný plyn by měl být vysoké čistoty, bez vlhkosti a bez obsahu kyslíku.

Nástřík vzorku – Injektor

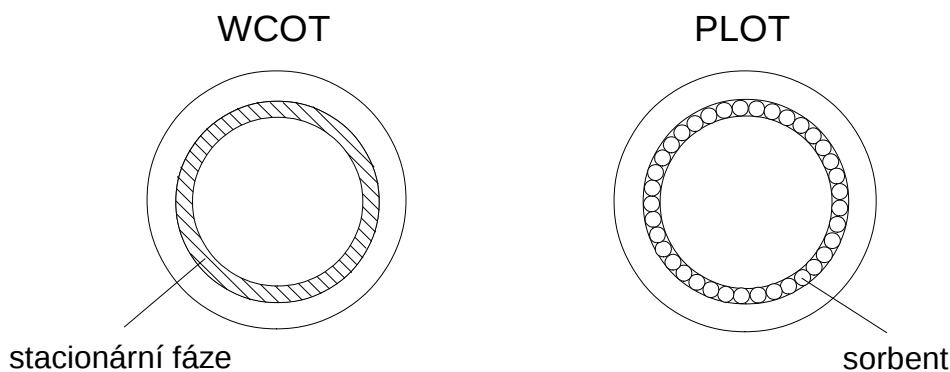
Injektor je připojen ke vstupu do chromatografické kolony. Nástřík kapalného vzorku se provádí nejčastěji pomocí mikrostříkačky skrz septum (speciální pryž odolávající vysokým teplotám), které odděluje vnitřek injektoru od vnějšího prostoru. Součástí injektoru je skleněná vložka (liner), ve které dochází díky vysoké teplotě k mžikovému odpaření vzorku a ke správnému promíchání s nosným plynem. Součástí injektoru pro nástřík vzorku na kapilární kolony je dělič toku (splitter), který umožňuje vést na kolonu jen část odpařeného vzorku. Při stopové analýze nebo při analýze směsi látek, které se výrazně liší bodem varu, se používá bezděličový nástřík (splitless injection) [11].

2.2.4 Kolony v plynové chromatografii

Používají se kolony *náplňové* nebo *kapilární*. *Náplňové kolony* jsou trubice ze skla nebo nerezové oceli o průměru 2 až 5 mm, které obsahují adsorbent nebo kapalnou stacionární fázi zakotvenou na inertním nosiči. Délka náplňových kolon bývá od desítek centimetrů po několik metrů.

Vzhledem k vyšší účinnosti se používají *kolony kapilární*, které jsou vyrobeny z oxidu křemičitého vysoké čistoty. Aby byly odolnější, pevnější a pružnější, potahují se vrstvou polyimidu. Jejich průměr nebývá větší než 0,5 mm, délka se však může pohybovat od desítek metrů až po sto metrů. U kapilárních kolon je stacionární fáze zakotvena na vnitřních stěnách kapiláry [16].

Rozlišujeme dva typy (Obrázek 9):



Obrázek 9: Používané typy kapilárních kolon [3]

WCOT (Wall-Coated Open Tubular)

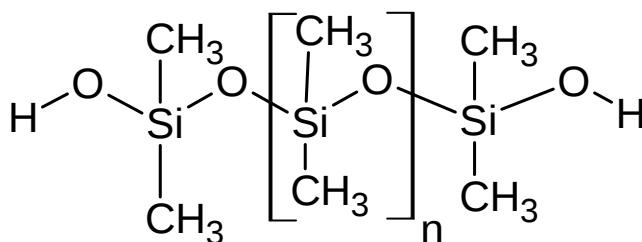
Kolona s tenkým filmem stacionární fáze, který je nanesen přímo na vnitřní straně kolony. Tloušťka filmu bývá od 0,1 až po 3 μm .

PLOT (Porous-Layer Open Tubular column)

Kolona, kde je na vnitřní stěně kapiláry nanesená (chemicky navázána) pórovitá vrstva adsorbentu o tloušťce kolem 10 μm .

Stacionární fáze zadržuje jednotlivé složky vzorku v závislosti na jejich distribučních konstantách. Je volena dle charakteru vzorku, rozsahu teplot varu a měla by být podobného typu jako analyzovaný vzorek.

Dolní hranice použitelnosti je dána teplotou tání stacionární fáze. Horní teplota je dána tenzí par stacionární fáze, která se projeví rušivě na chromatogramu. V současné době se používají stacionární fáze, které jsou převážně na bázi polysiloxanů [11]. Konkrétně například polydimethylsiloxan znázorněný na Obrázku 10.



Obrázek 10: Strukturní vzorec polydimethylsiloxanu [13]

2.2.5 Detektory v plynové chromatografii

Detektor má za úkol poskytnout rozdílné signály při průchodu samotného nosného plynu a při průchodu nosného plynu, který obsahuje eluovanou složku. Je důležité, aby poskytoval stabilní signál, měl co nejnižší minimální detekovatelná množství a dostatečně rychlou reakci na změnu složení procházejícího eluátu.

V plynové chromatografii se používá několik základních typů detektorů [11]:

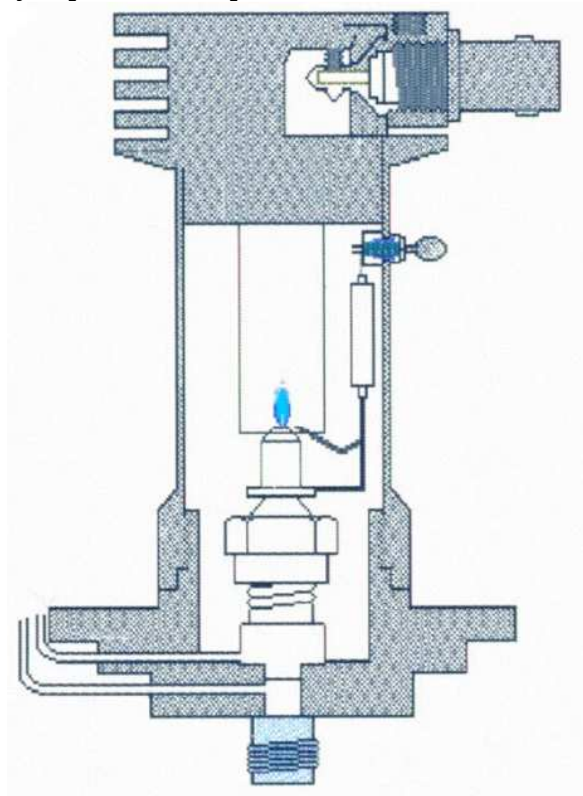
Plamenový ionizační detektor (FID – Flame Ionization Detector)

Detektor FID (znázorněn na Obrázku 11) ionizuje organické sloučeniny v plameni, který je tvořen vodíkem a vzduchem. Ionizace molekul eluovaných z kolony probíhá v plameni, který hoří na kapilární trysce mezi dvěma elektrodami, na které je vloženo jednosměrné napětí (100 až 300 V); jednou elektrodou bývá sám hořáček, druhá je komínkovitého tvaru umístěná nad plamínkem. V čistém vodíkovém plamínku se vyskytuje velmi málo iontů, jejich počet výrazně vzrůstá v přítomnosti stopových množství uhlovodíků. Tepelnou energií, která se uvolní při hoření, se štěpí chemické vazby organických látek za vzniku radikálů, které reagují v redukční zóně plamene s vodíkem za vzniku radikálu $\text{CH}\cdot$. Radikály se oxidují v oxidační zóně za vzniku iontů CHO^+ a uvolnění elektronu (2–8):



V plameni probíhají i paralelní reakce, při kterých vznikají neutrální částice a ionty zanikají rekombinací. Heteroatomy se mohou podílet i na rekombinaci iontů. FID je citlivý na sloučeniny, které tvoří ve vodíkovém plameni radikály $\text{CH}\cdot$. Odezva detektoru závisí na počtu uhlíkových atomů v molekule látky, která za podmínek detekce tvoří ionty CHO^+ . Kromě typu analyzované sloučeniny závisí citlivost detektoru i na jeho konstrukci, ionizačním napětí, toku nosného plynu a vzájemného poměru toku nosného plynu, přídavného plynu a vodíku v detektoru [17].

Pro tuto práci byl k analýze použit GC s plamenově ionizačním detektorem.



Obrázek 11: Schéma plamenově ionizačního detektoru [13]

Detektor elektronového záchytu (ECD – Electron Capture Detector)

Tento selektivní detektor využívá schopnost elektronegativních atomů, funkčních skupin nebo molekul zachytávat elektrony. Radioaktivní β zářič (^3H , ^{63}Ni) ionizuje dusík v měrné cele detektoru a při ionizaci vznikají kationty dusíku a pomalé (tzv. termální) elektrony (viz rovnice (2–9)); měrnou celou prochází konstantní ionizační proud.



Pokud se v nosném plynu objeví složka, která je schopna zachytit pomalé elektrony, dojde ke snížení ionizačního proudu úměrně množství této látky.

ECD je selektivní detektor pro sloučeniny, které obsahují atomy halogenů, fosforu, síry a kyslíku. Citlivost detektoru závisí na elektronegativitě atomu nebo na funkční skupině a její zastoupení v molekule sloučeniny [17].

Tepelně vodivostní detektor (TCD – Thermal Conductivity Detector, katarometr)

Důležitou částí TCD je tenké odporové vlákno, které je umístěné uvnitř kovového bloku. Tímto vláknem prochází konstantní elektrický proud a zahřívá ho na určitou teplotu. Pokud detektorem, který je vyhřátý na konstantní teplotu prochází nosný plyn o stálém průtoku, je i teplota odporového vlákna konstantní. Pokud plyn obsahuje eluovanou složku s jinou tepelnou vodivostí než má nosný plyn, dojde ke změně teploty vlákna a tím i ke změně jeho elektrického odporu [11].

Plamenový fotometrický detektor (FPD – Flame Photometric Detector)

Tento selektivní detektor k detekci využívá emisi záření po excitaci heteroatomu v plameni. Detektor je velmi citlivý zejména na heteroatomy síry a fosforu, ale i na dusík a arsen. Detekce je založena na vzniku excitované HPO^* částice, při přechodu skupiny HPO^* z excitovaného do základního energetického stavu je vyzářeno charakteristické záření ($\lambda = 526 \text{ nm}$ a 565 nm) [13, 17].

Fotoionizační detektor (PID – PhotoIonisation Detector)

Fotoionizační detektor patří mezi detektory selektivní a k ionizaci (2–10) eluované látky využívá UV výbojku ($\lambda = 106 - 150 \text{ nm}$). Používaná energie záření je $8,3 - 11,7 \text{ eV}$.

PID poskytuje signál na aromáty a neposkytuje odezvu na nasycené uhlovodíky [13, 17].



2.2.6 Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení

Kvalitativní analýza

Eluční parametry t_r a V_r jsou nositeli kvalitativní informace. Kvalitativní analýza je založena na porovnání retenčního času neznámé složky a standardu stanovenými při stejných podmínkách chromatografického dělení. Toto stanovení je nutné provést na dvou kolonách s různě polární stacionární fází. Výsledné retenční časy analyzované složky se porovnají s elučními časy standardu a pokud jsou shodné, lze považovat analyzovanou látku za totožnou se standardem [3, 18].

Kvantitativní analýza

Před samotnou kvantitativní analýzou je nutné změřit plochy píků, což se provádí pomocí integrátorů, které jsou zabudovány přímo v ovládacím programu plynového chromatografu. Vlastní výpočet koncentrace lze provést následujícími metodami:

Metoda vnitřní normalizace

Zde se procentové složení směsi (2–11) vypočítá na základě změřených ploch píků A_1 až A_n . Procentový podíl plochy píku A_i se získá dělením integrované plochy píku A_i plochou všech píků a následným vynásobením číslem 100:

$$\% A_i = \frac{A_i}{\sum A_n} \cdot 100 \quad (2-11)$$

Metoda absolutní kalibrace

Někdy je tato metoda označována jako **metoda vnějšího standardu**. Principem je dávkování známého množství analytu a standardu za shodných podmínek. Porovnáním naměřených ploch nebo výšek se provede vyhodnocení.

Metoda vnitřního standardu

Známa je i pod názvem **nepřímá** nebo **relativní metoda**. Do vzorku se přidá jedna nová látka o známém množství, která však nesmí interferovat s ostatními píky vzorku. Není třeba znát množství vzorku, který je dávkován do chromatografu, ale je nutné zjistit odezvové faktory, které se obecně liší pro složku i standard [3]. Tato metoda je využívána velmi často, jelikož eliminuje ztráty během čištění a úpravy vzorku [2].

Metoda standardního přídatku

Ke známému množství vzorku V_v se přidá stanovovaná látka o známém objemu V_p a koncentraci c_p . Nejprve se stanoví plocha píku vzorku bez přídatku A_v a následně zvětšená plocha o přídatek A_p , který však musí být maximálně dvojnásobný. Předpokládá se, že malý objem přidaného standardu nezpůsobí významnou změnu objemu vzorku. Výsledná koncentrace stanovovaného analytu c_v se vypočte dle vztahu (2–12):

$$c_v = \frac{A_v \cdot c_p \cdot V_p}{A_p \cdot (V_v + V_p) - A_v \cdot V_v} \quad (2-12)$$

2.3 Hyaluronan (kyselina hyaluronová)

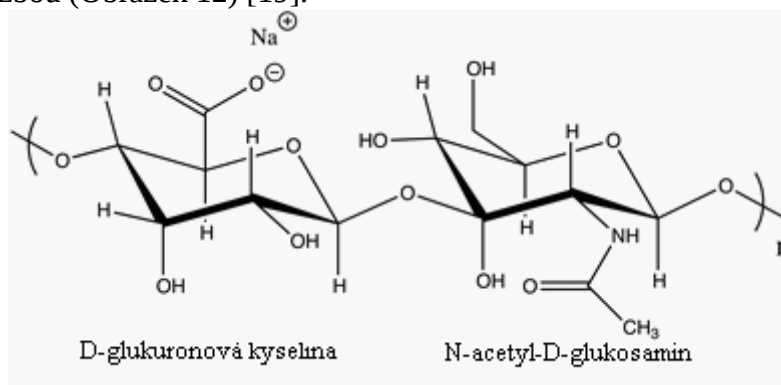
Jako první popsal v roce 1934 Karl Meyer se svým asistentem Johnem Palmerem princip izolace kyseliny hyaluronové z hovězího sklivce [19]. Tato látka se dnes označuje nejčastěji jako hyaluronan (spojení kyselé formy a hyaluronátu). Důvodem je výskyt v živých organismech ve formě soli draselné a sodné [20]. Hyaluronan je přirozeně se vyskytující biopolymer, který zastává několik významných biologických funkcí v tělech savců [21]. Je hlavní součástí výstelkové a nervové tkáně a extracelulárního matrix [22]. Též se vyskytuje v pupeční šňůře a je z více než 50 % přítomný v pokožce [23].

V dnešní době je hyaluronan díky své biologické aktivitě předmětem intenzivního výzkumu v oblastech průmyslových aplikací jako jsou kosmetika nebo léčiva. Vyznačuje se výbornými hydratačními vlastnostmi [24]. Hydratace je jedna z nejdůležitějších biologických funkcí, kterou hyaluronan zastává a byla studována pomocí několika metod, kterými jsou například NMR, ultrazvuková denzitometrická analýza nebo termální analýza [25].

Hyaluronan je typický semiflexibilní polyelektrolyt, jehož vlastnosti jsou závislé na koncentraci a molekulové hmotnosti. Se zvyšující se koncentrací a molekulovou hmotností hyaluronanu se zvyšuje viskozita. 2% hyaluronan již tvoří gel. Přítomnost kyseliny glukuronové způsobuje tvorbu solí s různými kationty. Jednoduché kationty (draslík, hořčík, sodík) jsou zcela rozpustné ve vodě, u polymerních nebo hydrofobních kationtů je to naopak. Rozpustnost v alkoholu a vodě je omezená. V nepolárních rozpouštědlech je kyselina hyaluronová nerozpustná [26].

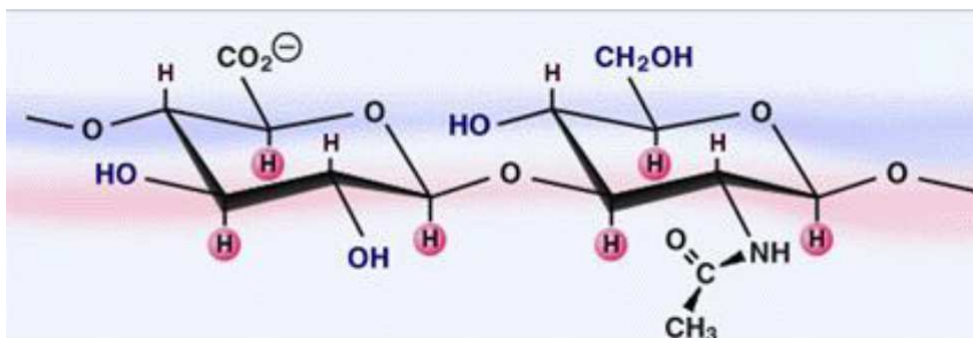
2.3.1 Struktura v roztoku

Hyaluronan je anionaktivní, nerozvětvený a neobsahuje žádné síranové skupiny [20]. Dále je tvořený z disacharidových jednotek, konkrétně z kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu. Tyto jednotky se opakují a jsou spojeny střídavě beta-1,4 a beta-1,3 glykosidickou vazbou (Obrázek 12) [19].



Obrázek 12: Chemická struktura hyaluronanu [22]

Glykosidická vazba umožňuje v β -konfiguraci prostorově větším skupinám přejít do ekvatoriální polohy, která je stericky výhodná, a tato oblast molekuly se stane polární. Druhá oblast je nepolární, což je způsobeno přítomnými vodíkovými atomy, které zaujmají axiální polohu (tzv. „hydrophobic patch“) [19]. Konfigurace hyaluronanu je znázorněna na Obrázku 13.



Obrázek 13: Molekula hyaluronanu s nepolárními (červená) a polárními (modrá) oblastmi [19]

Ve fyziologickém roztoku je molekula hyaluronanu stabilizována několika způsoby. Vazby v cukerných kruzích jsou nejpevnější a nemění se. Glykosidické vazby mezi cukernými kruhy jsou stabilizovány vodíkovými můstky a umožňují otáčení molekuly. Při stabilizaci molekuly jsou důležité i interakce s prostředím, tedy rozpouštědlem. Disacharidové jednotky jsou v řetězci pootočený o 180° vzhledem k další jednotce. Struktura je označována jako dvakrát stočená šroubovice. Cukerné jednotky se každou druhou otáčkou dostávají do původní orientace, a proto se polární a nepolární oblasti opakují po přibližně stejně dlouhých částech.

Pokud je hyaluronan takto stabilizován, tvoří doménové struktury, které jsou dynamické, neustále se pohybují a mají schopnost do sebe pojmout malé molekuly. Mění velikost prostoru v doméně a zároveň i pravděpodobnost průniku molekul o různé velikosti do domény. Řetězec se ve vodném roztoku stočí polární (hydrofilní) oblasti do roztoku a nepolární (hydrofobní) oblasti do domény. Nepolární oblast je tvořena axiálními vodíky, které mohou interagovat s nepolárními látkami.

Tyto nepolární oblasti však většinou interagovat nemohou, jelikož jsou kolem řetězce organizované molekuly vody (hyaluronan je silně hygroskopická látka). Nepolární látky se skrz tento obal obtížně dostávají [27].

2.3.2 Možnosti využití hyaluronanu v oblasti cílené distribuce léčiv

Možnosti interakcí samotného polymeru, který není po odstranění vodného obalu degradován, jsou v posledních letech zkoumány zejména v oblasti chemoterapie. Problémem chemoterapie je nespecifická distribuce léčiva, systémová toxicita a nízká koncentrace samotného léčiva v okolí nádoru.

Novým směrem může být takzvaná cílená distribuce léčiv, která má za úkol tyto problémy obejít a aktivní látku dopravit cíleně k nádoru ve vysoké koncentraci a bez systémové toxicity. Systém, který je určen k cílené distribuci, je složen z léčiva, které je slabě vázáno k makromolekulárnímu nosiči a ten má za úkol dopravit léčivo a uvolnit ho na správném místě, aby mohlo působit.

Vhodným nosičem by mohl být právě hyaluronan, který má mnoho výhodných vlastností uvedených v kapitole 2.3 a zejména interaguje s receptory, které produkují nádorové buňky. Systémy jsou vzhledem ke své složitosti a velkému množství ovlivňujících faktorů předmětem neustálých výzkumů [27].

2.4 Lyofilizace

Lyofilizace neboli sušení mrazem je metoda, která se používá k šetrnému sušení a zvýšení stability různých materiálů. Uplatnění nachází především ve farmaceutickém a biotechnologickém průmyslu, kde se například pracuje s materiálem, který nesnese vyšší teploty (buňky, bakterie). Využívá se především pro materiály, které jsou významné svým použitím, jelikož je tato metoda nákladná a pomalá.

Potřebné složky jsou převedeny do roztoku (voda nebo jiné rozpouštědlo), který je přenesen do lyofilizační baňky a následně je zmrazen. Jakmile je roztok zmražen, baňka se připojí na lyofilizátor, spustí se vakuum a při velmi nízkém tlaku začne docházet k pomalému zahřívání, čímž se sublimací odstraní veškeré přítomné rozpouštědlo. Po odsublímování veškerého rozpouštědla vznikne stabilní porézní koláč, který má nízký obsah vlhkosti a může být skladován po určitou dobu bez chemických a fyzikálních změn [27, 29, 30].

2.4.1 Průběh lyofilizace

Průběh může být rozdělen do tří hlavních kroků: zamrazení (tuhnutí), primární sušení (sublimace ledu) a sekundární sušení (desorpce vázané vody) [30].

Zmrazení

Cílem zmrazování je ochlazování kapalného roztoku, kdy se nejprve tvoří krystaly rozpouštědla, které způsobí zvýšení koncentrace do dané chvíle nezmrazeného roztoku. Dochází ke zvyšování viskozity vzorku do doby, než směs začne tuhnout v celém objemu [27, 31]. Koncentrace se zvyšuje do dosažení teploty skelného přechodu, dále se již nemění. Aby bylo zmrazování kompletní, mělo by probíhat pod tuto teplotu [27]. Proces zmrazení je znázorněn ve fázovém diagramu na Obrázku 14.

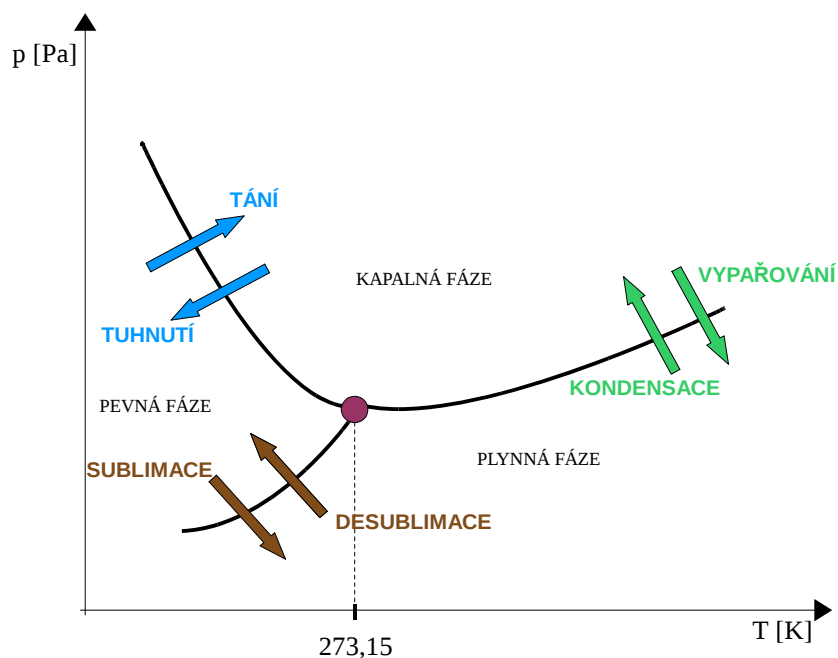
Primární sušení

Primární sušení neboli sublimace je krok, během kterého dochází k přechodu pevné fáze přímo do plynné, za sníženého tlaku. Tlak musí být tak nízký, aby vzorek přecházel přímo do plynné fáze a nedocházelo k tání.

Energie je dodávána ve formě tepla, které je vedeno ke zmrzlému vzorku. Páry procházejí sušeným produktem a pokračují ke kondenzátoru, kde opět zmrznou. V lyofilizační nádobě vzniká porézní lyofilizační koláč, ve kterém póry odpovídají vymraženým krystalům rozpouštědla [27, 30, 31].

Sekundární sušení

Při sekundárním sušení dochází k odstranění vázané vody. Vázaná voda je taková, která nebyla oddělena během mrazení a tedy neodsblímovala. Po této fázi je výsledný produkt stabilní, má stále chemické, fyzikální i biologické vlastnosti a zachovává svůj objem i tvar [27, 30].



Obrázek 14: Fázový diagram vody [27]

2.4.2 Lyofilizační zařízení

Lyofilizátor je tvořen sušicí komorou, do které se umísťují vzorky. Dále je zde komora s kondenzátorem, do kterého přecházejí páry, které se uvolňují ze vzorku. Zde je udržována velmi nízká teplota, která je dána typem konkrétního přístroje (někdy méně než $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$). Podtlak v kondenzátoru a sušící komoře vytvářejí vakuové pumpy a kompresor [27, 32].

2.4.3 Korozpouštědlo

V předkládané práci se při přípravě vzorků určených k lyofilizaci přidává do vodného roztoku určité množství organického korozpouštědla, aby se hydrofobní sonda (perylene) homogenně rozpustila ve vodném roztoku hydrofilního hyaluronanu. Aby byl hyaluronan zbaven vodného obalu takovou cestou, aniž by byl samotný polymer degradován, je roztok lyofilizován.

Korozpouštědlo, konkrétně terc-butanol (dále jen TBA) je do roztoku přidáván z důvodu potřebného zhomogenizování peryleny a hyaluronanu v roztoku. TBA zrychluje i průběh sušení.

TBA je vhodným rozpouštědlem zejména z několika důvodů:

- vytváří při lyofilizaci stabilní prostředí,
- má vysoký tlak nasycených par a bod tání nižší nebo mírně nad pokojovou teplotou,
- není toxický,
- díky vzhledu krystalů (velký ledový krystal ve tvaru jehly) se při primárním sušení snadno a rychle odstraňuje z lyofilizačního koláče [28].

Konečným produktem je lyofilizační porézní koláč, z něhož byla směs rozpouštědel (voda a TBA) odstraněna. Cílem je, aby porézní koláč obsahoval co nejmenší obsah zbytkového rozpouštědla. Pro další aplikace (zejména medicínské) je nežádoucí, aby ve výsledném produktu zůstal reziduální TBA. Cílem této práce tedy bylo analyzovat, zda TBA ve vzorku zůstává a případně v jakém množství.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

- **Hyaluronan**
 - o $M_w = 300\text{--}500$ kDa, CAS 9004-61-9, CPN spol. s r.o., č. šarže 213-3809
 - o $M_w = 130\text{--}150$ kDa, CAS 9004-61-9, CPN spol. s r.o., č. šarže 211-234
 - o $M_w = 1,46$ MDa, CAS 9004-61-9, CPN spol. s r.o., č. šarže 141008-E1
- **Terc-butylalkohol p.a.**
 - o CAS 75-76-0, Lachner, č. šarže 603-005-00-1
- **Perylen**
 - o CAS 198-55-0, Fluka, puris for fluorescence, č. šarže 2059009
- **Aceton p.a.**
 - o p.a.: CAS 67-64-1, Penta, č. šarže 1308200810
- **Demineralizovaná voda:** Millipore Academic, Purelab flex ELGA

3.2 Použité přístroje a pomůcky

3.2.1 Plynová chromatografie

- plynový chromatograf 5890-series II (Hewlett Packard, USA), model: 5890A
 - o kolona Zebron ZB-624, 60 m x 0,32 mm x 1,8 μm
- míchačka IKA[®] RCT BASIC (Labicom s.r.o.)
- technické plyny:
 - o dusík čistoty 4.7 (SIAD Czech, s.r.o.)
 - o technický vzduch (SIAD Czech, s.r.o.)
 - o vodík čistoty 5.5 (SIAD Czech, s.r.o.)

3.2.2 SPME

- vlákno: Carbowax[™]/DVB, 65 μm , orange
- vlákno: PA, 85 μm , white
- držák SPME vlákna

3.2.3 Lyofilizace

- VirTis BenchTop 4K ZL

3.2.4 Ostatní pomůcky

- mikrodávkoč Hamilton 100 μl , 10 μl
- plynotěsný mikrodávkoč Hamilton s teflonovým pístem, objem 100 μl
- běžné laboratorní vybavení

3.3 Pracovní postup

3.3.1 Příprava zásobních roztoků potřebných pro přípravu vzorků

Zásobní roztok hyaluronanu

Zásobní roztok hyaluronanu byl připraven navážením příslušné hmotnosti hyaluronanu o dané molekulové hmotnosti, následným rozpuštěním ve vodě a doplněním v odměrné baňce na objem 50 ml. Roztoky byly po rozpuštění ihned zpracovány.

Zásobní roztok perylenu

Zásobní roztok perylenu o koncentraci 10^{-4} M byl připraven rozpuštěním 0,0013 g perylenu v acetonu a následným doplněním v odměrné baňce na 50 ml. Tento roztok byl uchován v lednici při teplotě 4 °C.

3.3.2 Příprava pracovního roztoku pro optimalizaci metod

Pracovní roztok terc-butanolu

Zásobní roztok terc-butanolu o koncentraci 0,77 mg/ml (3–1) byl připraven napipetováním 25 µl zásobního roztoku TBA do 25 ml odměrné baňky a doplněním Milli-Q vodou po rysku. Tento roztok byl uchováván v lednici při teplotě 4 °C po dobu jednoho měsíce.

$$\begin{aligned} 1 \mu\text{l} &= 0,77 \text{ mg TBA} \\ 25 \mu\text{l} &= 19,25 \text{ mg TBA} \\ c_{\text{prac.roztoku}} &= \frac{m_{\text{TBA}}}{V_{\text{odm.baňka}}} = \frac{19,25}{25} = 0,77 \text{ mg/ml} \end{aligned} \quad (3-1)$$

Tabulka 3: Fyzikální vlastnosti TBA [33]

Rozpouštědlo	Bod tání (°C)	Bod varu (°C)	Hustota při 25 °C (g/cm ³)
terc-butanol	25	83	0,77

3.3.3 Příprava reálných vzorků

Do lyofilizačních baněk bylo napipetováno příslušné množství zásobního roztoku perylenu v acetonu, aby po skončení přípravy, lyofilizaci a dehydrataci byla koncentrace perylenu ve vzorku $5 \cdot 10^{-6}$ M. Poté bylo přidáno příslušné množství TBA. Vzorky byly míchány na třepačce do doby, než se veškerý perylen rozpustil v TBA. Následně bylo za stálého míchání do vzorku připipetováno příslušné množství hyaluronanu tak, aby konečná koncentrace ve vzorku po lyofilizaci a dehydrataci byla 1 g/dm³. Baňky byly uzavřeny, vzorky zhomogenizovány a následně zamrazovány v prostoru kondenzátoru lyofilizátoru při teplotě -105°C po dobu 24 hodin. Dalších 48 hodin probíhala lyofilizace při tlaku přibližně 10 µbar. Lyofilizační baňky byly vždy zváženy bez víčka prázdné a s lyofilizačním koláčem. Za tuto dobu zcela vysublimovala směs vody a TBA. Koncentrace TBA a množství hyaluronanu v připravených vzorcích shrnuje následující Tabulka 4:

Tabulka 4: Koncentrace TBA a množství hyaluronanu ve vzorcích

Sada č.	Vzorek č.	Molekulová hmotnost hyaluronanu	Koncentrace TBA [obj %]	Množství TBA [ml]	Množství zásobního roztoku hyaluronanu [ml]	Množství perylenu $c = 10^{-4}$ M [ml]
1	1	100 kDa	20	10	40	1
	2	400 kDa				
	3	1,4 MDa				
2	1	100 kDa	40	20	30	1
	2	400 kDa				
	3	1,4 MDa				
3	1	100 kDa	60	30	20	1
	2	400 kDa				
	3	1,4 MDa				

Po lyofilizaci byly vzorky rehydratovány 20 ml vody a následovala vlastní analýza příslušnou metodou.

3.4 Optimalizace podmínek SPME

SPME je bezrozpuštědlová technika, která je založena na zakoncentrování analytu na stacionární fázi (polymer), která pokrývá křemenné vlákno. Sorpce analytů probíhá do dosažení rovnovážného stavu. Vzhledem k těkavosti a matici vzorku byl vybrán extrakční mód typu Head-Space (HS), který se používá obecně pro těkavější sloučeniny.

3.4.1 Výchozí podmínky SPME

V Tabulce 5 jsou uvedeny výchozí podmínky pro stanovení reziduálního terc-butanolu v reálných vzorcích.

Tabulka 5: Výchozí podmínky SPME

Typ vlákna:	vlákno CW TM /DVB (65 µm)
Provedení:	Head-Space
Doba temperace:	20 minut
Doba sorpce:	30 minut
Objem vialky:	5 ml
Objem vzorku:	2 ml
Rychlost míchání:	500 ot/min

3.4.2 Volba SPME vlákna

Aby byla technika SPME efektivní, je důležité zvolit vhodné vlákno. Na trhu dostupná vlákna jsou uvedena v Tabulce 1 (kapitola 2.1.3). Liší se polaritou a tloušťkou. Platí, že nepolární analyty se lépe sorbují na vlákna s nepolárním povrchem (polydimethylsiloxan) a polární analyty naopak na vlákna s polárním povrchem (polyakrylát). Ke stanovení těkavých organických látek se mohou použít i vlákna smíšená, která obsahují divinylbenzen (DVB), CarboxenTM (CARTM) nebo CarbowaxTM (CWTM).

Na analýzu TBA byla vybrána vlákna s polární stacionární fází. Použitá vlákna jsou uvedena v Tabulce 6. Získané výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.1.2.

Tabulka 6: Volba SPME vlákna

Typ SPME vlákna	Podmínky
Polyakrylát (PA), 85 µm, bílé	teplota temperace a sorpce: 40 °C doba temperace: 20 minut doba sorpce: 30 minut rychlost míchání: 500 ot/min
Carbowax TM /Divinylbenzen (CW TM /DVB), 65 µm, oranžové	

3.4.3 Volba sorpční doby

Analyt není ze vzorku extrahován v co nejvyšší koncentraci, ale pouze do dosažení rovnovážného stavu, při kterém má metoda SPME maximální citlivost. Vhodnou volbou extrakční doby se může dosáhnout vyšší účinnosti metody. V Tabulce 7 jsou uvedeny doby sorpce, které byly optimalizovány a v kapitole 4.1.3 jsou porovnány výsledky.

Tabulka 7: Doba sorpce - CWTM/DVB vlákno

Doba sorpce	Podmínky
10 minut	teplota temperace a sorpce: 40 °C doba temperace: 20 minut rychlost míchání: 500 ot/min vlákno CW TM /DVB (65 µm)
20 minut	
30 minut	
40 minut	

3.4.4 Volba sorpční teploty

Se zvyšující se extrakční teplotou dochází ke zvyšování prostupu látek směrem k vláknu. Zároveň však dochází i k uvolňování analytu z vlákna. Optimalizací se získá nejvhodnější teplota pro všechna měření. K optimalizaci bylo použito vlákno, které bylo zvoleno jako nejvhodnější (CWTM/DVB, 65 µm) se sorpcí z rovnovážné plynné fáze. Optimalizovány byly teploty uvedené v Tabulce 8. Porovnané výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.1.4.

Tabulka 8: Zvolené teploty sorpce

Teplota sorpce	Podmínky
30 °C	doba temperace: 20 minut doba sorpce: 30 minut rychlost míchání: 500 ot/min vlákno CW TM /DVB (65 µm)
40 °C	
45 °C	
50 °C	
55 °C	
60 °C	

3.5 Stanovení analytů v reálných vzorcích

Ke stanovení reziduálního terc-butanolu v reálných vzorcích byla použita nejprve metoda HS-SPME. V Tabulce 9 jsou uvedeny optimalizované SPME podmínky.

Tabulka 9: Optimalizované podmínky SPME

Zvolené vlákno:	vlákno CW TM /DVB (65 µm)
Provedení:	Head-Space
Doba temperace:	20 minut
Doba sorpce:	30 minut

Metoda SPME se zdála být po vyhodnocení výsledků neobjektivní, proto byla k měření reálných vzorků zvolena metoda přímé analýzy rovnovážní plynné fáze. Optimalizované podmínky byly převážně převzaty z metody HS-SPME s tím rozdílem, že k sorpci nebylo použito vlákno, ale po ustavení rovnováhy bylo odebíráno 100 µl plynné fáze pomocí plynotěsné stříkačky Hamilton. Dále byly použity vialky o objemu 42 ml, do kterých bylo před napipetováním 5 ml vzorku naváženo 1,25 g NaCl p.a. Sůl byla do vzorku přidána z důvodu podpoření přestupu analytu do plynné fáze. Vzorek byl temperován ve vodní lázni na 40 °C a míchán rychlostí 500 ot/min až do ustavení rovnováhy (20 minut).

3.5.1 Zpracování vzorků metodou HS-SPME

Z připraveného množství vzorku (20 ml) byly pipetovány 2 ml do vialky o objemu 5 ml. Do vialky bylo vloženo míchadélko, vialka byla uzavřena víčkem s teflonovým septem a byla vložena do vodní lázně vyhřáté na 40 °C. Vzorek byl míchán při nastavených 500 ot/min. Po uplynutí doby temperace (20 minut) bylo přes septum pomocí manuálního držáku do vialky vsunuto vlákno. Za stálého míchání a zahřívání byla provedena expozice vlákna metodou vzorkování z rovnovážné plynné fáze (vzhledem k těkavosti analytu je tato metoda vhodnější než sorpce z roztoku). Analyt se na vlákno sorboval po dobu 30 minut. Po uplynutí doby sorpce bylo vlákno vsunuto zpět do SPME držáku a přemístěno do injektoru plynového chromatografu, kde bylo vysunuto. Vlivem vysoké teploty v nástřikové komůrce byly zachycené analyty desorbovány a proudem nosného plynu unášeny na kolonu, kde byly analyzovány.

3.5.2 Zpracování vzorku metodou analýzy rovnovážné plynné fáze

Z připraveného množství vzorku (20 ml) bylo pipetováno 5 ml do vialky o objemu 42 ml. Do této vialky bylo před přidáním vzorku naváženo 1,25 g NaCl p.a. Sůl byla do vzorku přidána z důvodu podpoření přestupu analytu do plynné fáze. Vzorek byl míchán pomocí magnetického míchadélka umístěného uvnitř vialky. Po uplynutí doby potřebné k ustavení rovnováhy bylo pomocí plynotěsné stříkačky Hamilton odebráno 100 µl plynné fáze a to bylo vstříknuto do injektoru GC.

Pro tuto metodu byly použity již zoptimalizované hodnoty pro metodu SPME, čili teplota 40 °C a doba ekvilibrace 20 minut.

3.6 Optimalizace podmínek separace

Chromatografická analýza má za úkol rozdělit složky vzorku v co nejkratším čase a k tomu je třeba vyhledat optimální pracovní podmínky. Separace složek je ovlivněná teplotou separace, selektivitou stacionární fáze a separační účinností chromatografické kolony. Dále má na separaci vliv druh nosného plynu, nosič stacionární fáze, teplota dávkovače a další faktory.

3.6.1 Volba chromatografické kolony

Polarita fáze určuje selektivitu (schopnost separovat analyty ve vzorku). Při stanovení TBA byla použita polární kapilární kolona Zebron ZB-624. Základní parametry této kolony jsou uvedeny v Tabulce 10:

Tabulka 10: Parametry kolony

Název:	Zebron ZB-624
Výrobce:	Phenomenex
Rozměry:	60 m x 0,32 mm x 1,8 µm
Teplotní limit:	od -20 °C do 260 °C
Výrobní číslo:	7KM-G005-31

3.6.2 Podmínky GC analýzy

Ke stanovení nesorbovaného množství reziduálního terc-butanolu na SPME vlákno a stanovení TBA analýzou plynné fáze metodou ručního nástřiku rovnovážné plynné fáze byl použit plynový chromatograf Hewlett Packard 5890-series II, přičemž SPME vlákno nebo plynotěsná stříkačka byly vsunuty do injektoru plynového chromatografu.

Během optimalizace metody bylo vybráno takové nastavení, které odpovídalo nejlepším výsledkům. Nejvhodnější nastavení parametrů je uvedeno v následující Tabulce 11:

Tabulka 11: Podmínky GC/FID

Parametry metody	
Technika nástřiku:	bezděličová
Teplota injektoru:	230 °C
Teplotní program:	10 °C/min do 100 °C (zdržení 0 minut)
	40 °C/min do 200 °C (zdržení 1 minuta)
Průtoky plynů:	
- dusík	25 ml/min
- vodík	35 ml/min
- vzduch	350 ml/min
Detekce:	FID detektor

3.7 Kvantifikace

3.7.1 Mez detekce a kvantifikace

Mez detekce a kvantifikace slouží k ověřování vhodnosti, správnosti a spolehlivosti zpracované analytické metody.

Mez detekce (LOD – Limit of Detection) odpovídá koncentraci, při které je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Mez detekce (3–2) dle uzance vyjadřuje trojnásobek výšky šumu základní linie (h_{max}) [34]:

$$LOD = 3 \cdot h_{max} \quad (3-2)$$

Mez stanovitelnosti (LOQ – Limit of Quantification) odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že lze provést kvantitativní vyhodnocení. Mez stanovitelnosti (3–3) je vyjádřena jako desetinásobek výšky šumu základní linie (h_{max}) [34]:

$$LOQ = 10 \cdot h_{max} \quad (3-3)$$

Pro zjištění LOD a LOQ bylo z chromatogramu, který byl výstupem měření záměrně kontaminované Milli-Q vody pomocí pracovního roztoku TBA, určeno průměrné maximální kolísání základní linie (h_{max}) a to tak, že záměrně kontaminovaná Milli-Q voda byla proměřena 5x se stále stejnou koncentrací. Zprůměrováno bylo 5 hodnot maximálního kolísání.

Vypočtené hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny v kapitole 4.3.

3.7.2 Opakovatelnost metody

Opakovatelnost metody udává, jak jsou si dva navzájem nezávislé výsledky měření podobné při dodržení shodných podmínek (podmínky, kdy navzájem nezávislé výsledky měření se získají opakovaným použitím stejné zkušební metody na identickém materiálu, ve stejné laboratoři, stejným pracovníkem za použití stejných zařízení a přístrojů, během krátkého časového úseku) [35].

Aby mohla být vyhodnocena opakovatelnost, bylo provedeno pět měření záměrně kontaminované Milli-Q vody pomocí pracovního roztoku TBA. Opakovatelnost byla vypočtena ze získaných výsledků jako relativní směrodatná odchylka (kapitola 4.3.1).

3.7.3 Metoda standardního přídávku

K vyhodnocení daných analytických postupů byla použita metoda standardního přídávku, kdy se ke známému množství vzorku V_v přidá stanovovaná látka o známém objemu V_p a koncentraci c_p . Nejprve se analyzuje vzorek, u kterého se stanoví plocha píku bez přídávku A_v a následně se do vzorku přidá známé množství stanovované látky o známé koncentraci a stanoví se plocha píku zvětšená o přídavek A_p . Zvětšení odezvy musí být přiměřené, tj. dostatečně výrazné pro spolehlivou kvantifikaci, přitom ale přídavek nesmí ovlivnit termodynamické parametry systému. Předpokládá se, že malý objem přidaného standardu nezpůsobí významnou změnu objemu vzorku ani změny hodnot distribučních koeficientů [35].

Výsledná koncentrace stanovovaného analytu ve vzorku se vypočte dle rovnice (3–4):

$$c_v = \frac{A_v \cdot c_p \cdot V_p}{A_p \cdot (V_v + V_p) - A_v \cdot V_v} \quad (3-4)$$

Jako standardní přídavek byl brán pracovní roztok TBA o koncentraci 0,77 mg/ml. Při stanovení reálných vzorků byl roztok dávkován pomocí mikrodávkovače do reálných vzorků. Přípravky byly závislé na druhu připraveného vzorku, proto se v jednotlivých případech lišily.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace podmínek SPME

Optimální pracovní podmínky jsou důležité k rozdělení složek vzorku v co nejkratším čase. Mezi hlavní faktory ovlivňující separaci složek patří druh vlákna, teplota a doba separace. Tyto faktory byly optimalizovány a výsledky jsou shrnuty v následujících kapitolách.

4.1.1 Aktivace vlákna

Před použitím SPME vláken je nutné je kondicionovat (aktivovat). Kondicionace se provádí tak, že se držák SPME vsune do injektoru GC, který je vyhřátý na určitou teplotu (dané výrobcem). Vláknko se vysune a je ponecháno při neměnných podmínkách určitou dobu (dané výrobcem). Pro vlákno CWTM/DVB je to 30 minut při 230 °C a pro vlákno PA 1 hodina při 280 °C.

4.1.2 Volba SPME vlákna

Zvolení vhodného vlákna je důležité k tomu, aby byla technika SPME efektivní. Z dostupných vláken byly vybrány dvě, které se zdály být nejvhodnější a byly určené ke stanovení polárních částečně těkavých a těkavých látek.

Zvolená vlákna:

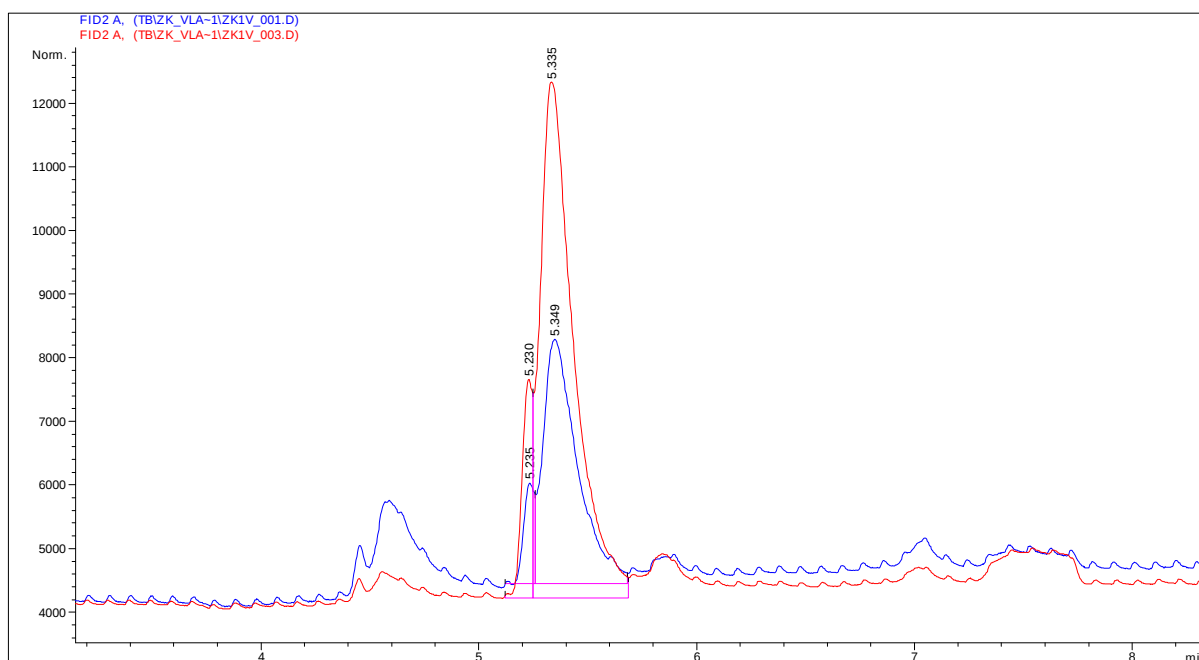
- vlákno s vrstvou polyakrylátu (PA), 85 µm, bílé, vlákno s polárním povrchem,
- vlákno s vrstvou CarbowaxTM/Divinylbenzen (CWTM/DVB), 65 µm, oranžové, vlákno smíšené ke stanovení těkavých organických látek.

Obě vlákna byla proměřena na roztoku o koncentraci 0,005 8 mg/ml TBA (15 µl pracovního roztoku o koncentraci 0,77 mg/ml TBA ve 2 ml Milli-Q vody). Roztok byl v obou případech temperován 20 minut na vodní lázni při 40 °C. Následně byl držák SPME vsunut do plynné fáze a vlákno vysunuto. Sorpce analytu probíhala 30 minut, poté bylo vlákno vsunuto zpět do držáku SPME a analyzováno pomocí GC-FID.

Každé vlákno bylo proměřeno 3x.

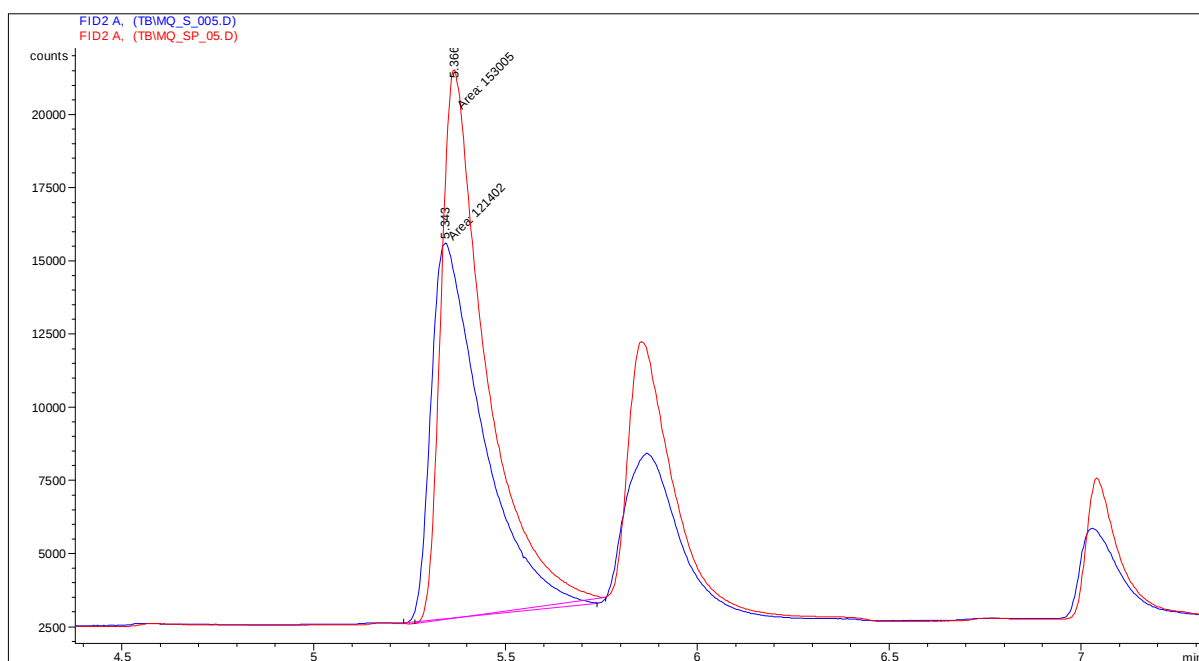
K vlastní analýze bylo vybráno vlákno CarbowaxTM/Divinylbenzen (CWTM/DVB), jelikož při použití vlákna s vrstvou polyakrylátu (PA) nedošlo k viditelnému oddělení píku stanovovaného analytu s píkem předchozím, což by při vyhodnocení metodou standardního přídatku mělo vliv na výsledné koncentrace. Chromatogram, který je výsledkem sorpce analytu na PA vlákno, je uveden na Obrázku 15.

Naopak při použití vlákna CWTM/DVB, které mělo lepší vlastnosti, byly píky lépe rozděleny a měly lepší tvar (Obrázek 16), a proto bylo toto vlákno použito k vlastní analýze vzorků.



Obrázek 15: Chromatogram znázorňující použití PA vlákna, 85 μm , metoda HS-SPME, modrá – vzorek, červená – přídavek

Z Obrázku 15 je patrné, že se terc-butanol nadorboval na PA vlákno v detekovatelném množství, ale jeho pík (retenční čas 5,3) není od předchozího píku dostatečně oddělen. Pro vyhodnocení metodou standardního přídávku je tento jev nežádoucí. Modře je vyznačena záměrně kontaminovaná Milli-Q voda (0,005 8 mg/ml) a červeně je znázorněn přídavek pracovního roztoku TBA.

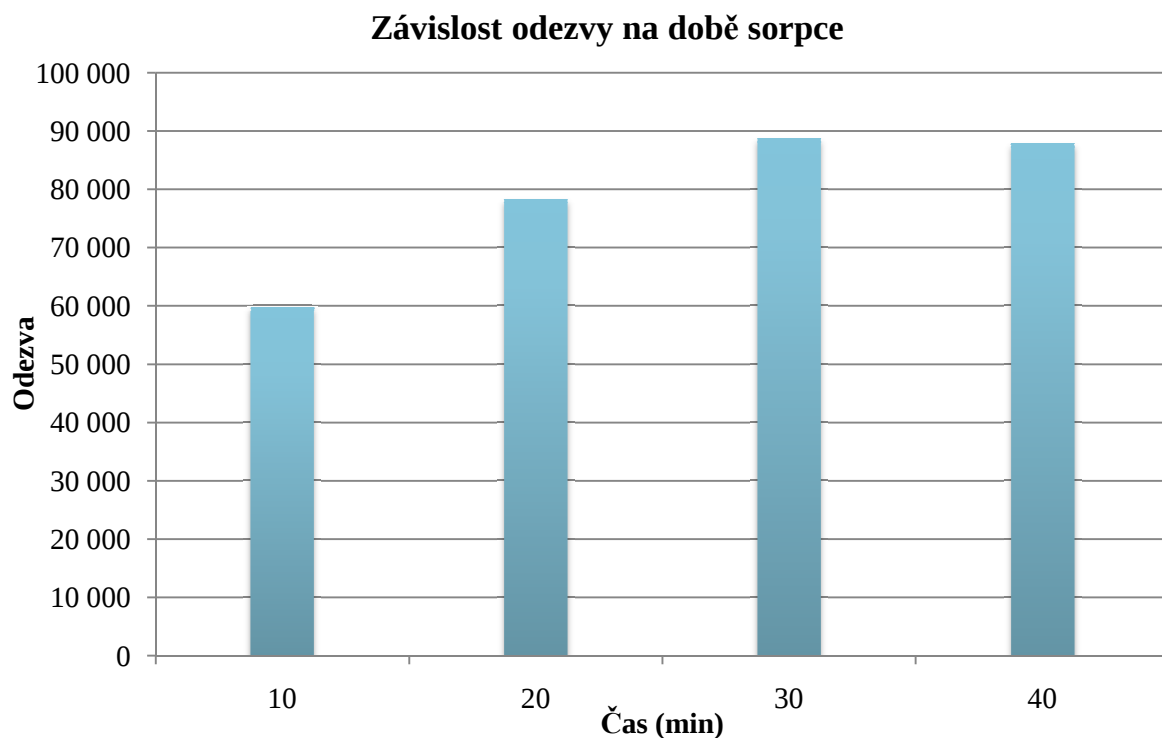


Obrázek 16: Chromatogram znázorňující použití CWTM/DVB vlákna, 65 μm , metoda HS-SPME, modrá – vzorek, červená – přídavek

Z Obrázku 16 vyplývá, že vlákno CWTM/DVB, 65 μm , je ke stanovení vhodné, jelikož pík vzorku a přídávku se shoduje v retenčním čase a je viditelně oddělen od ostatních píků.

4.1.3 Volba sorpční doby

Účinnost metody závisí na správné volbě extrakční doby. Nejprve byl roztok standardu temperován po dobu 20 minut ve vodní lázni při 40 °C a následně byly proměřeny doby sorpce 10, 20, 30 a 40 minut při použití CWTM/DVB vlákna.

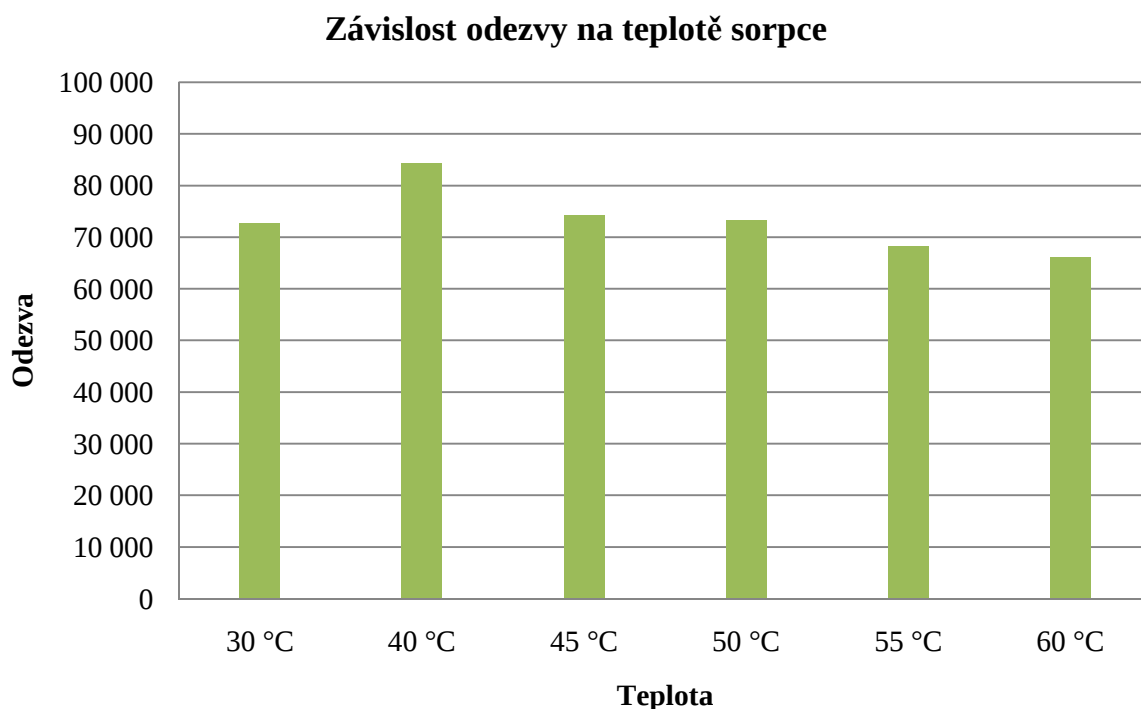


Graf 1: Závislost odezvy sledovaného analytu na době sorpce

Z výše uvedeného Grafu 1 je zřejmé, že se sorbované množství analytu zvyšovalo až do 30 minut od začátku sorpce a s prodlužujícím časem se nezvyšovalo, naopak se mírně snížilo, což je pravděpodobně způsobené zpětnou desorpcí. Z Grafu 1 vyplývá, že nejvhodnější doba sorpce je 30 minut. Za této podmínky byly proměřeny vzorky i přídatky.

4.1.4 Volba sorpční teploty

K určení optimální teploty sorpce byla proměřena teplotní řada 30 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C a 60 °C. Měření bylo prováděno na vlákne CWTM/DVB, 65 µm, sorpcí z plynné fáze. Doba temperace ve vodní lázni při daných teplotách činila 20 minut a doba sorpce 30 minut. Výsledky měření jsou znázorněny v Grafu 2.



Graf 2: Závislost odezvy sledovaného analytu na teplotě sorpce

Z Grafu 2 vyplývá, že se zvyšující se teplotou roste odezva analytu do teploty 40 °C, při vyšších teplotách odezva mírně klesá. Může to být způsobeno únikem analytu skrz propíchnuté septum. Jako optimální byla zvolena teplota 40 °C. Při této teplotě byly měřeny vzorky i přídatky.

4.2 Stanovení analytů v reálných vzorcích

Ke stanovení reálných vzorků byla nejprve použita metoda HS-SPME. Po proměření několik reálných vzorků bylo zjištěno, že tato metoda nevykazuje opakovatelné výsledky. Z tohoto důvodu byla navržena metoda ručního nástřiku rovnovážné plynné fáze, která již vykazovala opakovatelné výsledky.

4.2.1 Stanovení reziduálního terc-butanolu ve vzorcích metodou HS-SPME

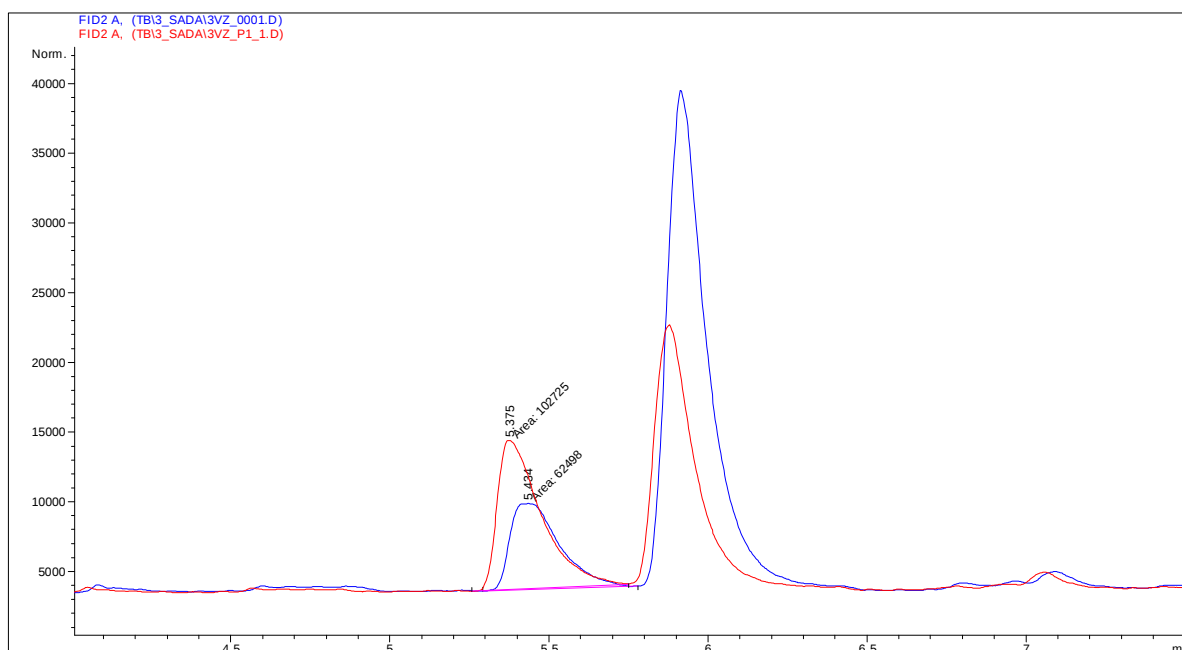
V kapitole 3.5.1 je uvedeno, jakým způsobem byly vzorky zpracovány a proměřeny. V následujících Tabulkách 12 a 13 jsou uvedeny vypočtené koncentrace reziduálního terc-butanolu ve vzorcích po lyofilizaci. Koncentrace ve vzorcích byly stanoveny metodou standardního přídatku (3.7.3).

Tabulka 12: Reziduální množství TBA ve vzorcích hyaluronanu (koncentrace 20 obj % před lyofilizací), stanovení metodou HS-SPME

Molekulová hmotnost kys. hyaluronové	Koncentrace TBA (obj %) (před lyofilizací)	Výsledná koncentrace reziduálního TBA ve vzorku (mg/ml)				
		Metoda HS-SPME				
		1. měření	2. měření	3. měření	Průměr (mg/ml)	Variační rozpětí R
100 kDa	20	-	0,043 5	0,027 7	0,035 6	42,98 %
400 kDa	20	0,019 5	0,080 6	0,028 1	0,042 7	143,09 %
1,4 MDa	20	0,079 4	-	0,066 7	0,073 1	17,37 %

V Tabulce 12 jsou uvedeny vypočtené koncentrace reziduálního množství terc-butanolu ve vzorcích. Vzorky byly připraveny smísením 40 ml hydrofilního roztoku hyaluronanu o třech různých molekulových hmotnostech (100 kDa, 400 kDa, 1,4 MDa) s 10 ml terc-butanolu (odpovídá 20 obj %), ve kterém byla rozpuštěna hydrofobní sonda perylen, a následnou lyofilizací a rehydratací. Při přípravě vzorku 1. sady (100 kDa) a 2. sady (1,4 MDa) není uvedena koncentrace, jelikož byl vzorek během přípravy znehodnocen.

Z hodnot výsledných koncentrací je patrné, že se neshodují, tudíž jednotlivá měření nebyly objektivní.



Obrázek 17: Chromatogram vzorku, 100 kDa, 20 obj% terc-butanolu, 2. měření, HS-SPME
modrá – vzorek, červená – přídavek

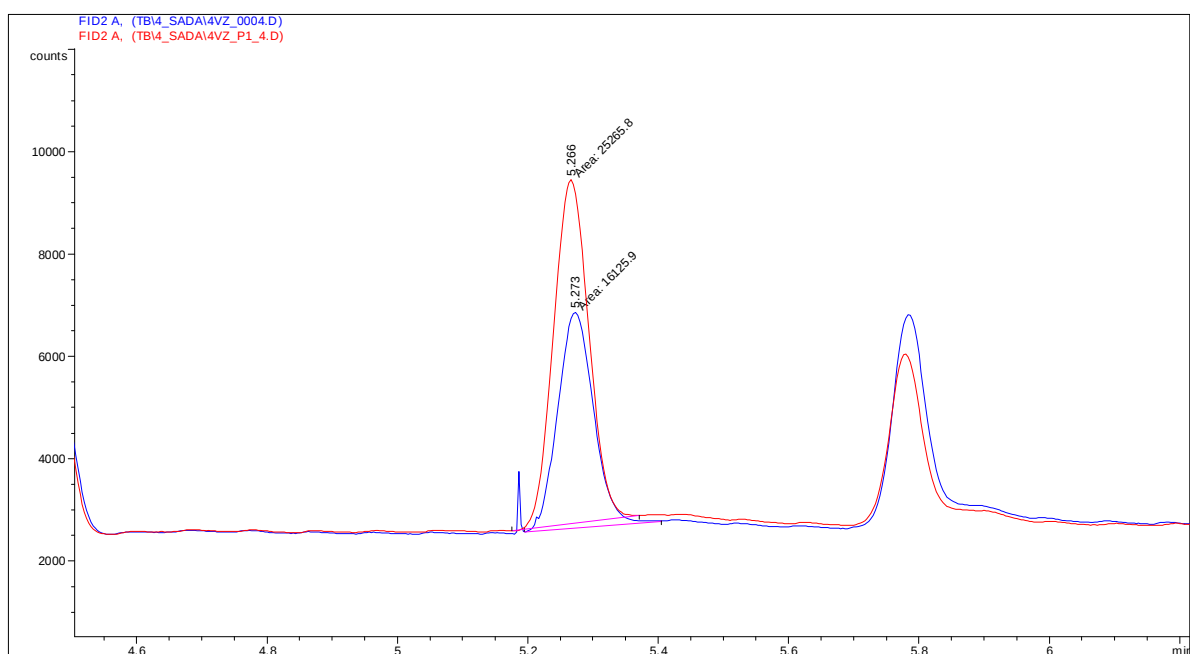
Na Obrázku 17 je znázorněn chromatogram naměřeného vzorku o molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové 100 kDa a koncentraci 20 obj % terc-butanolu. Modrý chromatogram značí vzorek, červený pak vzorek s přídavkem 15 μ l roztoku terc-butanolu o koncentraci 3,85 mg/ml. Retenční čas vzorku činí 5,434 a přídavku 5,375.

Tabulka 13: Reziduální množství TBA ve vzorcích hyaluronanu (koncentrace 40 obj % před lyofilizací), stanovení metodou HS-SPME

Molekulová hmotnost kys. hyaluronové	Koncentrace TBA (obj %) (před lyofilizací)	Výsledná koncentrace reziduálního terc-butanolu ve vzorku (mg/ml)				
		Metoda HS-SPME				
		1. měření	2. měření	3. měření	Průměr (mg/ml)	Variační rozpětí R
100 kDa	40	0,001 8	-	0,057 9	0,029 9	187,63 %
400 kDa	40	0,017 2	0,025 3	0,110 3	0,050 9	182,91 %
1,4 MDa	40	0,018 3	0,044 9	0,026 9	0,030 0	88,67 %

V Tabulce 13 jsou uvedeny vypočtené koncentrace reziduálního množství terc-butanolu ve vzorcích. Vzorky byly připraveny smísením 30 ml hydrofilního roztoku hyaluronanu o třech různých molekulových hmotnostech (100 kDa, 400 kDa, 1,4 MDa) s 20 ml terc-butanolu, (odpovídá 40 obj %) ve kterém byla rozpuštěna hydrofobní sonda perylen, a následnou lyofilizací a rehydratací. Při přípravě vzorku 2. sady (100 kDa) není uvedena koncentrace, jelikož byl vzorek během přípravy znehodnocen.

Výsledné koncentrace jednotlivých měření se neshodují, v případě molekulové hmotnosti 100 kDa a 400 kDa ani řádově, což značí, že výsledky nejsou objektivní. Z vysokých hodnot variačního rozpětí vyplývá, že metoda HS-SPME nevykazuje uspokojivou reprodukovatelnost.



Obrázek 18: Chromatogram vzorku, 100 kDa, 40 obj% terc-butanolu, 3. měření, HS-SPME, modrá – vzorek, červená – přídatek

Na Obrázku 18 je znázorněn chromatogram naměřeného vzorku o molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové 100 kDa a koncentraci 40 obj % terc-butanolu. Modrý chromatogram značí vzorek, červený pak přídavek 100 µl pracovního roztoku terc-butanolu o koncentraci 0,77 mg/ml. Retenční časy jsou následující: vzorek 5,273 a přídavek 5,266.

Jelikož tato metoda nevykazovala opakovatelné výsledky – každý vzorek byl naměřen 3x (kromě výjimek) a výsledné koncentrace reziduálního terc-butanolu se značně lišily – další vzorky byly proto měřeny metodou analýzy rovnovážné plynné fáze, která při optimalizaci záměrně kontaminované Milli-Q vody terc-butanolem vykazovala mnohem přesnější a objektivnější výsledky (4.3.1).

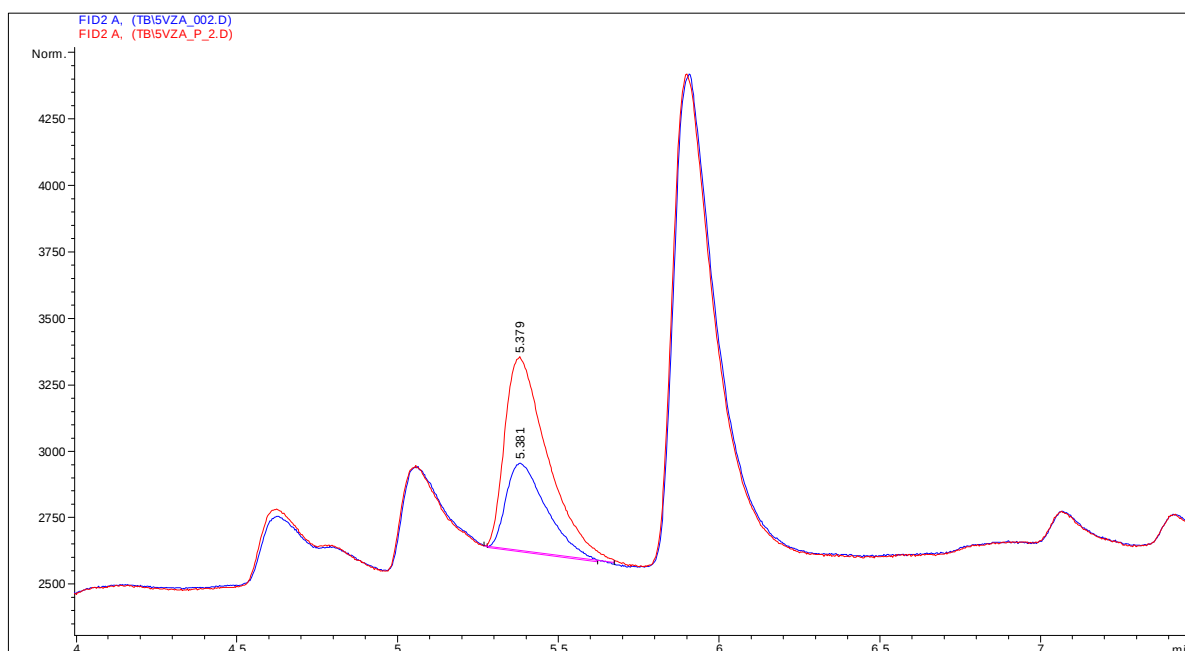
4.2.2 Stanovení reziduálního terc-butanolu ve vzorcích metodou analýzy rovnovážné plynné fáze (Head-Space)

V kapitole 3.5.2 je uvedeno, jakým způsobem byly vzorky zpracovány a proměřeny. V následujících Tabulkách 14, 15 a 16 jsou uvedeny vypočtené koncentrace reziduálního terc-butanolu ve vzorcích po lyofilizaci. Koncentrace ve vzorcích byly stanoveny metodou standardního přídávku (3.7.3).

Tabulka 14: Reziduální množství TBA ve vzorcích hyaluronanu (koncentrace 20 obj % před lyofilizací), stanovení metodou analýzy rovnovážné plynné fáze

Molekulová hmotnost kys. hyaluronové	Koncentrace TBA (obj %) (před lyofilizací)	Výsledná koncentrace reziduálního terc-butanolu ve vzorku (mg/ml)			
		Metoda analýzy rovnovážné plynné fáze			
		1. měření	2. měření	Průměr (mg/ml)	Variační rozpětí R
100 kDa	20	0,002 5	0,002 5	0,002 5	0,00 %
400 kDa	20	0,001 7	0,001 6	0,001 7	5,88 %
1,4 MDa	20	0,005 1	0,004 4	0,004 7	14,89 %

Z hodnot variačního rozpětí vyplývá, že metoda analýzy rovnovážné plynné fáze je lépe reprodukovatelná než metoda HS-SPME, kde variační koeficienty vycházely větší než 100 %.

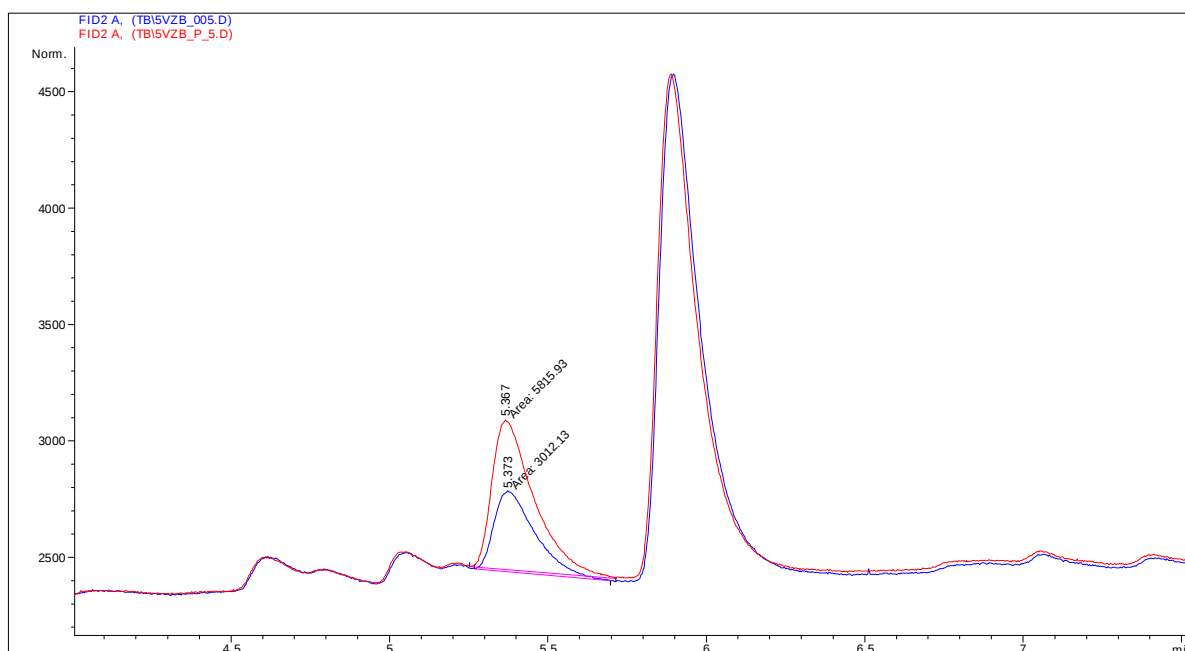


Obrázek 19: Chromatogram vzorku, 400 kDa, 20 obj% terc-butanolu, 1. měření, Head-Space, modrá – vzorek, červená – přídavek

Na Obrázku 19 je znázorněn chromatogram naměřeného vzorku o molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové 400 kDa a koncentraci 20 obj % terc-butanolu. Modrý chromatogram značí vzorek, červený pak přídavek 15 μ l pracovního roztoku terc-butanolu o koncentraci 0,77 mg/ml. Retenční čas vzorku je 5,381 a přídávku 5,379.

Tabulka 15: Reziduální množství TBA ve vzorcích hyaluronanu (koncentrace 40 obj % před lyofilizací), stanovení metodou analýzy rovnovážné plynné fáze

Molekulová hmotnost kys. hyaluronové	Koncentrace TBA (obj %) (před lyofilizací)	Výsledná koncentrace reziduálního terc-butanolu ve vzorku (mg/ml)			
		Metoda analýzy rovnovážné plynné fáze			
		1. měření	2. měření	Průměr (mg/ml)	Variační rozpětí R
100 kDa	40	0,001 6	0,002 2	0,001 9	31,58 %
400 kDa	40	0,001 6	0,001 6	0,001 6	0,00 %
1,4 MDa	40	0,000 2	0,000 5	0,000 4	75,00 %



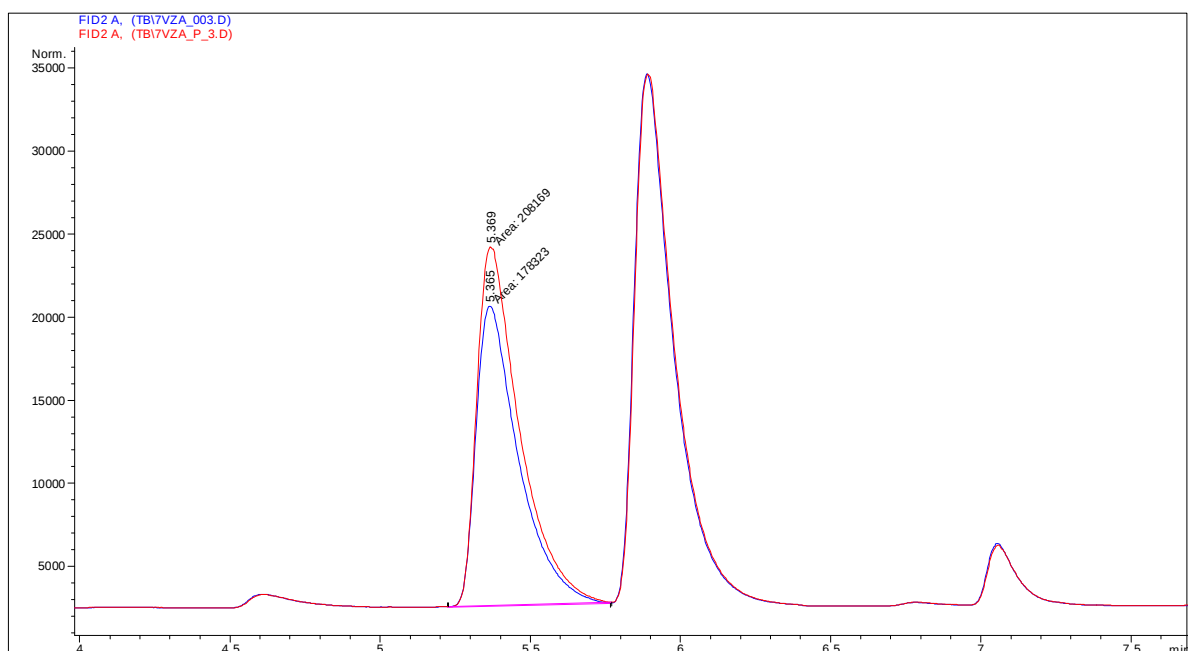
Obrázek 20: Chromatogram vzorku, 400 kDa, 40 obj% terc-butanolu, 2. měření, Head-Space, modrá – vzorek, červená – přídavek

Na Obrázku 20 je znázorněn chromatogram naměřeného vzorku o molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové 400 kDa a koncentraci 40 obj % terc-butanolu. Modrý chromatogram značí vzorek, červený pak přídavek 10 μ l pracovního roztoku terc-butanolu o koncentraci 0,77 mg/ml.

Tabulka 16: Reziduální množství TBA ve vzorcích hyaluronanu (koncentrace 60 obj % před lyofilizací), stanovení metodou analýzy rovnovážné plynné fáze

Molekulová hmotnost kys. hyaluronové	Koncentrace TBA (obj %) (před lyofilizací)	Výsledná koncentrace reziduálního terc-butanolu ve vzorku (mg/ml)			
		Metoda analýzy rovnovážné plynné fáze			
		1. měření	2. měření	Průměr (mg/ml)	Variační rozpětí R
100 kDa	60	0,046 1	0,046 4	0,046 3	0,65 %
400 kDa	60	0,056 7	0,057 4	0,057 1	1,23 %
1,4 MDa	60	0,114 1	0,114 7	0,114 4	0,52 %

Z hodnot variačního rozpětí vyplývá, že metoda analýzy rovnovážné plynné fáze vykazuje uspokojivou reprodukovatelnost.



Obrázek 21: Chromatogram vzorku, 1,4 MDa, 60 obj % terc-butanolu, 1. měření, Head-Space, modrá – vzorek, červená – přídavek

Na Obrázku 21 je znázorněn chromatogram naměřeného vzorku o molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové 1,4 MDa a koncentraci 60 obj % terc-butanolu. Modrý chromatogram značí vzorek, červený pak přídavek 150 μ l pracovního roztoku terc-butanolu o koncentraci 0,77 mg/ml.

4.2.3 Závislost množství reziduálního terc-butanolu na čase

V Tabulce 17 jsou uvedeny výsledné koncentrace měření závislosti reziduálního terc-butanolu ve vzorcích v závislosti na čase. Jeden vzorek byl měřen 3 následující dny po sobě. Z Tabulky 17 je zřejmé, že se množství TBA ve vzorku s přibývajícím časem mění, konkrétně klesá.

Tabulka 17: Změna reziduálního množství terc-butanolu s časem

Koncentrace TBA (před lyofilizací): 20 obj %	Výsledná koncentrace reziduálního terc-butanolu ve vzorku (mg/ml)			
Molekulová hm. kyseliny hyaluronové: 100 kDa	Metoda analýzy rovnovážné plynné fáze			
	1. měření	2. měření	Průměr (mg/ml)	Variační rozpětí R
1. den	0,002 5	0,002 5	0,002 5	0,00 %
2. den	0,002 1	0,002 3	0,002 2	9,09 %
3. den	0,001 9	0,002 0	0,002 0	5,00 %

4.3 Opakovatelnost metody, Mez detekce, Mez kvantifikace

4.3.1 Opakovatelnost metody – Head-Space analýza

V Tabulce 18 jsou uvedeny koncentrace terc-butanolu stanovené z pěti shodných vzorků záměrně kontaminované Milli-Q vody terc-butanolem. Všech pět vzorků bylo připraveno o shodné koncentraci 0,015 4 mg/ml. Postup stanovení je podrobně uveden v kapitole 3.5.2.

Tabulka 18: Výsledné hodnoty, opakovatelnost měření

Měření č.	Výsledná koncentrace reziduálního terc-butanolu ve vzorku (mg/ml)	Výtěžnost (%)
1	0,012 4	80,73
2	0,015 7	101,99
3	0,018 3	118,98
4	0,015 6	101,22
5	0,017 7	115,07
Průměr	0,016 0	103,60
RSD		12,94

Z hodnot uvedených v Tabulce 18 vyplývá, že metoda analýzy rovnovážné plynné fáze (Head-Space) je vhodnější než metoda HS-SPME díky velmi dobré opakovatelnosti.

4.3.2 Mez detekce

Při námi použitým analytickém postupu byla mez detekce stanovena jako výška šumu vynásobená hodnotou 3. Hodnota výšky šumu h_{max} v Tabulce 19 je zprůměrovaná, jelikož při optimalizaci metody byl roztok záměrně kontaminované Milli-Q vody terc-butanolem proměřen 5x.

Tabulka 19: Tabulka stanovené výšky šumu a výšky píku

Měření č.:	Výška šumu	Průměr	Výška píku analytu	Průměr
1	8,5	9,6	5 691,1	5 947,68
2	9		6 169,3	
3	10		6 184,7	
4	10,5		6 039,3	
5	10		5 654,0	
$LOD = 3 \cdot h_{\max} = 9,6 \cdot 3 = 28,8$				
$LOQ = 10 \cdot h_{\max} = 10 \cdot 9,6 = 96$				

Roztok záměrně kontaminované Milli-Q vody terc-butanolem byl připraven napipetováním 100 µl TBA o koncentraci 0,77 mg/ml do 5 ml MiliQ vody. Jeho koncentrace odpovídala 0,015 4 mg/ml (viz následující výpočet (4–1)).

$$c_{stand} = \frac{(c \cdot V)_{prac.roztoku}}{V_{roztoku}} = \frac{0,77 \cdot 0,1}{5} = 0,0154 \text{ mg/ml} \quad (4-1)$$

Mez detekce LOD:

↑	0,015 4 mg/ml		5 947,68	↑
	x mg/ml		28,8	
x = 0,074 6 µg/ml				

Mez detekce definována jako nejmenší množství analytu obsažené ve vzorku, které může být detekováno při použití dané analytické metody, odpovídá hodnotě 0,074 6 µg/ml.

4.3.3 Mez kvantifikace

Při námi použitým analytickém postupu byla mez kvantifikace stanovena jako výška šumu vynásobená hodnotou 10. Hodnota výšky šumu h_{max} v Tabulce 18 je zprůměrovaná, jelikož při optimalizaci metody byl roztok záměrně kontaminované Milli-Q vody terc-butanolem proměřen 5x.

Mez kvantifikace LOQ:

↑	0,015 4 mg/ml		5 947,68	↑
	x mg/ml		96,0	
x = 0,248 6 µg/ml				

Mez kvantifikace definována jako nejnižší koncentrace analytu, která může být stanovena jako exaktní hodnota se stanovenou přesností při použití dané analytické metody, odpovídá hodnotě 0,248 6 µg/ml.

5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo provést optimalizaci metody mikroextrakce tuhou fází a plynové chromatografie pro stanovení reziduálního terc-butanolu v připravených vzorcích. Tento krok by mohl podpořit vývoj nosičových systému a omezit nežádoucí účinky při léčbě nádorových onemocnění. Vzorky byly připraveny smísením hydrofobní sondy a hydrofilního hyaluronanu. Tyto dvě látky by spolu za normálních podmínek neinteragovaly. Důvodem je uspořádání hyaluronanu v roztoku. Je nutné ho zbavit vodného obalu. Pod tímto obalem se totiž skrývají nepolární vodíky, které by mohly s hydrofobní sondou interagovat. Hyaluronan je citlivý a za zvýšené teploty degraduje, proto je nutné ho vodného obalu zbavit šetrnou cestou, kterou může být lyofilizace. Z důvodu podpory interakce sondy s hyaluronanem, byl vzorek lyofilizován za přítomnosti terc-butanolu. Jelikož je terc-butanol hydrofobní organické rozpouštědlo, je tedy otázkou, zda po lyofilizaci nezůstává v porézním koláči reziduální množství, případně jak velké toto množství je.

Ke stanovení reziduálního terc-butanolu byly navrženy dvě metody izolace analytu ze vzorku: metoda mikroextrakce tuhou fází se vzorkováním z rovnovážné plynné fáze (Head-Space SPME) a metoda analýzy rovnovážné plynné fáze (Head-Space). Metoda izolace HS-SPME byla optimalizována. K vlastní analýze bylo vybráno vlákno s vrstvou CarbowaxTM/Divinylbenzen (CWTM/DVB), 65 μm . Bylo zjištěno, že optimální doba sorpce činí 30 minut, teplota ekvilibrace a sorpce 40 °C. Po proměření reálných vzorků pomocí GC/FID bylo zjištěno, že při použití této metody nelze zaručit opakovatelnost a objektivitu výsledků. Z tohoto důvodu byla navržena izolace z plynné fáze metodou analýzy rovnovážné plynné fáze (Head-Space). Tato metoda optimalizována nebyla. Byly převzaty optimalizované podmínky (teplota ekvilibrace a sorpce 40 °C) z metody HS-SPME, které byly vyhovující. Změnou oproti metodě HS-SPME byla velikost vialky (42 ml) a přídavek NaCl p.a. z důvodu zlepšení přestupu analytu do plynné fáze. Tato metoda již vykazovala opakovatelnost i objektivitu výsledků. Je však důležité zmínit, že množství reziduálního terc-butanolu se s postupem času ve vzorcích mění, konkrétně klesá.

Z průměrných koncentrací ve výsledném lyofilizačním koláči vyplývá, že množství reziduálního terc-butanolu je vyšší ve vzorcích obsahujících 60 objemových % terc-butanolu před lyofilizací než ve vzorcích, které před lyofilizací obsahují 20 a 40 objemových %.

Při použití výše uvedeného analytického postupu byla stanovena mez detekce odpovídající hodnotě 0,074 6 $\mu\text{g/ml}$. Dále byla stanovena i mez kvantifikace, která činila 0,248 6 $\mu\text{g/ml}$.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] HOGANTHARANNI. *A Comparative Study of Solvent Extraction, Soxhlet Extraction, Steam Distillation, Headspace Analysis and Headspace Solid Phase Microextraction for the Extraction of Volatile Terpenoid Compounds in the Curry Leaf Plant*. Durban, 2010. Diplomová práce. Faculty of Science and Agriculture, University of KwaZulu-Natal. Vedoucí práce Professor B.S. Martincigh, Professor A. Kindness.
- [2] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *Analytické metody technické praxe: Přednáška č. 3 - Zpracování vzorku*. FCH VUT Brno, 2014.
- [3] POPL, Milan. *Analytická chemie životního prostředí*. 4. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1999, 218 s. ISBN 80-708-0336-3.
- [4] ŠTĚRBA, Karel, Pavel DOSTÁLEK a Marcel KARABÍN. Moderní postupy využívané při přípravě vzorků pro stanovení alkoholů, esterů a kyselin v pivu. *Chem. Listy* [online]. 2011, č. 105, s. 603-610 [cit. 2013-12-18]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_603-610.pdf
- [5] Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions. *Sigma-Aldrich* [online]. 1998 [cit. 2014-01-20]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Bulletin/4547.pdf>
- [6] Mikroextrakce na tuhou fázi SPME: teorie a optimalizace podmínek. *Sigma-Aldrich* [online]. 2011 [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: www.sigmaaldrich.com/img/assets/15720/11.pdf
- [7] *Analýza organických látek v životním prostředí: sborník přednášek ze semináře, 11. - 14. října 2004 v Komorní Lhotce*. Česky Těšín: 2 Theta, 2004. ISBN 80-863-8025-4.
- [8] PAWLISZYN, Janusz. *Applications of solid phase microextraction*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999, xviii, 655 p. RSC chromatography monographs. ISBN 0-85404-525-2.
- [9] PAWLISZYN, Janusz. *Handbook of solid phase microextraction*. 1st ed. Chennai: Elsevier, 2011. ISBN 978-012-4160-170.
- [10] Selection Guide for Supelco SPME Fibers. *Sigma-Aldrich* [online]. 2014 [cit. 2014-02-16]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spme/selecting-spme-fiber.html>

- [11] VOLKA, Karel. *Analytická chemie II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1997, 236 s. ISBN 80-708-0227-8.
- [12] SMOLKOVÁ, Eva. *Analýza látek v plynném stavu*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1991, 478 s. ISBN 80-030-0604-X.
- [13] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *Analytická chemie II: Přednáška č. 8 - Plynová chromatografie*. FCH VUT Brno, 2013
- [14] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [15] *MedicinesComplete* [online]. Royal Pharmaceutical Society. [cit. 2014-02-09]. Dostupné z: <https://www.medicinescomplete.com>
- [16] Chemické sekce: Plynová chromatografie (GC). *ChemInfo* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2011 [cit. 2014-02-09]. Dostupné z: http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf
- [17] TEKEĽ, Jozef a Peter MIKUŠ. *Vybrané kapitoly z analytickej chémie. Analýza látok v biologických systémoch*. 1. vyd. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislavě, 2005. ISBN 80-223-1988-0.
- [18] JANČÁŘOVÁ, Irena a Luděk JANČÁŘ. *Analytická chemie*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 195 s. ISBN 978-80-7157-647-12008.
- [19] HASCALL, Vincent a Torvard LAURENT. Hyaluronan Today: Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online]. 1997 [cit. 2014-03-13]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [20] DICKER, Kevin T., Lisa A. GURSKI, Swati PRADHAN-BHATT, Robert L. WITT, Mary C. FARACH-CARSON a Xinqiao JIA. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomaterialia* [online]. 2014, vol. 10, issue 4, s. 1558-1570 [cit. 2014-04-02]. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.12.019. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706113006156>
- [21] KUČERÍK, J., A. PRŮŠOVÁ, A. ROTARU, K. FLIMEL, J. JANEČEK a P. CONTE. DSC study on hyaluronan drying and hydration. *Thermochimica Acta* [online]. 2011, vol. 523, 1-2, s. 245-249 [cit. 2014-03-13]. DOI: 10.1016/j.tca.2011.04.034. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040603111002632>

- [22] LIU, Chao, Min WANG, Junxue AN, Esben THORMANN a Andra DÈDINAITÉ. Hyaluronan and phospholipids in boundary lubrication. *Soft Matter* [online]. 2012, vol. 8, issue 40, s. 10241- [cit. 2014-03-13]. DOI: 10.1039/c2sm26615f. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2sm26615f>
- [23] STERN, Robert a Howard I. MAIBACH. Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation. *Clinics in Dermatology* [online]. 2008, vol. 26, issue 2, s. 106-122 [cit. 2014-03-13]. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2007.09.013. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X07001976>
- [24] PRŮŠOVÁ, Alena, Frank J. VERGELDT a Jiří KUČERÍK. Influence of water content and drying on the physical structure of native hyaluronan. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2013, vol. 95, issue 1, s. 515-521 [cit. 2014-02-18]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.03.031. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861713002695>
- [25] STERN, R, A ASARI a K SUGAHARA. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology* [online]. 2006-08-03, vol. 85, issue 8, s. 699-715 [cit. 2014-02-18]. DOI: 10.1016/j.ejcb.2006.05.009. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171933506001014>
- [26] Produkty: Farmaceutické suroviny - hyaluronan ve farmacii. *Contipro* [online]. 2011 [cit. 2014-02-18]. Dostupné z: <http://contipro.cz/produkty/farmaceuticke-suroviny/ha-ve-farmacii>
- [27] MICHALICOVÁ, P. *Nativní hyaluronan jako nosič hydrofobních molekul*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 79 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [28] NI, Nina, Marc TESCONI, S.Esmail TABIBI, Shanker GUPTA a Samuel H YALKOWSKY. Use of pure t-butanol as a solvent for freeze-drying: a case study. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2001, vol. 226, 1-2, s. 39-46 [cit. 2014-01-22]. DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00757-8. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517301007578>
- [29] TSINONTIDES, S.C, P RAJNIAK, D PHAM, W.A HUNKE, J PLACEK a S.D REYNOLDS. Freeze drying—principles and practice for successful scale-up to manufacturing. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2004, vol. 280, 1-2, s. 1-16 [cit. 2014-03-26]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.04.018. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517304002479>

- [30] ABDELWAHED, W, G DEGOBERT, S STAINMESSE a H FESSI. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2006-12-30, vol. 58, issue 15, s. 1688-1713 [cit. 2014-03-26]. DOI: 10.1016/j.addr.2006.09.017. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X06001840>
- [31] Freeze Dryers: General Principles of Freeze Drying. *American Lyophilizer, INC* [online]. 2014 [cit. 2014-03-26]. Dostupné z: <http://frezedrying.com/freeze-dryers/general-principles-of-freeze-drying/>
- [32] JENNINGS, Thomas A. *Lyophilization: introduction and basic principles*. Boca Raton: CRC Press, c2002, xvii, 646 s. ISBN 15-749-1081-7.
- [33] Bezpečností list terc-Butylalkohol, Lach-ner, s.r.o. Neratovice (CZ): Lach-ner, 2013.
Dostupné z: http://www.lach-ner.com/files/75-65-0_terc_Butylalkohol_v3_CZ.pdf
- [34] DOUŠA, Michal. *Hplc.cz: Mez detekce a mez stanovitelnosti* [online]. 2013 [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Tip/lod_loq.htm
- [35] Validační program pro statistické zpracování analytických dat. In: *VŠCHT Praha: Ústav konzervace potravin* [online]. [cit. 2014-03-29]. Dostupné z: http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/ana/validace.pdf

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<i>Zkratka</i>	<i>Význam</i>
CAR TM	Carboxen TM
CW TM	Carbowax TM
DVB	Divinylbenzen
ECD	Detektor elektronového záchyty Elektron Capture Detector
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí Environmental Protection Agency
FID	Plamenový ionizační detektor Flame Ionization Detector
FPD	Plamenový fotometrický detektor Flame Photometric Detector
GC	Plynový chromatograf Gas chromatograph
HS	Head-Space analýza
LOD	Mez detekce Limit of Detection
LOQ	Mez kvantifikace Limit of Quantification
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NO _x	Oxidy dusíku
PA	Polyakrylát
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglykol
PID	Fotoionizační detektor Photo Ionisation detector
PLOT	Kolona, kde je na vnitřní stěně kapiláry nanesen absorbent Porous-Layer Open Tubular column
R	Variační rozpětí
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SPE	Extrakce tuhým sorbentem Solid Phase Extraction
SPME	Mikroextrakce tuhou fází Solid-Phase Microextraction
TBA	Terc-butanol
TCD	Tepelně vodivostní detektor Thermal Conductivity Detector
TEAM	Total Exposure Assessment Methodology
VOCs (TOL)	Těkavé organické látky Volatile organic compounds
WCOT	Kolona s tenkým filmem stacionární fáze Wall-Coated Open Tubular