

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přirodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



Analýza polárních látek plynovou chromatografií

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce:

Mgr. Roman Papoušek

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí disertační práce:

doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, aby má disertační práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

vlastnoruční podpis

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, informace, ochotu a vstřícnost během mého postgraduálního studia.

Rád bych poděkoval svým spolupracovníkům z Katedry analytické chemie PřF UP a taktéž Ing. Stanislavu Žákovi ze společnosti Teva Czech Industries s.r.o. za spolupráci při realizaci vybraných experimentů.

Poděkování patří rovněž mé rodině za veškerou podporu, kterou mi během studia věnovala.

Disertační práce vznikla za finanční podpory projektů LO1305, IGA_PrF_2016_016, IGA_PrF_2017_020, IGA_PrF_2018_027, IGA_PrF_2019_028.

SOUHRN

Disertační práce je zaměřena na vývoj nových plynově-chromatografických metod určených pro separaci a stanovení vybraných polárních látek, pro které byly navrženy vhodné derivatizační postupy. Díky chemické derivatizaci bylo možné stanovit i polární sloučeniny, které by v jejich nativní podobě nebylo možno analyzovat. Teoretická část práce pojednává o definici polaritý látek, problematice spojené s jejich analýzou, popisuje příčiny vedoucí k využití chemické derivatizace a v neposlední řadě rovněž podává přehled tradičních i méně častých derivatizačních způsobů. Teoretickou část uzavírají kapitoly poskytující bližší informace o vybraných polárních analytech, pro které byly v rámci této práce navrženy a vyvinuty prekoncentrační a derivatizační postupy, včetně chromatografických a detekčních podmínek.

Výsledky práce zahrnují studium a vývoj metody určené pro současné stanovení akroleinu a akrylamidu, ve vzorcích tabákového kouře a kouře z elektronických cigaret. Pro tento účel byla navržena aparatura umožňující zachyt jak hlavního, tak vedlejšího kouře do vodného prostředí. Z důvodu vysoké polaritý a nízké molekulové hmotnosti akroleinu i akrylamidu, bylo přistoupeno k jejich chemické derivatizaci prostřednictvím bromace, přičemž byla provedena optimalizace celého procesu. Výsledkem této modifikace bylo snížení polaritý obou analytů, zvýšení jejich stability, molekulové hmotnosti a extrahovatelnosti. Vnesením atomů bromu do molekul těchto analytů bylo rovněž dosaženo lepší selektivity a nižších detekčních limitů. Navržená metoda byla úspěšně validována. Limit detekce byl v případě akrylamidu stanoven na 0,27 µg/cig. ek., a pro akrolein na $8,35 \cdot 10^{-3}$ µg/cig. ek. Analýzou reálných vzorků byl zjištěn obsah akroleinu ve všech testovaných vzorcích, tzn. v tabákovém kouři i kouři z elektronických cigaret, u kterých je jeho přítomnost vysvětlena degradací glycerolu nacházejícího se v náplni tohoto zařízení. Přítomnost akrylamidu pak byla prokázána jen v případě kouře z tabákových výrobků, ve kterých akrylamid vzniká prostřednictvím Maillardovy reakce.

Mezi další studie prováděné v rámci této práce patří návrh, vývoj a validace headspace metody určené ke stanovení zbytkových rozpouštědel v kyselině isobutylboronové, která je využívána při syntéze protinádorového léčiva Bortezomibu. Z důvodu vysoké reaktivity a těkavosti této kyseliny bylo nezbytné, pro úspěšné stanovení přítomných zbytkových rozpouštědel, provedení jejího maskování pomocí činidla 1,8-diaminonafthalenu. Touto kondenzační reakcí byl připraven produkt, který již neměl

tendenci přecházet do headspace fáze, a nedocházelo tak k poškozování stacionární fáze kolony jako v případě analýzy nemaskované kyseliny isobutylboronové. Celý navržený proces byl optimalizován a validován podle směrnic mezinárodních lékopisů. Vyvinutá metoda je rutinně využívána ve farmaceutické společnosti Teva, v jejichž spolupráci byl tento projekt řešen.

Další polární látkou, pro kterou byla v rámci této práce navržena analytická metoda, je alloxan. Tato sloučenina je známá svojí schopností způsobovat diabetes a existuje důvodné podezření na její přítomnost v bělené mouce. Alloxan je opět látka reaktivní a nízkomolekulární, pro niž byl vyvinut dvoukrokový derivatizační postup vedoucí ke snížení její polariry a zvýšení stability. V prvním derivatizačním kroku bylo využito dosud nepublikované kondenzační reakce mezi alloxanem a 4,5-dibrom-1,2-fenylendiaminem za vzniku 7,8-dibromalloxazinu, který byl v druhém kroku podroben silylaci. Díky vyšší retenci výsledného derivátu na nepolární stacionární fázi se podařilo získat pík jasně separovaný od matričních složek. Přítomnost dvou atomů bromu v molekule derivátu napomohla jeho citlivé detekci. Funkčnost metody byla ověřena prostřednictvím analýzy vzorku mouky spikovaného alloxanem, avšak u žádného z testovaných reálných vzorků nebyl obsah alloxanu prokázán. Z tohoto důvodu byla zaměřena pozornost na degradační produkty alloxanu – kyselinu alloxanovou a parabanovou. Obě kyseliny bylo možné analyzovat jako TMS deriváty, avšak ani tyto produkty vznikající rozkladem alloxanu nebyly v reálných vzorcích mouky detegovány.

SUMMARY

The dissertation is focused on the development of new gas-chromatographic methods, intended for separation and determination of selected polar substances, for which suitable derivatization procedures have been proposed. Chemical derivatization allowed for determination of polar compounds, which could not be analyzed in their native form. The theoretical part deals with the definition of the polarity of substances, the problems associated with their analysis, describes the causes leading to the use of chemical derivatization and last but not least, it also gives an overview of traditional and less frequent derivatization methods. The theoretical part is terminated with chapters providing more detailed information about selected polar analytes for which preconcentration and derivatization procedures have been proposed and developed, including chromatographic and detection conditions.

The results include the study and method development for the simultaneous determination of acrolein and acrylamide in samples of tobacco smoke and smoke from electronic cigarettes. For this purpose, an apparatus for capturing both the main and the secondary smoke in the aqueous solution has been devised. Due to the high polarity and low molecular weight of acrolein and acrylamide, both analytes were chemically derivatized by bromination. Optimization of the whole derivatization process was performed concurrently. As a result of this modification, the polarity of both analytes was reduced, their stability, molecular weight and extractability increased. Introduction of bromine atoms into the molecules of these analytes led to better selectivity and lower detection limits. The proposed method has been successfully validated. The limit of detection was $0.27 \mu\text{g/cig. eq.}$ for acrylamide and $8.35 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/cig. eq.}$ for acrolein. Analysis of real samples revealed acrolein content in all tested samples, i.e. in tobacco smoke as well as smoke from electronic cigarettes, in which its presence is explained by the degradation of glycerol present in the e-liquid. The presence of acrylamide was proved only in the case of smoke from tobacco products in which acrylamide is generated during Maillard reaction.

Other studies in this thesis include the design, development and validation of a headspace method for determination of residual solvents in isobutylboronic acid, which is used in the synthesis of antitumor drug Bortezomib. Due to the high reactivity and volatility of this acid, it was necessary to use masking derivatization with 1,8-diaminonaphthalene, which allowed the determination of present residual solvents.

This condensation reaction led to formation of a product that no longer tended to transfer into the headspace phase, and thus did not damage the stationary phase of the column as in the case of unmasked isobutylboronic acid. The entire proposed process has been optimized and validated according to international pharmacopoeia guidelines. The developed method is routinely used in the pharmaceutical company Teva, where this project was carried out.

Alloxane is another polar substance for which an analytical method has been proposed. This compound is known for its ability to cause diabetes and there is a reasonable suspicion of its presence in bleached flour. Alloxane is reactive and has low molecular weight. Therefore, a two-step derivatization process has been developed to reduce its polarity and increase stability. In the first derivatization step, a previously unpublished condensation reaction between alloxane and 4,5-dibromo-1,2-phenylenediamine was utilized to give 7,8-dibromalloxazine, which was silylated in the second step. Due to the higher retention of the resulting derivative on the non-polar stationary phase, a peak clearly separated from the matrix components was obtained. The presence of two bromine atoms in the resulting molecule supported its sensitive detection. The performance of the method was verified by analyzing a sample of flour spiked with alloxan, but none of the tested real samples showed alloxane presence. For this reason, attention has been focused on the degradation products of alloxane, alloxanic and parabanic acid. Both acids could be analyzed as TMS derivatives. However, these alloxane decomposition products were not detected in real flour samples.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1. Úvod do plynové chromatografie a chemické derivatizace	2
2.2. Definice polaritý látek	3
2.3. Možnosti chemické derivatizace v plynové chromatografii	4
2.3.1. Silylace	7
2.3.2. Acylace	9
2.3.3. Alkylace	10
2.3.4. Kondenzační reakce	12
2.3.5. Cyklizační reakce	13
2.3.6. Další typy derivatizačních reakcí	14
2.4. Akrylamid a akrolein	14
2.4.1. Metody pro stanovení akrylamidu a akroleinu	16
2.5. Isobutylboronová kyselina – stanovení zbytkových rozpouštědel	22
2.6. Alloxan	25
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	29
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1. GC/MS metoda pro současné stanovení akrylamidu a akroleinu v tabákovém kouři a kouři (aerosolu) z elektronických cigaret [131]	30
4.1.1. Chemikálie, činidla a vzorky	30
4.1.2. Příprava standardu akroleinu	31
4.1.3. Aparatura pro záchyt plynných vzorků	31
4.1.4. Derivatizace	32
4.1.5. Přístrojové vybavení a parametry metody	33
4.1.6. Validační parametry	33
4.2. Stanovení zbytkových rozpouštědel v isobutylboronové kyselině – využití maskovací derivatizace ke zlepšení stability GC kolony [143]	35
4.2.1. Chemikálie, činidla	35
4.2.2. Příprava roztoků a vzorku	35
4.2.3. Optimalizace reakční doby maskovací reakce	37
4.2.4. Přístrojové vybavení a parametry metody	37
4.2.5. Validační parametry	37
4.3. GC/MS metoda pro stanovení alloxanu a jeho rozkladných produktů v mouce ...	40

4.3.1. Chemikálie, činidla a vzorky	40
4.3.2. Příprava vzorku pro stanovení alloxanu v mouce	40
4.3.3. Identifikace produktů vznikajících rozkladem krystalického alloxanu	41
4.3.4. Příprava vzorku pro stanovení kyseliny parabanové a alloxanové v mouce	42
4.3.5. Přístrojové vybavení a parametry metod	42
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	44
5.1. GC/MS metoda pro současné stanovení akrylamidu a akroleinu v tabákovém kouři a kouři (aerosolu) z elektronických cigaret	44
5.1.1. Záchyt plyných vzorků	44
5.1.2. Derivatizace	44
5.1.3. Vývoj metody	46
5.1.4. Validace metody a analýza reálných vzorků	49
5.1.5. Závěr	50
5.2. Stanovení zbytkových rozpouštědel v isobutylboronové kyselině – využití maskovací derivatizace ke zlepšení stability GC kolony	51
5.2.1. Optimalizace maskovací reakce mezi IBBA a DAN	51
5.2.2. Optimalizace headspace GC metody	52
5.2.3. Validace metody a analýza reálných vzorků	54
5.2.4. Závěr	58
5.3. GC/MS metoda pro stanovení alloxanu a jeho rozkladných produktů v mouce... ..	60
5.3.1. Vývoj derivatizační a chromatografické metody	60
5.3.2. Analýza reálného vzorku mouky	61
5.3.3. Identifikace degradačních produktů alloxanu a stanovení kyseliny parabanové a alloxanové v mouce	62
5.3.4. Závěr	65
6. ZÁVĚR.....	66
POUŽITÁ LITERATURA	68
SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	84
ŽIVOTOPIS.....	87
PŘÍLOHY	92

1. ÚVOD

Plynová chromatografie je analytickou separační technikou, která je již po několik desetiletí v mnoha zavedených aplikacích nezastupitelná. Uplatnění nachází jak ve vědecko-výzkumné oblasti, tak také při rutinních analýzách ve farmacii, forenzních a klinických laboratořích, v petrochemickém, potravinářském a kosmetickém průmyslu, monitoringu životního prostředí aj. K jejímu rozšíření přispívají nejen její separační schopnosti, cenová dostupnost a relativně nízké provozní náklady, ale také flexibilita, se kterou lze tuto techniku využít při zcela odlišných aplikacích. Široké spektrum těkavých látek, které lze prostřednictvím této instrumentace analyzovat, je možné díky správně zvolené chemické derivatizaci dále ještě doplnit o řadu dalších analytů. Chemickou modifikací cílových sloučenin je možné dosáhnout významného zlepšení nejen z hlediska jejich separace a detekce, ale taktéž samotné izolace analytů ze vzorku, která může být v případě analýzy polárních látek přítomných v komplexních matricích vcelku komplikovaná. A právě problematice analýzy polárních látek prostřednictvím plynové chromatografie ve spojení s chemickou derivatizací je věnována pozornost v této disertační práci.

Disertační práce je zaměřena na studium, vývoj a aplikaci nových plynově chromatografických metod v analýze polárních sloučenin. Konkrétně byla navržena plynově chromatografická metoda s hmotnostní detekcí (GC/MS) pro současné stanovení akroleinu a akrylamidu v tabákovém kouři a kouři z elektronických cigaret. Dále byla vyvinuta headspace plynově chromatografická metoda s plamenoionizační detekcí (HS-GC-FID) umožňující stanovení zbytkových rozpouštědel přítomných v kyselině isobutylboronové, přičemž tato metoda byla validována a je využívána pro rutinní analýzy ve farmaceutickém průmyslu. Byla rovněž studována problematika stanovení alloxanu a jeho degradačních produktů v bělené mouce, včetně aplikace navržených metod a derivatizačních postupů pro analýzu reálných vzorků.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Úvod do plynové chromatografie a chemické derivatizace

Prvotní koncept plynové chromatografie (GC) byl navržen již ve 40. letech minulého století britským biochemikem Richardem Syngem a chemikem Archerem Martinem [1], který následně ve spolupráci s Anthony Jamesem představil roku 1952 první plynově chromatografický systém uplatněný při separaci směsi těkavých mastných kyselin [2]. Význam tohoto objevu byl velice rychle potvrzen obrovským zájmem ze strany vědců z různých odvětví a jejich spolupráce měla za následek nebývale prudký rozvoj plynové chromatografie a vývoj na tehdejší dobu velmi sofistikovaných systémů [3-6].

Díky široké využitelnosti a možnostem, které plynová chromatografie nabízí, je tato technika již řadu let „zlatým standardem“ současné separační instrumentace s celosvětovým prodejem více než 30 000 systémů za rok [7]. Hlavními jejími výhodami jsou účinnost a vysoká rozlišovací schopnost, citlivost, vysoká přesnost při kvantitativní analýze, možnost rychlých analýz (v řádech sekund až minut), dávkování nízkých objemů vzorků, spolehlivost a finanční nenáročnost. Rovněž dostupnost řady detektorů, jak univerzálních, tak vysoce selektivních, přispívá k široké využitelnosti této techniky, která je v případě spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí schopná poskytnout cenné informace o struktuře molekuly včetně možnosti snadné identifikace látek pomocí databáze spekter. Nejvíce limitujícím faktorem plynové chromatografie je závislost na těkavosti analytu a omezení jeho molekulovou hmotností (většina těkavých analytů zpravidla pod 500 Da) a dále nevhodnost pro analýzu termolabilních látek [7,8]. Jinými slovy lze říci, že přibližně 10 % všech organických látek je přímo analyzovatelných prostřednictvím plynové chromatografie. Iontové, velmi polární, termolabilní a vysokomolekulární látky nejsou pro GC analýzu vhodné. Avšak v závislosti na struktuře jejich molekuly a na přítomnosti různých funkčních skupin, je v řadě případů možné uplatnit chemickou derivatizaci těchto analytů, jejímž výsledkem jsou produkty, které již z hlediska těkavosti, teplotní stability apod., splňují podmínky pro plynově chromatografickou separaci [9]. I přes rychlý rozvoj na poli analytické instrumentace a vývoj celé řady nových alternativních aplikací, především pak z oblasti vysokoúčinné kapalinové chromatografie, se nelze obejít bez disciplíny, jakou je chemická derivatizace v plynové chromatografii. Derivatizace je stále velmi aktuální a nenahraditelná v celé řadě analytických aplikací, zvláště z oblasti environmentální,

farmaceutické, forenzní, biochemické a potravinářské [10-19]. K uplatnění chemické derivatizace nemalou měrou přispívá i rozšířenost metod založených na GC/MS instrumentaci, kdy derivatizace je často jedinou možností, díky které lze odseparovat stopová množství analytu z komplexní matrice a díky hmotnostnímu spektrometru následně získat informace o struktuře dané látky.

2.2. Definice polarity látek

Polarita molekul je fyzikální vlastnost sloučenin, která je způsobena nerovnoměrným rozložením náboje mezi různými atomy v molekule. Toto nerovnoměrné sdílení elektronů mezi dvěma atomy v polární kovalentní vazbě má za následek vznik parciálního kladného a parciálního záporného náboje a tím vznik dipólu. To je případ polárních molekul, které jsou elektricky asymetrické a vykazují dipólový moment. U nepolárních molekul rozlišujeme dva typy. Molekuly, jejichž atomy mají shodnou nebo téměř shodnou elektronegativitu, disponují nulovým nebo velmi malým dipólovým momentem. Druhý typ nepolárních molekul obsahuje polární vazby, ale molekulová geometrie je symetrická. To má za následek vzájemné vyrušení dipólů. Takovým příkladem je oxid uhličitý. Jedná se o nepolární molekulu, přestože obsahuje dvě polární vazby. Důvodem je, že tato molekula má lineární tvar a obě polární vazby jsou v symetrickém uspořádání, což dělá z CO_2 molekulu navenek nepolární. U většiny látek ale existuje přímé spojení mezi polaritou molekuly a přítomným počtem polárních nebo nepolárních kovalentních vazeb. Co se týče vlivu polarity na fyzikálně-chemické vlastnosti molekuly, tak ten je významný. Ovlivňuje jak reaktivitu látky, tak její rozpustnost, povrchové napětí, viskozitu, teplotu tání, teplotu varu a řadu dalších vlastností [20,21].

V chromatografii se pojem polarita pojí rovněž s ochotou látek tvořit vodíkové vazby. K tomuto typu dipolární interakce dochází, když se vodík váže k atomům jako kyslík, dusík a halogeny, které jsou elektronegativnější a mají tendenci mít parciální záporné náboje. Vodík pak může interagovat s blízkou elektronově bohatou molekulou právě za vzniku této slabé vodíkové vazby. Příkladem látek, pro které je tvorba vodíkové vazby typická, jsou voda, alkoholy, fenoly, karboxylové kyseliny, aminy, amidy aj. Molekuly spojené vodíkovými vazbami mají v důsledku silné vzájemné přitažlivosti zpravidla vyšší teplotu tání a varu, a také lepší rozpustnost ve vodě ve srovnání s molekulami, které jsou polární, ale schopnost tvořit vodíkovou vazbu nemají [20,22,23].

Veškeré uhlovodíky, zvláště pak ty nasycené, jsou charakteristickými nepolárními látkami. Nízkou polaritu mají rovněž molekuly látek, které ve své struktuře obsahují větší uhlovodíkové zbytky v podobě arylů, alkylů a cykloalkylů. Tyto molekuly bývají hydrofobní a lipofilní. Typickými polárními látkami, které vykazují permanentní dipólový moment, jsou ty, jejichž molekula obsahuje některou z polárních funkčních skupin - hydroxylovou, karboxylovou, karbonylovou, sulfanylovou, nitroskupinu, aminoskupinu aj. Nejpolarnějšími látkami jsou však ionizované formy organických kyselin a bází [24]. Seřazení látek od nejvíce polárních po zcela nepolární je uvedeno na Obr. 1.



Obr. 1: Seřazení skupin organických látek podle jejich polarity [24].

2.3. Možnosti chemické derivatizace v plynové chromatografii

Chemická derivatizace je běžně používanou technikou, která umožňuje rozšířit spektrum látek analyzovatelných pomocí GC příp. GC/MS. Bez předchozí konverze sloučenin, jakými jsou například aminokyseliny nebo cukry, by plynově chromatografická analýza těchto látek nebyla jinak možná. Přítomnost různých polárních skupin v molekule látek je nejvýznamnějším zdrojem problémů spojených s jejich GC analýzou. Funkční skupiny typu hydroxylová, karboxylová, karbonylová, thiolová a aminoskupina jsou zodpovědné, kvůli jejich polaritě a sklonům vytvářet vodíkové vazby, za nízkou těkavost látek, za silnou adsorpci analytu na stacionární fázi a aktivní centra a tím za špatnou symetrii píku. V neposlední řadě rovněž za termální a chemickou nestabilitu vedoucí ke ztrátám sloučenin v chromatografickém systému během analýzy.

Obecně lze konstatovat, že k derivatizačnímu kroku se přistupuje především z následujících důvodů:

- zvýšení těkavosti
- zvýšení tepelné stability, popř. snížení reaktivity analytů
- zlepšení chromatografického chování (symetrie píků)
- zlepšení separace strukturně příbuzných sloučenin (izomery)
- zvýšení selektivity a citlivosti detekce

Sloučeniny o vysoké relativní molekulové hmotnosti nejsou obvykle vhodné pro přímou GC analýzu z důvodu jejich nízké těkavosti. V případě, že se v molekulách těchto látek navíc nacházejí polární funkční skupiny, tak dochází k ještě dalšímu snížení těkavosti. Pro takové sloučeniny je typická silná retence na stacionárních fázích, což vede k příliš dlouhým retenčním časům, případně k tomu, že tyto látky nejsou z kolony vůbec eluovány. Pokud je však vhodným derivatizačním postupem zamezeno silným mezimolekulárním interakcím polárních skupin, například jejich blokadí nepolárním substituentem, tak lze velice často docílit významného zvýšení těkavosti těchto látek. Řadu látek nelze analyzovat prostřednictvím GC také z důvodu jejich termální nestability. U takových látek dochází k rozkladu již při nadávkování do vyhřátého nástřikového prostoru, což se může v chromatografickém záznamu projevit absencí příslušného píku, nebo naopak získáním většího počtu píků patřících rozkladným produktům. U nízkomolekulárních látek se lze často setkat s jejich vysokou těkavostí, čímž dochází ke ztrátám analytů během přípravy vzorku, ať již při jejich extrakci nebo odstraňování rozpouštědla. To je následně zdrojem chyb při případné kvantifikaci těchto sloučenin. Provedení derivatizace u těchto látek je tedy nejen výhodné z pohledu samotné chromatografie, ale také z hlediska předúpravy vzorku.

Sloučeniny s nízkou těkavostí a vysokou polaritou ve většině případů podléhají adsorpci či absorpci při kontaktu s aktivními místy chromatografického systému. To má za následek zhoršení chromatografického chování těchto látek, projevující se chvostováním píků, případně špatnou nebo dokonce žádnou odezvou. Kvantifikace těchto sloučenin je bez provedení derivatizace prakticky nemožná. Příkladem lze uvést omezené možnosti při analýze aktivních polárních látek v podobě alkoholů, aldehydů, organických kyselin a velmi bazických aminů na tradičně používaných polyethylenglykolových (PEG) stacionárních fázích, kdy se tyto látky z důvodu jejich reaktivity ochotně sorbují na aktivních místech. Avšak díky vývoji a zdokonalování technologií, které jsou při výrobě nových

plynových chromatografů, stacionárních fází kolon a dalšího spotřebního materiálu použity, se lze u některých látek podléhajících adsorpci/absorpci na aktivních místech obejít bez derivatizačního kroku. Je to dáno snahou výrobců o dosažení co nejinertnějšího chromatografického prostředí [25,26].

Častým důvodem vedoucím k využití derivatizačního kroku je separace úzce příbuzných sloučenin, které by jinak nemohly být rozlišeny. Příkladem mohou být optické izomery, jejichž fyzikálně-chemické vlastnosti jsou v achirálním prostředí shodné, a tak nemohou být v tomto prostředí separovány. Při použití vhodného derivatizačního činidla je však možné optické izomery separovat v podobě diastereomerických derivátů. Příkladem lze uvést separaci (*R*)- a (*S*)- enantiomerů ibuprofenu, ketoprofenu a naproxenu v odpadní vodě. Tyto enantiomery byly pomocí (*R*)-1-fenylethylaminu derivatizovány za vzniku příslušných amidových diastereomerů s následnou analýzou prostřednictvím plynové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC-MS/MS). Všechny diastereomerní páry těchto tří léčiv byly úspěšně separovány s vysokým rozlišením [27].

Změna struktury analytu s cílem dosáhnout vyšší selektivity a nižších detekčních limitů je další z důvodů, proč využít chemickou derivatizaci. Nejčastěji využívaným selektivním detektorem v plynové chromatografii je detektor elektronového záchytu (ECD), jehož odezva je značně závislá na přítomnosti určitého typu funkční skupiny či prvku v molekule analytu. ECD je detektorem velice citlivým na atomy halogenů. Mezi nejčastější způsoby derivatizace patří vnesení halogenovaných funkčních skupin (trifluoracetáty, heptafluorbutyráty, pentafluorfenyly aj.) do molekuly analytu, který by jinak nebylo možno detegovat. ECD je rovněž velice citlivý na přítomnost nitroskupiny, proto se pro dosažení co nejlepší citlivosti mohou využít 2,4-dinitrofenylderiváty [28]. Taktéž pro spojení plynové chromatografie s hmotnostní detekcí byla vyvinuta řada derivatizačních postupů, díky kterým lze získat hmotnostní spektra s charakteristickou fragmentací, což usnadňuje následnou identifikaci a kvantifikaci. Mezi nejběžněji používané patří trimethylsilyl (TMS) deriváty. Jejich výhodou je snadná příprava, velice dobré chromatografické vlastnosti, tvorba charakteristických MS fragmentů a skutečnost, že řada dostupných knihoven obsahuje hmotnostní spektra TMS derivátů pro širokou skupinu látek [29].

Nejvýznamnější a nejčastěji využívané způsoby chemické derivatizace látek jsou popsány v podkapitolách 2.3.1 - 2.3.6.

2.3.1. Silylace

Jak již bylo zmíněno, tak silylace je pravděpodobně nejpoužívanějším způsobem derivatizace funkčních skupin u nedostatečně těkavých látek. Úkolem silylace je blokování protických míst molekuly, čímž dochází k potlačení interakcí typu dipól-dipól, zvýšení těkavosti analytu a zároveň snížení jeho povrchové adsorpce. Jedná se o vnesení silyl skupiny do molekuly derivatizované látky náhradou za aktivní vodík přítomný v polárních funkčních skupinách (-COOH, -OH, =NH, -NH₂, -SH) (Obr. 2). Pro tento účel byla vyvinuta řada silylačních činidel, přičemž výběr toho správného činidla se odvíjí od jeho reaktivity a selektivity vůči derivatizované látce. Dále je potřeba zvážit stabilitu derivátu, množství vznikajících vedlejších reakčních produktů a separovatelnost připraveného derivátu od ostatních složek přítomných ve vzorku [30,31]. Silylační činidla (Obr. 2) lze rozdělit do těchto skupin [25]:

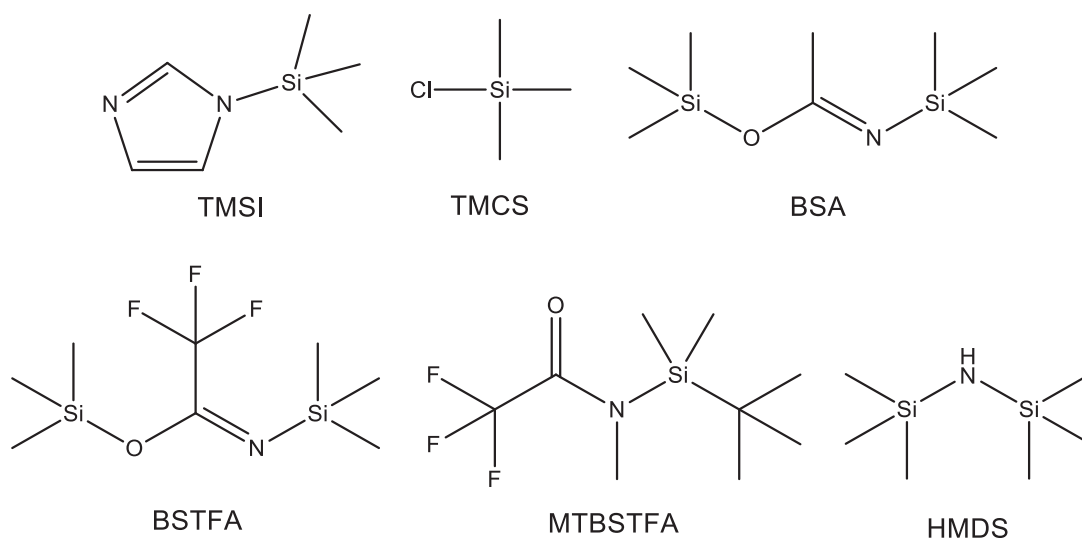
- silylaminy
- silylamidy
- hexamethylsilazany
- trialkylchlorsilany

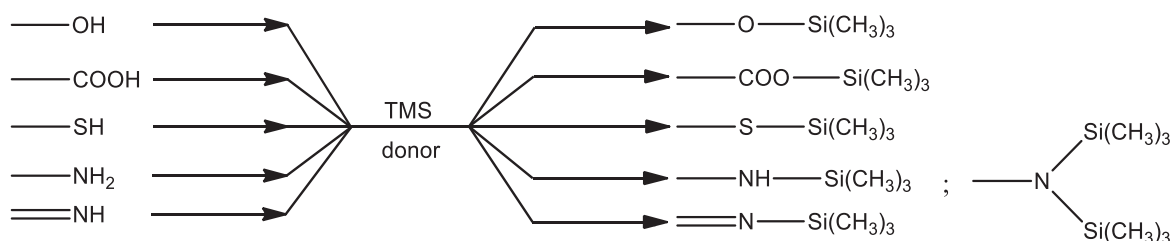
Typickým zástupcem silylaminů je *N*-trimethylsilylimidazol (TMSI), který je jedním z nejúčinnějších silylačních činidel hydroxylových skupin [25,30]. Je tedy vhodný pro derivatizaci alkoholů, fenolů, mastných kyselin, steroidů apod. Jeho nevýhodou je, že nereaguje s alifatickými aminy. Ze skupiny silylamidů patří mezi nejznámější a zároveň nejvíce využívaná činidla *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) a *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA). Obě činidla jsou vhodná k derivatizaci alkoholů, fenolů, karboxylových kyselin, amidů, aminů a v případě BSTFA i sulfonamidů. Používají se samotná nebo s přídavkem katalyzátoru v podobě pyridinu, kyseliny chlorovodíkové, trifluoracetamidu (TFA) případně trimethylchlorsilanu (TMCS). BSTFA však oproti BSA reaguje rychleji a kompletněji. Jeho vedlejší produkty jsou více těkavé ve srovnání s jinými silylačními činidly, což způsobuje méně chromatografických interferencí a přítomnost atomů fluoru vede k menšímu znečištění plamenoionizačního detektoru (FID) usazeninami křemíku. Zástupcem další skupiny silylačních činidel je hexamethyldisilazan (HMDS). Jedná se o jedno z nejpůvodnějších silylačních činidel. Není příliš silným donorem TMS skupiny, přesto se používá díky řadě jeho výhod. Je cenově dostupný, má relativně nízký bod varu a jeho jediným reakčním produktem je amoniak. Může být použit bez přídavku rozpouštědel a schopnost jeho reakce s příslušnými analyty

lze zvýšit pomocí různých katalyzátorů. Toto činidlo je vhodné pro derivatizaci alkoholů, fenolů, karboxylových kyselin a aminů. TMCS je představitelem poslední skupiny látek používaných k silylaci. Poprvé byl použit v roce 1944 R. O. Sauerem při silylaci alkoholů, což z něj dělá nejstarší silylační činidlo vůbec. Samotný TMCS je velice slabým silylačním činidlem, avšak v přítomnosti báze je schopen silylovat řadu funkčních skupin. Často je však využíván v kombinaci s některým z jiných silylačních činidel (nejčastěji BSTFA), jelikož díky vznikajícímu meziproduktu v podobě HCl je schopen zvýšit sílu silnějšího silylového donoru.

Pyridin a jiná polární rozpouštědla s velkou solvatační kapacitou (acetonitril, dimethylformamid, dimethylsulfoxid, tetrahydrofuran) mohou usnadnit samotnou derivatizaci, proto patří mezi nejčastěji používaná rozpouštědla při silylačních reakcích. Hlavní výhodou pyridinu je, že je jak aprotickým rozpouštědlem, tak také katalyzátorem, který zároveň absorbuje HCl během organochlorsilanových reakcí [31].

Při přípravě silyl derivátů je třeba brát v potaz jejich citlivost na přítomnou vlhkost, která způsobuje rozklad jak silylačních činidel, tak také derivátů. Tento problém lze zredukovat použitím nadbytku činidla a rozpouštědlem, které neobsahuje aktivní atomy vodíku. Dalším řešením, jak zabránit hydrolyze derivátů, je použití činidla *N-terc*-butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoracetamidu (MTBSTFA), které je méně citlivé na vlhkost, vyžaduje mírnější derivatizační podmínky a příslušné deriváty poskytují vyšší odezvy v porovnání s BSTFA. Je to dáno daleko vyšší fragmentací trimethylsilyl derivátů oproti *terc*-butyldimethylsilyl derivátům [32,33].





Obr. 2: Struktury vybraných silylačních činidel; schéma znázorňující reakci funkčních skupin s trimethylsilylačním činidlem za vzniku TMS derivátů [25,34].

2.3.2. Acylace

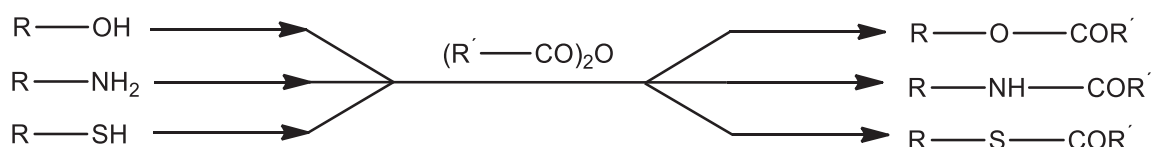
Acylace je alternativní derivatizační metodou k silylaci a bývá preferovanou v případech, kdy acylovaná látka je stabilnější než silylovaná, což je případ třeba primárních aminů. Využívá se k přeměně sloučenin obsahujících aktivní atomy vodíku v podobě -OH, -NH a -SH funkčních skupin za vzniku esterů, amidů a thioesterů (Obr. 3). Acylace se podobně jako další typy derivatizací používá ke snížení polarity a zlepšení chromatografického chování látek během separace. Rovněž i acylací může dojít ke zvýšení těkavosti analytů, to ale zpravidla není tak významné jako v případě silylace. Nejčastěji se tento způsob derivatizace aplikuje při analýze monosacharidů a aminokyselin. Acylace může být také jedním ze způsobů, jak zlepšit detegovatelnost dané sloučeniny. Jedná se například o rozšíření molekuly o perfluoracylovou skupinu, která je velice dobře detegovatelná ECD detektorem. Dalším benefitem acylace je tvorba charakteristických fragmentů při hmotnostně spektrometrické analýze [3,25,29].

Mezi tři hlavní skupiny acylačních činidel patří [35]:

- acylhalogenidy
- anhydridy kyselin
- acylimidazoly

Nejčastěji využívanými acylhalogenidy v GC analýzách jsou ty, které obsahují fluor a vytvářejí acylové deriváty s krátkým řetězcem. Výhodou těchto derivátů je velice dobrá odezva u detektorů jako ECD případně MS s negativní chemickou ionizací (NCI). Acylhalogenidy jsou velmi reaktivní a jejich nadbytek ve vzorku musí být před chromatografickou analýzou odstraněn právě z tohoto důvodu. Tato činidla mohou způsobovat interference a mohou poškodit chromatografickou kolonu. Daleko výhodnější je využití anhydridů kyselin, které jsou více těkavé a mohou být snadno odstraněny odpařením. Hlavními činidly v této skupině jsou anhydrid kyseliny trifluoroctové (TFAA), anhydrid kyseliny pentafluorpropionové (PFPA) a anhydrid kyseliny heptafluormásečné (HFBA).

Tato činidla se používají k přípravě stabilních a těkavých derivátů alkoholů, fenolů a aminů pro ECD, FID a MS detekci. Ze skupiny acylimidazolů je běžně komerčně dostupným trifluoracetylimidazol (TFAI) a heptafluorbutyrylimidazol (HFBI). Použití těchto činidel má oproti chloridům a anhydridům kyselin výhodu v podobě hladké reakce, při které nedochází k uvolňování žádných kyselin. Vedlejším produktem je imidazol, který je relativně inertní. Deriváty jsou i přes svoji velikost těkavé a k jejich stabilitě přispívají pevně navázané atomy fluoru. Snadno reagují s hydroxylovými skupinami, primárními a sekundárními aminy [34-36].



Obr. 3: Schéma znázorňující reakci funkčních skupin s acylačním činidlem [25].

2.3.3. Alkylace

Alkylace se využívá k záměně aktivního vodíku u sloučenin jako R-COOH, R-OH, R-SH, R-NH-R', R-NH₂, R-CONH₂, R-CONH-R', R-SO₂-NH₂ a R-CO-CH₂-CO-R', za alkylovou skupinu, která může mít podobu alifatickou případně alifaticko-aromatickou (Obr. 4). Záměna tohoto aktivního vodíku vede ke snížení polaritě a mezimolekulárních interakcí dané látky a usnadňuje tak chromatografickou analýzu. Alkylace může rovněž napomoci při separaci směsi úzce příbuzných sloučenin, které by jinak nebyly rozlišeny a také při stabilizaci termálně labilních látek [34,37]. V případě alkylace látek obsahujících vodíkové atomy s nízkou reaktivitou, jedná se např. o alkoholy, se pro katalýzu derivatizační reakce využívají činidla v podobě Lewisových kyselin (např. komplex fluoridu boritého a diethyletheru) [38].

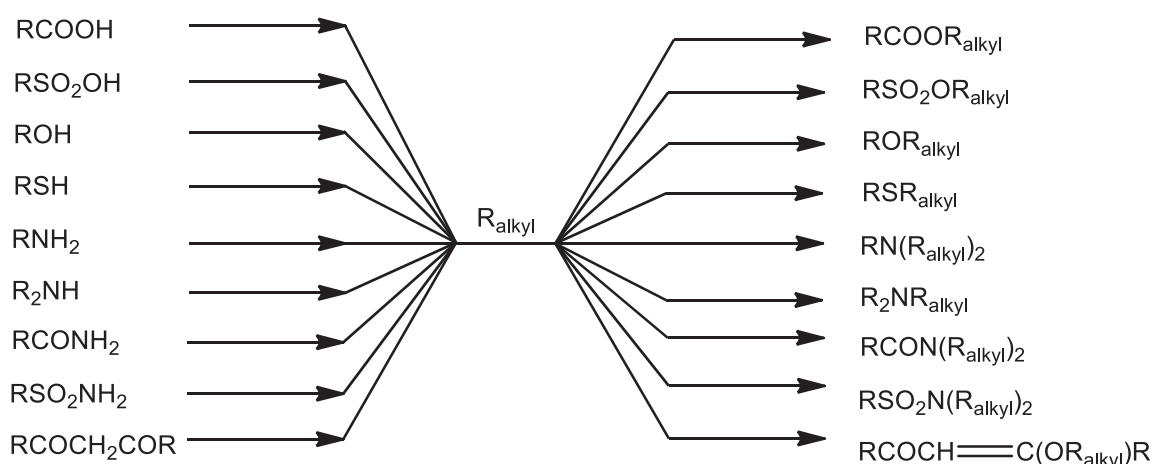
Nejvýznamnější oblastí, ve které je alkylace využívána, je analýza sacharidů v podobě jejich methylderivátů a velice častou je také alkylace organických kyselin za vzniku esterů, především methylesterů (esterifikace). Přestože silylace karboxylových kyselin není obtížná, tak tyto deriváty vykazují nižší stabilitu. Zatímco alkylestery jsou velice stabilní a mohou být uchovávány po delší dobu.

Nejběžnějšími alkylačními činidly jsou:

- alkylhalogenidy (bromidy a jodidy)
- diazoalkany

- dialkylacetalu
- alkoholy v přítomnosti katalyzátoru (esterifikace)

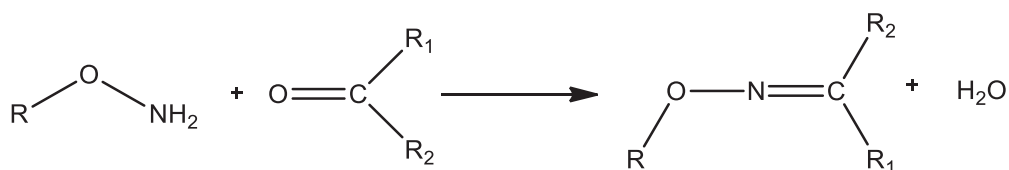
Ze skupiny alkylhalogenidů se často využívá methyljodidu v přítomnosti dimethylsulfoxidu (DMSO) a pevné báze (KOH, NaOH) k alkylationi sacharidů. Alkylbromidy a alkyljodidy s krátkým řetězcem nacházejí uplatnění při derivatizaci aminokyselin, sulfonamidů, fenolů, barbiturátů, organických kyselin apod. Významným methylačním činidlem ze skupiny diazoalkanů je diazomethan. Jedná se o plynnou látku, která nemůže být dlouho skladována kvůli své nižší stabilitě. Proto se často připravuje pouze v malém množství, zpravidla jako roztok v diethyletheru. Diazomethan velmi účinně derivatizuje karboxylové a sulfonové kyseliny, fenoly a enolové skupiny. V případě alkoholů probíhá methylace pomaleji. Představitelem dialkylacetalů je komerčně dostupný *N,N*-dimethylformamid dimethylacetal, který je částečně citlivý na vlhkost, proto vyžaduje bezvodé podmínky během derivatizace. Toto činidlo lze použít pro alkylationi aminů a amidů, avšak s alifatickými alkoholy příliš dobře nereaguje. Esterifikace je častou technikou derivatizace organických kyselin zahrnující kondenzaci karboxylové skupiny kyselin s hydroxylovou skupinou alkoholu za současné eliminace vody. Připravené estery jsou nepolární, více těkavé a vykazují lepší chromatografické chování ve srovnání s kyselinami nederivatizovanými. Jako alkylační činidla se mohou využít samotné alkoholy v kombinaci s katalyzátorem v podobě fluoridu boritého, kyseliny chlorovodíkové, kyseliny trifluoroctové nebo thionyl chloridu. Zvýšit účinnost esterifikace lze odstraněním vznikající vody pomocí sušidel jako CaCl_2 , MgSO_4 , 2,2-dimethoxypropanu nebo molekulových sít [25,35-37,39].



Obr. 4: Schéma znázorňující reakci funkčních skupin s alkylačním činidlem [38].

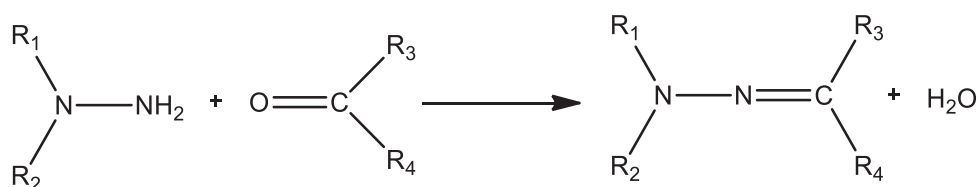
2.3.4. Kondenzační reakce

Do této skupiny derivatizačních reakcí lze zařadit jak již výše zmíněnou esterifikaci, tak také především reakce za vzniku oximů a hydrazonů. Přítomnost karbonylové skupiny v molekule analyzované látky obvykle nezpůsobuje významnější chromatografické problémy. V některých případech však může být původcem nestability látek a díky své polaritě může při separaci komplexních vzorků způsobit problémy v důsledku interference s jinými složkami. Separace je pak v takovém případě možná až po konverzi karbonylové sloučeniny na vhodný derivát, například oxim (Obr. 5), který se obvykle připravuje reakcí s hydroxylaminem (případně *O*-alkylhydroxylaminem) v prostředí pyridinu [25,39]. A právě této reakce vedoucí ke vzniku oximů využil *J. M. Vogh* při analýze karbonylových sloučenin ve výfukových plynech automobilů [40]. Díky přítomnosti dusíku v molekule oximu je možné pro dosažení lepších detekčních limitů využít selektivní termoionizační (dusíko-fosforový; NPD) detektor.



Obr. 5: Reakce za vzniku oximů.

Příprava hydrazonů (Obr. 6) je další způsob derivatizace aldehydů a ketonů využívaný jak v plynové, tak v kapalinové chromatografii. Principiálně se jedná o kondenzaci karbonylové skupiny se substituovaným hydrazinem probíhající obvykle v kyselém prostředí [25,41]. Základním a současně nejpoužívanějším činidlem pro derivatizaci karbonylových sloučenin je 2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH) [41]. Přestože kapalinově chromatografické metody s UV detekcí (HPLC/UV) pro stanovení nitroaromatických hydrazonů jsou obecně více preferovány, tak také plynově chromatografické metody mají své výhody. Příkladem lze uvést metodu pro stanovení formaldehydu a dalších čtrnácti karbonylových sloučenin ve vzduchu založenou právě na derivatizaci pomocí DNPH. Tato metoda prokázala, že je díky citlivosti, dobrému rozlišení a rychlosti analýzy vhodnou alternativou k HPLC [42].



Obr. 6: Reakce za vzniku hydrazonů.

Při použití FID detektoru mohou být připravené hydrazony analyzovány již od koncentrace 0,15 µg/ml a v kombinaci s ECD detekcí je možné dosáhnout citlivosti až 1,5 ng/ml. ECD detekce však vyžaduje přečištění analyzovaného extraktu od nadbytku DNPH činidla, které obsahuje řadu interferujících nečistot [42]. Pro detekci hydrazonů se díky přítomnosti atomů dusíku v jejich molekule nabízí rovněž použití selektivního NPD detektoru, čehož využil *T. Shiraishi a kol.* v plně automatickém systému pro stanovení aldehydů v ovzduší v ppb koncentracích. Metoda je založena na záchytu aldehydů z ovzduší na silikagelu impregnovaném DNPH činidlem. Vzniklé deriváty jsou následně separovány plynovým chromatografem s NPD detekcí, přičemž pro formaldehyd a acetaldehyd bylo dosaženo limitů detekce na úrovni 2,2, resp. 1,2 ppb při analýze 21,9 litrů prosátého vzduchu [43].

2.3.5. Cyklizační reakce

Pokud se v molekule analytu vyskytují dvě a více funkčních skupin, které by měly být blokovány, je možné využít derivatizaci prostřednictvím bifunkčního činidla za tvorby cyklického produktu. K derivatizaci řady diolů se využívá reakce s boronovými kyselinami za vzniku alkyl boronátů, které byly díky jejich vysoké schopnosti cyklizovat široce využívány v 70. letech 20. století. Tyto cyklické produkty jsou dostatečně stabilní, aby mohly být analyzovány plynovou chromatografií a jejich příprava může být dokonce prováděna přímo v nástřikovém prostoru GC. Avšak hydrolytická stabilita těchto derivátů není dobrá. V případě že cyklický produkt obsahuje kromě diolu i další -OH skupinu (příkladem jsou steroidy), tak jej nelze bez dodatečné derivatizace v podobě acetylace či silylace analyzovat. Tyto dodatečné reakce však mohou vést ke vzniku nežádoucích vedlejších derivátů.

Pyrimidiny jsou dalšími deriváty ze skupiny cyklických sloučenin, které lze připravit reakcí acetylacetonu, hexafluoracetylacetonu nebo malonaldehydu s guanidinovou skupinou. Tento způsob chemické derivatizace se využívá např. pro modifikaci argininu [25,44].

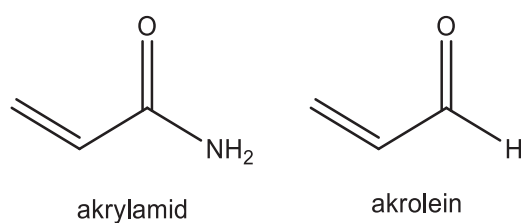
2.3.6. Další typy derivatizačních reakcí

Kromě již zmíněných derivatizačních postupů existuje celá řada dalších reakcí pro přípravu derivátů, které mohou významně zlepšit chromatografické vlastnosti a detegovatelnost daných sloučenin. Mezi tyto reakce patří např. substituce na aromatický kruh, hydrolýza, oxidace a redukce, adice na dvojnou vazbu aj. [35]. Jedním z příkladů těchto ne tak častých derivatizačních technik je bromace, kterou lze využít pro derivatizaci dvojných vazeb alkenů (adice elektrofilní) nebo arenů (substituce elektrofilní). Vnesením halogenu do struktury analytu lze snížit jeho polaritu a zvýšit selektivitu, čímž se tato látka stává lépe detegovatelnou pomocí ECD nebo MS, kde lze v hmotnostním spektru pozorovat charakteristické fragmenty. A právě těchto a dalších výhod bromace bylo využito v rámci této disertační práce při vývoji metody pro současné stanovení akrylamidu a akroleinu v tabákovém kouři a kouři z elektronických cigaret. Vlastnosti těchto dvou analytů a možnosti jejich GC analýzy jsou podrobně popsány v následující kapitole.

2.4. Akrylamid a akrolein

Akrylamid (prop-2-enamid; Obr. 7) je nejmenším nenasyceným primárním amidem s velmi vysokou polaritou. Jedná se o nízkomolekulární krystalickou látku bez barvy a zápachu, která ve své molekule obsahuje reaktivní dvojnou vazbu a amidovou skupinu, která nese aktivní atomy vodíku s ochotou vytvářet pevné vodíkové vazby, čímž je akrylamid velice dobře rozpustným ve vodě, ethanolu a acetonu a vyznačuje se i vyšší teplotou tání a varu [45]. Tento vinylový monomer lze připravit hydrolýzou akrylonitrilu za přítomnosti mědi jako katalyzátoru [46]. Na vzduchu je tato látka reaktivní a velmi rychle polymerizuje za tvorby polyakrylamidu [47-49]. Polyakrylamid se průmyslově využívá jako flokulant při úpravě pitných a odpadních vod, jako těsnící a zpevňující materiál ve stavebnictví, dále v papírenském a textilním průmyslu, v obalových materiálech a také v kosmetických přípravcích. Široké uplatnění nachází rovněž v biochemických laboratořích za účelem elektroforetické separace a čištění proteinů [50,51]. Polyakrylamid není toxický, rizikem v něm jsou zbytky neopolymerizovaného akrylamidu, který vykazuje významně toxické účinky pro centrální nervový a reprodukční systém laboratorních zvířat i člověka. Je nebezpečným jak pro imunitní, tak také oběhový systém a může se akumulovat v ledvinách a játrech [52,53]. U laboratorních krys vystavených akrylamidu bylo prokázáno zvýšené riziko nádorů prsních žláz, nervového systému, štítné žlázy, dělohy a tlustého střeva [54-

56]. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) zařadila akrylamid do skupiny 2A, která odpovídá pravděpodobným lidským karcinogenům [52,57,58]. V roce 2002 bylo za spolupráce vědců z univerzity ve Stockholmu a švédskou národní agenturou pro kontrolu potravin zjištěno, že tepelně upravené potraviny bohaté na škrob obsahují právě akrylamid. K jeho vytváření dochází za teplot vyšších jak 120°C (při pečení, grilování, smažení) během Maillardovy reakce mezi aminokyselinou asparaginem a redukujícími cukry, typicky glukózou a fruktózou. Akrylamid se nachází v široké škále potravin – od pečiva, sušenek, müsli, bramborových hranolků a chipsů až po pražené ořechy, mletou červenou papriku, kakao, kávu a její obilninové náhražky aj. Jeho relativně vysoké koncentrace byly rovněž nalezeny v cigaretovém kouři [59-62]. Avšak jakékoli spojení mezi rizikem rakoviny a dlouhodobým příjmem nízkých koncentrací akrylamidu nebylo dosud prokázáno a pohybuje se pouze na hypotetické úrovni [63].



Obr. 7: Struktura akrylamidu a akroleinu.

Akrolein (prop-2-enal, Obr. 7) je nejjednodušším α,β -nenasyceným aldehydem se třemi atomy uhlíku a vysoce reaktivní dvojnou vazbou. Jedná se o bezbarvou až mírně žlutou kapalinu s nepříjemně štiplavým zápachem, nízkým bodem varu (52,6°C), vysokou těkavostí a velmi dobrou rozpustností ve vodě. Tato nízkomolekulární látka se může účastnit řady transformačních reakcí, příkladem je Michaelova a Diels-Alderova reakce [64]. Největšího využití nachází jako meziprodukt při výrobě kyseliny akrylové. Díky svým biocidním vlastnostem se využívá k zamezování růstu řas a plevelů v zavlažovacích kanálech (při koncentraci okolo 10 ppm), chladících věžích, recirkulačních vodních systémech, v papírenském průmyslu, ropných vrtech, dále se používá při výrobě modifikovaného potravinářského škrobu, syntetického glycerinu, glutaraldehydu, řady polymerů a také jako chemická zbraň [65,66]. Akrolein je vysoce toxický jak při inhalaci, orálním podání, tak také při dermální expozici. Je silně dráždivý, způsobuje nekrózu pokožky, očí a dýchacích cest [67-69]. Vykazuje mutagenní účinky způsobující poškození DNA a proteinů [70]. V roce 1992 Americká agentura pro ochranu životního prostředí (U.S.

EPA) zařadila akrolein do skupiny C (pravděpodobný lidský karcinogen). IARC však v r. 1995 provedla revizi této klasifikace, přičemž ji v r. 2003 následovala rovněž U.S. EPA. Obě agentury dospěly k závěru, že neexistuje dostatek důkazů k tomu, aby byl akrolein nadále označován za karcinogen pro člověka [71-73]. Do životního prostředí se akrolein denně dostává z mnoha zdrojů v podobě automobilových emisí, lesních požárů, emisí z uhelných a plynových elektráren, spalováním plastů, při použití akroleinu jako biocidu ve vodách a mnoha dalších průmyslových procesech [67,74]. Z hlediska lidského zdraví patří mezi hlavní zdroje akroleinu kouř z tabákových výrobků a tepelně upravované potraviny bohaté na sacharidy a tuky. V řadě případů dochází ke vzniku akroleinu z důvodu tepelného rozkladu široce využívaného glycerolu, který nastává při teplotě dosahující 290°C [75-77].

A právě kouř z tabákových výrobků, který kromě akrylamidu a akroleinu obsahuje několik tisíc dalších chemických sloučenin včetně karcinogenů, je tak nejvýznamnějším znečišťovatelem vnitřního prostředí. Mezinárodní agentura Science Advisory Board (SAB) spolu s U.S. EPA řadí znečištění ovzduší uvnitř budov mezi nejvýznamnější rizika pro veřejné zdraví. Odhadem je cigaretový kouř pouze ve Spojených státech zodpovědný za přibližně 3000 úmrtí na rakovinu plic u nekuřáků [78]. Proto není překvapující rostoucí obliba elektronických cigaret, které jsou považovány za zdravější alternativu příjmu nikotinu. Potenciální rizika související s jejich používáním jsou však nadále v oblasti zájmu vědců a představitelů řady zdravotnických organizací [79].

2.4.1. Metody pro stanovení akrylamidu a akroleinu

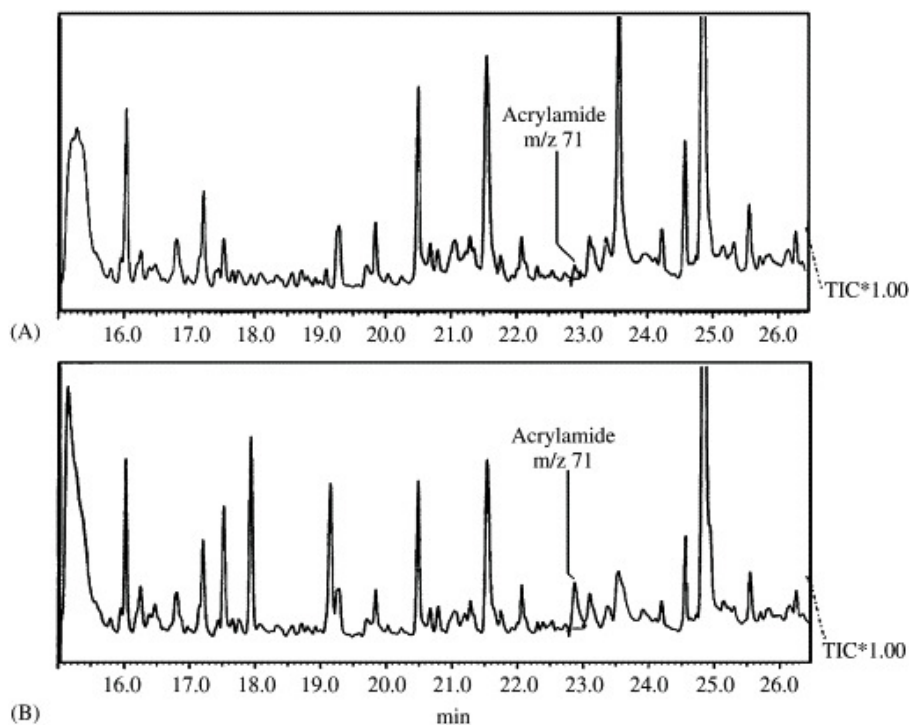
Jak pro stanovení akrylamidu, tak také akroleinu, byla vyvinuta a publikována řada analytických metod. Nejběžněji používané metody jsou založeny především na kapalinové [80-88] a plynové chromatografii [68,89-96] za využití různých typů detektorů a často rovněž ve spojení s chemickou derivatizací analytu. V případě stanovení akrylamidu se lze okrajově setkat i s kapilárně elektroforetickými metodami [97-100] a metodami bioanalytickými v podobě imunoenzymatických testů [101,102] a elektrochemických biosenzorů [103,104]. Z oblasti kapalinové chromatografie byly popsány metody využívající nejen konvenční vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), ale i ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (UHPLC), díky které lze v kombinaci se stacionární fází o velikosti částic 1,7 µm dosáhnout účinnější separace a lepší symetrie píků za současného zkrácení doby analýzy. Nejčastějším způsobem detekce obou analytů (případně jejich derivátů) je při separaci prostřednictvím HPLC i UHPLC hmotnostní

Mezi nejčastější derivatizační techniky používané při GC i HPLC analýze karbonylových sloučenin patří příprava oximů nebo substituovaných (fenyl)hydrazonů [80,81,86,88,118,119], a to i přes vznik geometrických izomerů vedoucích k nejednotným produktům a nadměrnému počtu píků. Tato skutečnost může způsobovat komplikace při vyhodnocování analytických výsledků, zvláště v případě analýzy složitějších vzorků. Existují rovněž metody využívající i jiné způsoby derivatizace těchto analytů. *K. Yamazaki a kol.* například vyvinuli GC/MS metodu pro stanovení akrylamidu v potravinách po jeho derivatizaci xanthydrolem (Obr. 8) za použití interního standardu v podobě isotopicky značeného akrylamidu (d_3 -akrylamid). Popsaná metoda dovoluje stanovit výsledný produkt *N*-xanthyl-akrylamid s limitem kvantifikace (LOQ) v rozmezí 5-20 $\mu\text{g/kg}$ [120]. Obdobu této metody využívající rovněž xanthidrol jako derivatizační činidlo, publikoval *H. H. Lim a kol.* v souvislosti se stanovením stopových množství akrylamidu v povrchové a pitné vodě s limitem detekce (LOD) 3,0 ng/l a LOQ 9,7 ng/l [91].



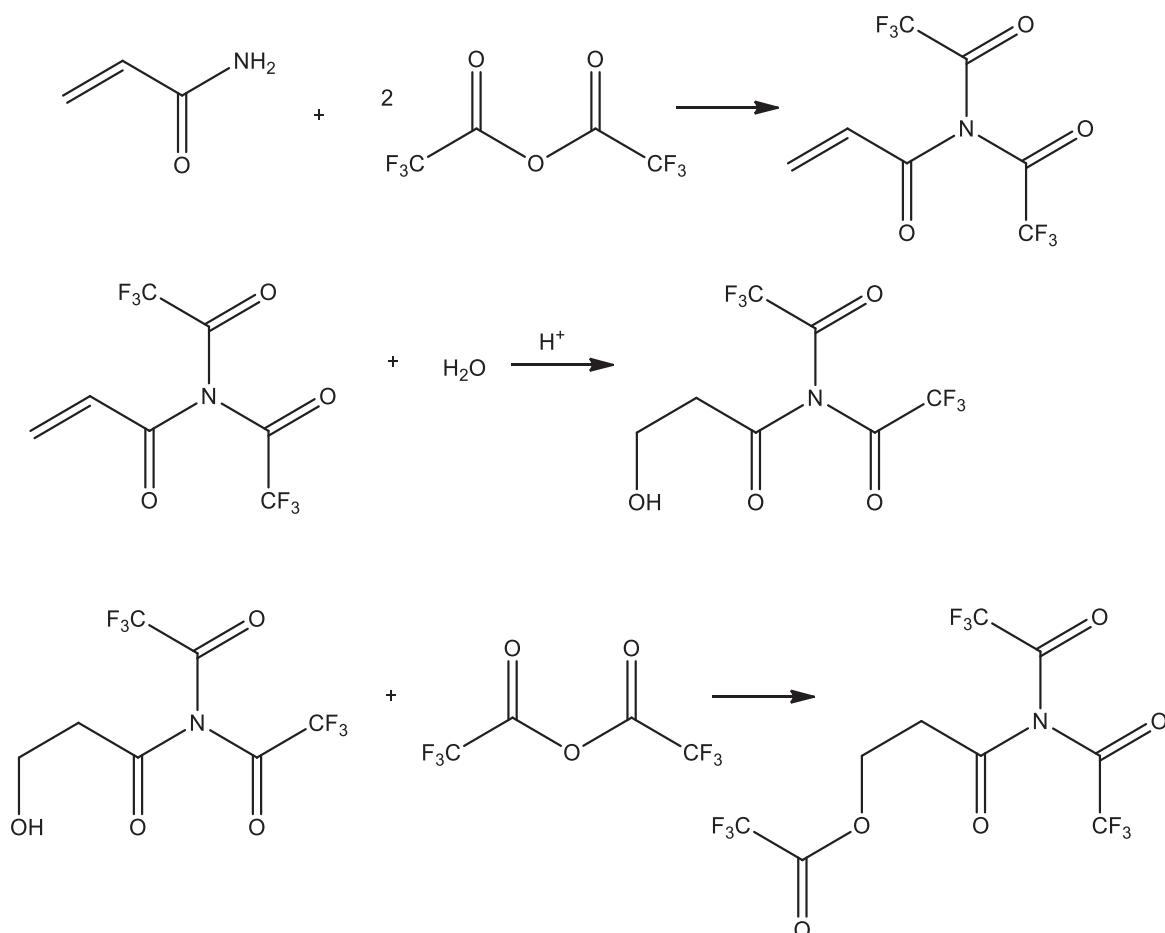
17

a akrylamid po odstranění vody a tuku ze vzorku pouze extrahovali do 2-propanolu. Extrakt po zakoncentrování a filtraci dávkovali do plynového chromatografu s kapilární kolonou s polární stacionární fází. LOD dosažený touto metodou činil 25 µg/kg a LOQ 75 µg/kg. Při použití MS v módu monitorování selektivního iontu (SIM), konkrétně iontu 71 m/z (Obr. 9), bylo dosaženo LOQ 50 µg/kg [121].



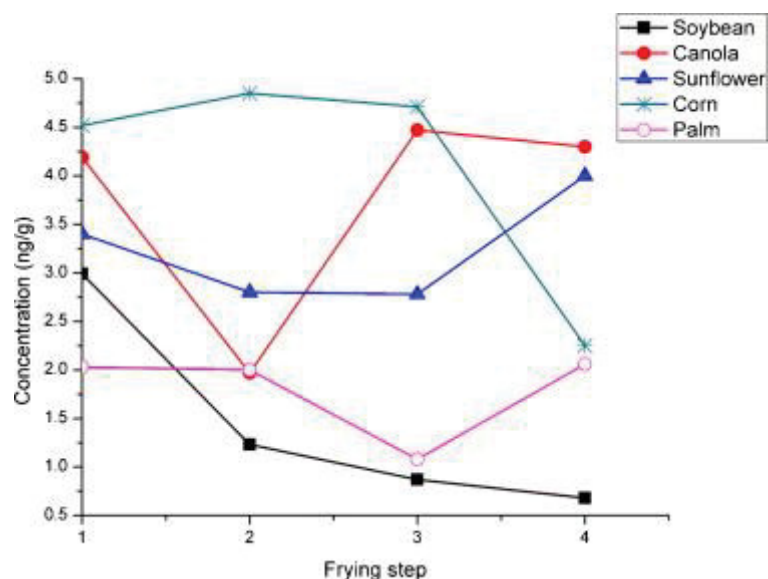
Obr. 9: GC/MS chromatogramy naměřené v SIM módu ($m/z = 71$), A) analýza extraktu rajčatové omáčky s bazalkou (obsah akrylamidu <50 µg/kg), B) analýza extraktu omáčky s olivami a kapary (obsah akrylamidu =124 µg/kg). Převzato z citace [121].

Selektivity a citlivosti ECD detekce využil *I. Notardano a kol.* při vývoji metody pro kvantitativní analýzu akrylamidu v potravinách z obilovin a v bramborových chipsech. Metoda je založena na reakci akrylamidu s anhydridem kyseliny trifluoroctové (Obr. 10) s následnou GC-ECD analýzou. Jelikož autoři využili dosud nepopsaný způsob derivatizace akrylamidu, tak bylo nutné potvrdit strukturu připraveného tri(trifluoracetyl) derivátu o molekulové hmotnosti 377 m/z pomocí GC/MS s elektronovou (EI) ionizací. Prostřednictvím této metody bylo dosaženo LOD na úrovni 1 µg/kg [122].



Obr. 10: Reakce akrylamidu s anhydridem kyseliny trifluoroctové [122].

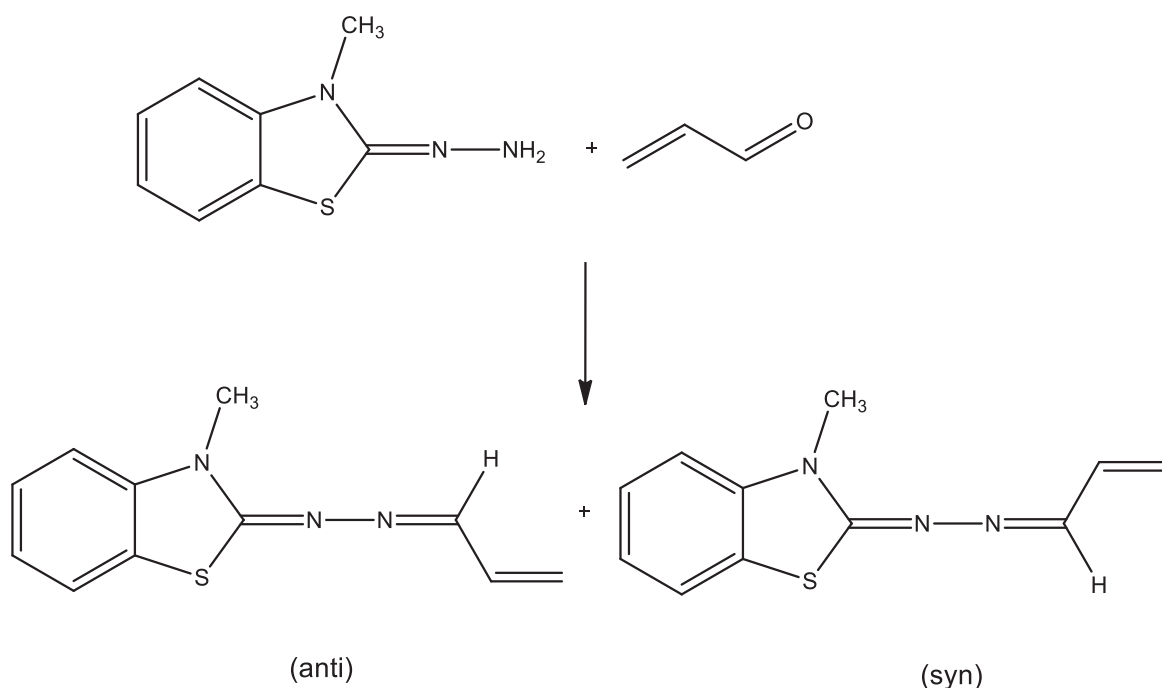
V případě stanovení akroleinu prostřednictvím GC se lze v řadě aplikací setkat s jeho derivatizací za vzniku již zmíněných fenyldiazonů. Častou prekoncentrační technikou pak je mikroextrakce na tuhé fázi (SPME). *V. M. Osório a kol.* pro stanovení akroleinu v bramborových hranolcích smažených v různých typech rostlinných olejů využili právě kombinace derivatizace tohoto analytu pomocí DNPH s následnou extrakcí připraveného derivátu na polyakrylátové SPME vlákno ponořené do reakční směsi. Koncentrace akroleinu ve vzorku se odvíjela jak od typu použitého rostlinného oleje, tak také od toho, kolikrát byl tento olej použit (Obr. 11). Stanovený detekční limit pro tuto metodu činí 0,84 ng/g a kvantifikační limit 1,40 ng/g [123].



Obr. 11: Graf zobrazující koncentrace akroleinu v bramborových hranolkách smažených v sójovém, kanolovém, slunečnicovém, kukuřičném a palmovém oleji. Každý z olejů byl znovu použit ve čtyřech cyklech smažení. Převzato z citace [123].

Při použití akroleinu jako biocidu, případně při výrobě některých organických látek může docházet ke kontaminaci povrchových a pitných vod. Za účelem stanovení akroleinu v těchto typech vzorků vyvinuli a validovali *H. H. Lim a kol.* GC/MS metodu založenou na reakci akroleinu s 2,2,2-trifluorethylhydrazinem za vzniku dostatečně těkavého akrolein-hydrazonu umožňujícího headspace (HS) SPME extrakci. Autoři mimo jiné testovali vliv materiálu SPME vlákna na adsorpci derivátu akroleinu, přičemž nejvyšší účinnosti bylo dosaženo s vláknem z karboxen/polydimethylsiloxanu (CAR/PDMS). Kombinací tohoto derivatizačního a extrakčního postupu ve spojení s hmotnostní detekcí v SIM módu bylo dosaženo LOD s hodnotou 0,06 $\mu\text{g/l}$ a LOQ o hodnotě 0,2 $\mu\text{g/l}$ [124].

Z hlediska analýzy potravin lze akrolein detegovat v nápojích, které byly vyrobeny z jablek. V tomto případě je akrolein přirozenou složkou vznikající degradací glycerolu a mající negativní vliv na organoleptické vlastnosti těchto nápojů. *J. Ledauphin a kol.* navrhli pro stanovení akroleinu v kalvadosu a cideru metodu s derivatizací akroleinu pomocí 3-methylbenzothiazolinon hydrazinu (MBTH) za vzniku dvou geometrických stereoisomerů (Obr. 12). Připravené hydrazony byly následně analyzovány plynovou chromatografií s NPD detekcí, která byla zvolena z důvodu přítomnosti tří atomů dusíku v molekule derivátu. Limit kvantifikace pro kalvados byl stanoven na 600 $\mu\text{g/l}$ a v případě cideru na 6 $\mu\text{g/l}$ [125].



Obr. 12: Reakce akroleinu s MBTH za vzniku dvou geometrických stereoizomerů [125].

Stejně jako v případě akrylamidu, tak i u akroleinu lze nalézt pouze minimální množství metod, které nevyžadují derivatizaci analytu. Jedním takovým příkladem je metoda *N. Sakury a kol.*, kteří navrhli postup využívající headspace GC/MS pro stanovení akroleinu v moči pacientů léčených vysokými dávkami cyklofosfamidu. Přestože autoři při použití SIM módu hmotnostního detektoru dosáhli nízkých limitů detekce v rozmezí 56-280 ng/l, tak se museli potýkat s nestabilitou tohoto nederivatizovaného akroleinu. Stabilní byl pouhých 30 min při 4°C, což je způsobeno jeho vysokou těkavostí a reaktivitou [126].

Z řady hledisek se jako velice výhodný způsob derivatizace umožňující současné stanovení akrylamidu a akroleinu jeví bromace. Ta je již v případě akrylamidu, který se bromací převádí na 2,3-dibrompropionamid, respektive 2-brompropenamid, relativně využívanou metodou. Několik metod založených na bromaci již bylo popsáno [60,92,127-130], avšak tyto metody se liší jak v použití bromačního činidla, tak reakční teploty, neřeší vliv světla, odlišují se v doporučeném reakčním čase a některé z nich rovněž nevyužívají převedení připraveného dibromderivátu na více stabilní 2-brompropenamid. Co je především podstatné, žádná z těchto popsanych metod není určena pro současné stanovení obou zmíněných analytů. Akrylamid i akrolein jsou neiontové vysoce polární látky s nízkou molekulovou hmotností a bromace jejich dvojných vazby se jeví jako vhodný způsob, jak lze jedním derivatizačním postupem u těchto analytů docílit nejen dostatečné retence

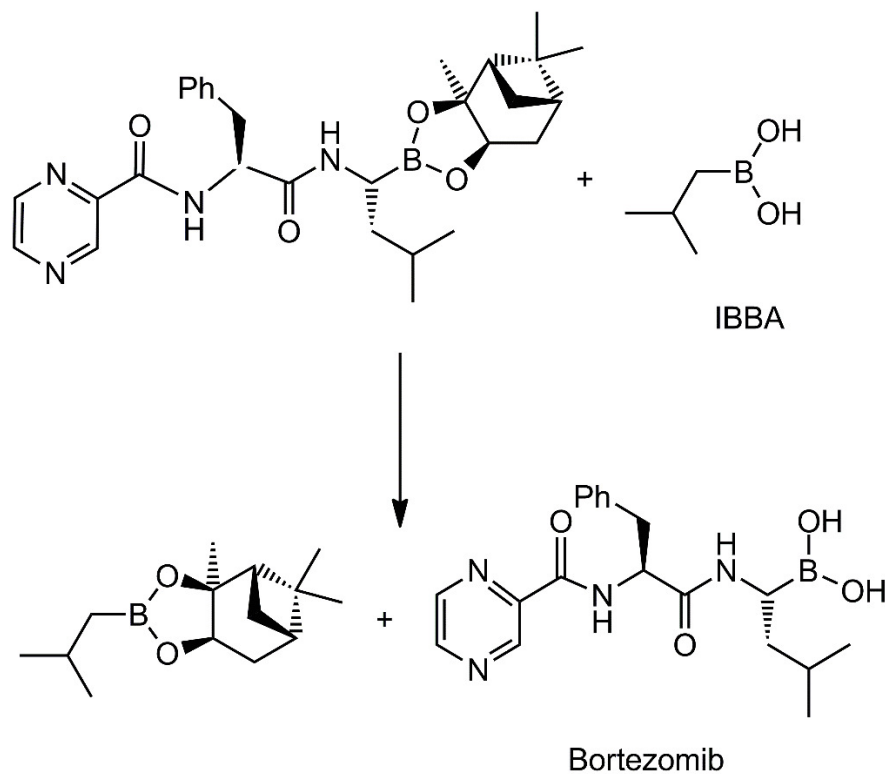
a selektivity na běžně používaných nepolárních stacionárních fázích, ale také jak lze zvýšit jejich molekulovou hmotnost. Díky přítomnosti atomu bromu v jejich struktuře a vyšší molekulové hmotnosti se obě látky stanou snadněji detegovatelné hmotnostním spektrometrem, obzvláště jsou-li stanovovány ve vysoce komplexních vzorcích se složitou matricí. V případě velmi těkavého a reaktivního akroleinu lze bromací dosáhnout rovněž žádoucího zvýšení stability, naopak u akrylamidu se bromací docílí zvýšení těkavosti. Bromace je také výhodná z toho hlediska, že se provádí ve vodném prostředí, ve kterém jsou oba analyty velmi dobře rozpustné. Vnesením bromu do jejich struktur se dosáhne snížení polarity těchto molekul a tím je možné oba analyty snadněji izolovat, jelikož se ochotněji extrahují do méně polárního rozpouštědla.

Vývoj metody umožňující současné stanovení akrylamidu a akroleinu v tabákovém kouři a kouři z elektronických cigaret [131] za využití bromace, jakožto způsobu jejich derivatizace, je jedním z cílů této disertační práce a je součástí experimentální části a výsledků.

2.5. Isobutylboronová kyselina – stanovení zbytkových rozpouštědel

Organická rozpouštědla jsou nepostradatelnou součástí syntézy aktivních farmaceutických substancí a jejich rezidua jsou nežádoucí jak v samotných aktivních látkách, tak také v pomocných složkách léčiv [132]. Obsah zbytkových rozpouštědel je kontrolován na základě limitů stanovených Mezinárodním výborem pro harmonizaci (International Committee for Harmonization; ICH) a hodnoty těchto limitů se odvíjejí od toxicity příslušného rozpouštědla [133]. Přestože se pro jejich odstranění využívají různé techniky a výrobní postupy, tak řada rozpouštědel v nízkých koncentracích v léčivech přetrvává, čímž dochází k ovlivnění celkové kvality produktu [134]. Stanovení zbytkových rozpouštědel v surovinách, meziproduktech a konečných farmaceutických výrobcích prostřednictvím plynové chromatografie se statickým headspace dávkováním vzorků je již rutinní a dobře zavedenou praxí, která je rovněž doporučena evropským i americkým lékopisem [135-140]. Relativní jednoduchost přípravy vzorků, citlivost a nízké riziko kontaminace chromatografického systému nežádoucími netěkavými látkami patří mezi hlavní výhody headspace techniky [141,142]. Avšak ani tuto osvědčenou metodu nelze bez předchozí úpravy vzorku použít v případech, kdy těkavé složky matrice přecházejí do plynné fáze a působí negativně na stacionární fázi chromatografické kolony, případně

způsobují interference během analýz. Do této kategorie těkavých a reaktivních látek, které mají vliv na spolehlivost analýzy v důsledku silného poškození stacionární fáze, spadá kyselina isobutylboronová (IBBA), používaná v posledním kroku syntézy Bortezomibu (Obr. 13). Stanovení koncentrace zbytkových rozpouštědel u takto specifické suroviny vyžaduje rovněž specifický analytický přístup.



Obr. 13: Schéma syntézy Bortezomibu reakcí Bortezomib esteru s IBBA [143].

Isobutylboronová kyselina je abiotickou sloučeninou připravenou synteticky z boru, jehož zdrojem je kupříkladu kyselina boritá. Strukturně se jedná o sloučeninu obsahující trojvazný atom boru, na který jsou navázány dvě hydroxylové skupiny a jeden isobutylový substituent [144]. Komplikace, ke kterým dochází při stanovení zbytkových rozpouštědel v IBBA, souvisejí s těkavostí této látky. IBBA vykazuje významnou tenzi par pod její teplotou tání, která se pohybuje mezi 108-111°C. Tyto páry mají následně negativní vliv na vlastnosti stacionární fáze analytické kolony během headspace analýzy [145]. Stacionární fáze kapilární kolony, která byla vystavena isobutylboronové kyselině v rámci cca 20 headspace analýz, je poškozená do té míry, že je prakticky nepoužitelná pro další analýzy, především pak pro stanovení polárních rozpouštědel, zejména alkoholů. Z tohoto důvodu je nezbytné zařadit do metody určené pro stanovení zbytkových rozpouštědel

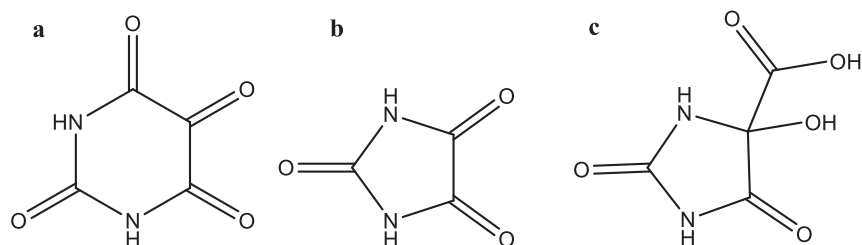
vývoji metody pro stanovení zbytkových rozpouštědel v IBBA, který je součástí experimentální části této disertační práce (viz kapitola 4.2.) [143].

2.6. Alloxan

Alloxan (2,4,5,6-tetraoxypyrimidin; Obr. 15a) je pyrimidinovým derivátem objeveným Brugnatellim v roce 1818, původně jako jeden z rozkladných produktů vznikající při působení kyseliny dusičné na kyselinu močovou. O dvacet let později Wöhler spolu s Liebigem během jejich studií týkajících se oxidace kyseliny močové tuto látku pojmenovali. Dunn a jeho spolupracovníci roku 1943 prokázali diabetogenní účinek alloxanu, který se projevuje nekrózou beta-buněk slinivky břišní produkujících inzulin [156-158]. A právě v nich se alloxan velmi rychle a selektivně akumuluje, což kontrastuje s jeho nízkým příjmem buňkami jiného typu [159]. Afinity alloxanu k beta-buňkám je dána jeho strukturní podobností glukóze. Jedná se o glukózový analog, jehož cytotoxický účinek je spojen s jeho hydrofilitou, schopností vytvářet reaktivní formy kyslíku a reagovat s thiolovou skupinou různých enzymů přítomných v beta-buňkách, zejména pak s nejvíce citlivým enzymem glukokinázou [160,161]. Podle zprávy Světové zdravotnické organizace (WHO) dosahovala v roce 2014 celosvětová prevalence diabetu u dospělých nad 18 let téměř 9 %. V roce 2012 byla cukrovka přímou příčinou 1,5 milionu úmrtí [162]. Jednou z nejběžnějších strategií využívaných při studii diabetu a při vývoji nových léčiv je využití pokusného zvířecího modelu [163], jehož podoba se během let vyvíjela, přičemž se jako nejúčinnější způsob vyvolání experimentálního diabetu osvědčila chemická indukce alloxanem [156,164,165]. Studie, kterou publikoval *Mrozikiewicz a kol.*, byla zaměřena na sledování hladiny alloxanu v krvi u zdravých dětí a dětí s diabetem. Tento výzkum prokázal přítomnost endogenního alloxanu u obou testovaných skupin dětí [166]. Rovněž *Korzhenevskiy a kol.* svojí studií potvrdili přítomnost různého množství alloxanu v krvi zdravých jedinců [167]. V posledních letech se lze také setkat s tvrzeními o přítomnosti alloxanu v bělené pšeničné mouce, ve které vzniká jako vedlejší produkt oxidace xantofylů během procesu bělení mouky [168,169]. Skutečnost, že je alloxan přítomen v bělené mouce, byla věrohodně prokázána až v roce 2017 *Giacconem* a jeho kolegy [170].

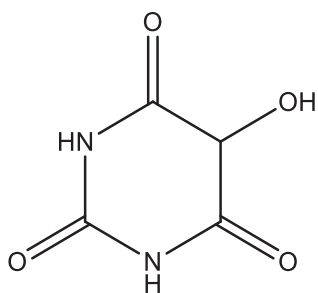
Z důvodu nestability se alloxan ve vodném roztoku o pH vyšším než 3,5 spontánně rozkládá během několika minut na kyselinu alloxanovou. V případě krystalického alloxanu skladovaného při laboratorní teplotě pak dochází k rozkladu za vzniku řady produktů

v podobě oxidu uhličitého, močoviny, alloxantinu, kyseliny šťavelové, parabanové (Obr. 15b) a alloxanové (Obr. 15c) [169,171,172]. Tato nestabilita alloxanu může vést k problémům při vývoji metod pro jeho stanovení.



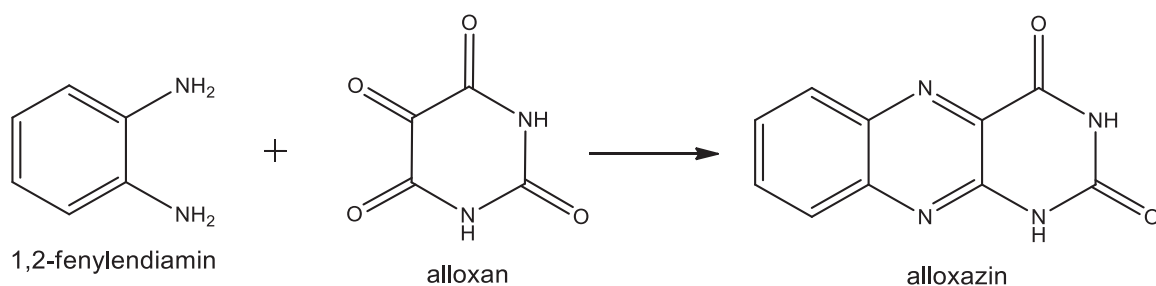
Obr. 15: Struktura alloxanu (a), parabanové kyseliny (b) a alloxanové kyseliny (c).

První metody určené k detekci alloxanu pocházejí z 19. století a jsou založeny na reakci alloxanu se sulfanem za vzniku zákalu (koloidní síra), na tvorbě charakteristických krystalů reakcí s roztokem měďnatých iontů v pyridinu, na barevné reakci s α -naftylaminem. Později navržené gazometrické a titrační metody byly využity pro stanovení čistoty připraveného alloxanu, případně jeho stanovení jako nečistoty v produktech oxidace kyseliny močové [171]. Citlivější kolorimetrické metody využívají reakce alloxanu s kyselinou fosfowolframovou, diacetylmonoximem a *o*-fenylendiaminem. A právě reakcí alloxanu s *o*-fenylendiaminem lze připravit produkt alloxazin, který lze stanovit fluorimetricky [171]. V roce 1964 *Said a kol.* publikovali metodu pro separaci a detekci alloxanu v krvi a plazmě prostřednictvím papírové chromatografie, kdy skvrny alloxanu po vystavení parám amoniaku vykazují silnou modrou fluorescenci pod ultrafialovým světlem [173]. Z metod publikovaných v nedávné době lze zmínit práci *Shpiguna a kol.*, kteří navrhli průtokovou injekční analýzu s amperometrickou detekcí pro stanovení alloxanu převedeného redukcí pomocí glutathionu na kyselinu dialurovou (Obr. 16) detegovanou prostřednictvím elektrody ze skelného uhlíku. Limit detekce byl u této metody stanoven na hodnotu 50 μM . *Shpigun* ve stejné publikaci prezentoval taktéž druhou metodu založenou na průtokové injekční analýze, avšak se spektrofotometrickou detekcí. Metoda využívá možnosti alloxanu působit jako generátor reaktivních forem kyslíku v přítomnosti unithiolu (2,3-dimerkapto-1-propansulfonová kyselina), přičemž dochází prostřednictvím vznikajících volných radikálů ke tvorbě modře zbarveného 1,3,5-trifenylformazanu z 2,3,5-trifenyltetrazoliového iontu. Zmíněnou metodou bylo pro alloxan dosaženo LOD 36 μM [174].



Obr. 16: Struktura kyseliny dialurové.

Raghavamenon a kol. roku 2009 vyvinuli metodu založenou na HPLC separaci v módu reverzních fází s fluorimetrickou detekcí. Metoda zahrnuje chemickou derivatizaci alloxanu prostřednictvím 1,2-fenylendiaminu za vzniku fluoreskujícího alloxazinu (Obr. 17) [169]. Tento způsob derivatizace alloxanu byl již dříve publikován *Archibaldem* [171]. Autoři metodu využili pro stanovení alloxanu přidaného k buněčným kulturám a lze ji využít i k analýze komplexních fyziologických tekutin a tkání s pikomolární koncentrací alloxanu [169].



Obr. 17: Reakce 1,2-fenylendiaminu s alloxanem za vzniku alloxazinu [169].

První důkaz o přítomnosti alloxanu v bělené mouce poskytl *Giaccone a kol.*, kteří publikovali UHPLC-MS/MS metodu využívající již výše zmíněné chemické derivatizace alloxanu 1,2-fenylendiaminem za vzniku alloxazinu. K detekci tohoto derivátu využili trojitý kvadrupól s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu za současného sledování protonované molekuly 215,1 m/z. Autoři podrobili testování celkem 175 vzorků bělené mouky různého typu (chlebová, dortová aj.) a hrubosti, přičemž přítomnost alloxanu potvrdili u 42 vzorků, a to v množství pohybujícím se mezi 0,88-1,02 mg/kg. Ve všech případech se jednalo o mouku určenou pro přípravu dortů, což autoři dávají do souvislosti se způsobem bělení tohoto typu mouky, pro který se používá bělení pomocí plynného chloru a oxidu chloričitého, a také s vyšším obsahem glutenu, který je pro tento typ mouky typický. Zmíněná bělicí činidla se používají z důvodu vylepšení vlastností mouky v procesu tzv.

umělého zrání mouky, které by přirozeným způsobem trvalo až několik měsíců. Navrženou metodou bylo dosaženo LOD o hodnotě 0,73 mg/kg [170].

Vývoj GC/MS metody pro stanovení alloxanu (včetně metody pro stanovení produktů jeho rozkladu - kyseliny alloxanové a parabanové) je dalším tématem řešeným v rámci této disertační práce a je detailněji popsán v experimentální části (viz kapitola 4.3.). Vývoj této metody byl započat ještě před publikováním metody *Giaccona* v roce 2017, tedy v době, kdy přítomnost alloxanu v bělené mouce nebyla ještě spolehlivě prokázána.

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Vědecko-výzkumná činnost v rámci doktorského studia byla zaměřena na nové možnosti a postupy v analýze polárních látek prostřednictvím plynové chromatografie, ať již ve spojení s FID nebo MS detekcí. Cílem bylo rozšířit spektrum látek analyzovatelných touto instrumentací o další analyty, a to především díky spojení této techniky s chemickou derivatizací, které je v této práci věnována zvláštní pozornost. Mezi konkrétní cíle výzkumné činnosti patří vývoj metod pro toxikologicky významné analyty z oblasti potravinářství i farmacie:

- Návrh a vývoj plynově chromatografické metody ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí umožňující současné stanovení akrylamidu a akroleinu v tabákovém kouři a kouři (aerosolu) z elektronických cigaret.
- Návrh, vývoj a validace metody pro stanovení zbytkových rozpouštědel v kyselině isobutylboronové, používané při syntéze léčiva Bortezomib, při jejíž analýze není možné z důvodu poškozování stacionární fáze kolony využít běžně používanou metodu pro stanovení zbytkových rozpouštědel.
- Návrh a vývoj GC/MS metod pro stanovení polárního analytu – alloxanu a jeho degradačních produktů v bělené mouce.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. GC/MS metoda pro současné stanovení akrylamidu a akroleinu v tabákovém kouři a kouři (aerosolu) z elektronických cigaret [131]

4.1.1. Chemikálie, činidla a vzorky

Použity byly tyto chemikálie: Allyl alkohol ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH}$), kyselina sírová (H_2SO_4 ; 96%), *n*-propanol (*n*-PrOH), ethylacetát (EtAc) vše v analytické čistotě od společnosti Merck (Darmstadt, Německo). Bromičnan draselný (KBrO_3), bromid draselný (KBr), dichroman sodný ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), bezvodý síran hořečnatý (MgSO_4), pentahydrát thiosíranu sodného ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), triethylamin (TEA; 99%), akrolein (99%), akrylamid (99%) byly získány od společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Voda byla přečištěna Milli-Q systémem (Millipore, Darmstadt, Německo) s $0,22\mu\text{m}$ filtrem.

Pro analýzu reálných vzorků byly zakoupeny doutníky jednoho druhu a 2 elektronické cigarety. Jedna z těchto elektronických cigaret byla jednorázového typu (příchuť Marlboro; Obr. 18), druhá z cigaret byla plnitelná (Obr. 19) a byly u ní použity náplně s příchutí višně a turecký tabák.



Obr. 18: Elektronická cigareta jednorázového typu.



Obr. 19: Plnitelná elektronická cigareta včetně testovaných náplní.

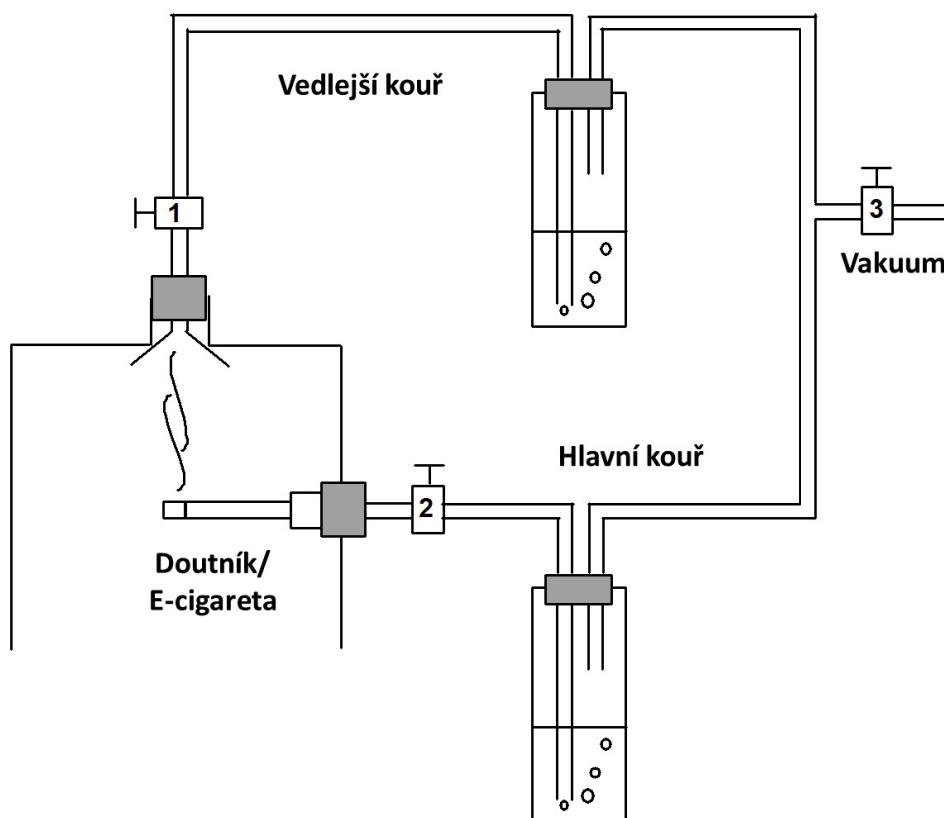
4.1.2. Příprava standardu akroleinu

Standard akroleinu byl připraven vždy čerstvý podle postupu publikovaného Šedivcem a kol. [175]. Při přípravě bylo smícháno 100 ml H_2O s 5 ml oxidačního roztoku a 250 μl allyl alkoholu. Takto připravená směs byla pozvolna zahřívána v destilační aparatuře. Oxidační roztok se skládal z 10 g $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 70 ml H_2O a 25 ml H_2SO_4 . Tento roztok byl uchováván při -5°C . Po získání 5 ml destilátu bylo do destilačního systému přidáno dalších 5 ml oxidačního roztoku a 250 μl allyl alkoholu, tak aby bylo vydestilováno dalších 5 ml roztoku akroleinu.

4.1.3. Aparatura pro záchyt plyných vzorků

Pro napodobení reálného uživatele tabákových výrobků/e-cigaret byla sestavena aparatura (Obr. 20), která byla vybavena regulátorem průtoku vzduchu a připojena ke zdroji vakua. Tato aparatura byla navržena tak, aby bylo možné simulovat základní proměnné určené Mezinárodní organizací pro normalizaci (ISO) [176]. Tento standardizovaný postup zahrnuje simulaci kouření, při kterém je každou minutu po dobu 2 sekund vzorkováno 35 ml kouře. Pro záchyt pevných i plyných částic v kouři byla použita demineralizovaná Milli-Q voda. Odpovídající tlak vakua byl předem nastaven pomocí bublinkového průtokoměru. Prostřednictvím tohoto systému byl v případě elektronické cigarety prováděn záchyt pouze hlavního kouře, zatímco v případě cigarety/doutníku byl rovněž zachycován kouř vedlejší (při otevřeném ventilu č. 1; Obr. 20), který je důležitý z hlediska pasivního kouření. V tomto případě bylo nezbytné upravit tlak vakua tak, aby byly udrženy potřebné

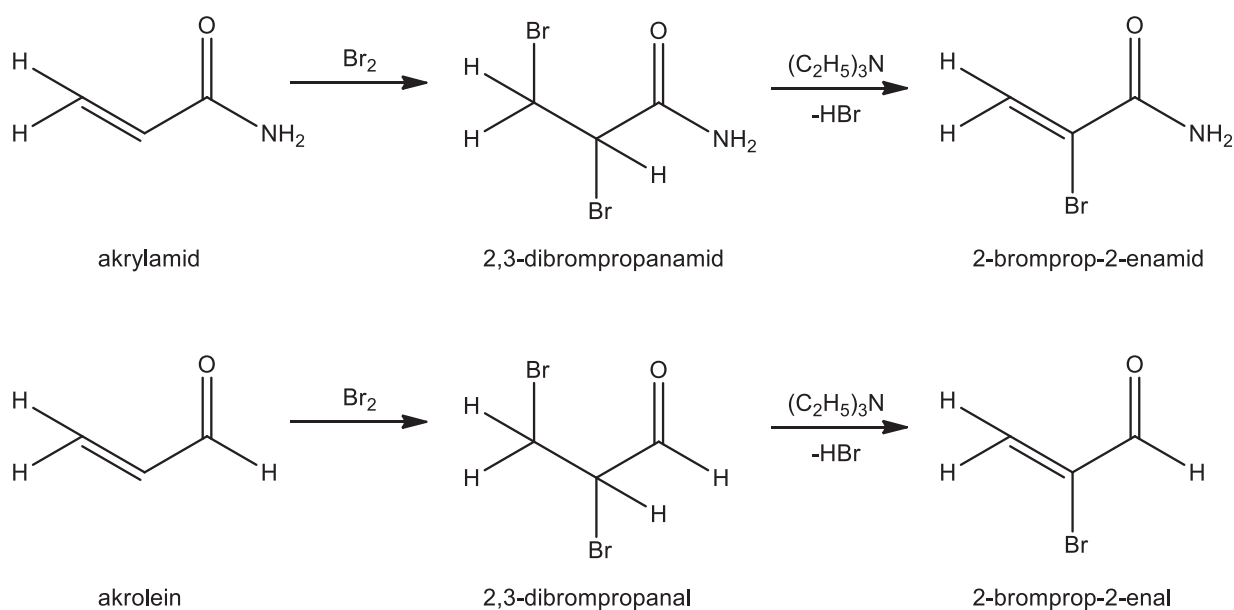
průtoky. Po skončení vzorkování bylo z promývačky odebráno 10 ml roztoku, které byly následně podrobeny derivatizaci.



Obr. 20: Aparatura pro záchyt tabákového kouře a kouře z elektronických cigaret [131].

4.1.4. Derivatizace

K derivatizaci akroleinu a akrylamidu byla využita modifikovaná metoda bromace (Obr. 21) podle *Hashimota* [177]. Proces bromace zahrnuje přidavek 2 ml roztoku 0,1M KBrO_3 a nadbytku pevného KBr k 10 ml vzorku odebraného z promývačky (kouř zachycený ve vodě). Následným přidavkem 2 ml 0,1M roztoku H_2SO_4 byla zahájena bromace. Ke tvorbě bromu dochází prostřednictvím redoxní reakce, která je indikována žlutým zbarvením směsi. Po 30 minutách, kdy byla reakční směs umístěna na chladném a tmavém místě, byl nadbytek bromu rozložen takovým přidavkem 0,1M roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, aby se žlutý roztok právě odbarvil (cca 1,5 ml). Tato směs s nabromovaným akrylamidem a akroleinem byla následně 3x extrahována 2 ml ethylacetátu, který byl poté vysušen pomocí MgSO_4 a zakoncentrován na objem 1 ml pod jemným proudem čistého dusíku. Následně bylo k tomuto extraktu přidáno 10 μl TEA.



Obr. 21: Bromace a dehydrobromace akrylamidu a akroleinu.

4.1.5. Přístrojové vybavení a parametry metody

K vlastnímu měření byl použit plynový chromatograf *Agilent 7890B* s automatickým dávkovačem *Agilent 7963* a nepolární kapilární kolonou (HP-5ms, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) ve spojení s *hmotnostním spektrometrem Agilent 5975C* (vše Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Kapalně vzorky byly dávkovány v pulzním splitless módu při tlaku 20 psi po dobu 0,4 minuty. Teplota nástřikového prostoru byla nastavena na 280°C a teplotní program metody byl následující: 50°C po dobu 6 minut, následně nárůst teploty o 10°C/min do 300°C a poté byla tato teplota udržována 10 minut. Jako nosný plyn bylo zvoleno helium čistoty 5.0 s průtokem kolonou 0,9 ml/min.

V případě hmotnostního spektrometru byla zvolena elektronová ionizace (EI) při 70 eV. Data byla sbírána jak v módu celkového iontového proudu (TIC), tak také v režimu monitorování selektivního iontu (SIM). Přístroje byly ovládány a data byla sbírána softwarem GC/MSD ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

4.1.6. Validační parametry

Kvantifikace akrylamidu byla provedena za použití metody standardního přídatku. Před provedením derivatizace byly k roztoku odebraném ze zachytné aparatury přidány různé objemy vodného roztoku (1 mg/ml) akrylamidu (5, 10 a 50 μl).

Přesná koncentrace připraveného standardu akroleinu nebyla známa, což bylo rovněž dáno chemickou nestabilitou akroleinu. Pro kvantifikaci akroleinu v tabákovém kouři

a kouři z elektronických cigaret byl využit předem kvantifikovaný akrylamid, jakožto interní standard. V průběhu celého procesu vykazoval podobné vlastnosti jako akrolein, ale poskytoval signál odlišitelný od signálu bromovaného akroleinu. Odezvový faktor byl stanoven na různých koncentračních úrovních z komerčně získaných standardů. Plocha píku bromovaného akrylamidu byla shledána 4,35-krát větší (relativní směrodatná odchylka <10 %) než plocha píku bromovaného akroleinu při stejné koncentraci.

Pro lepší srovnání jsou naměřené výsledky uvedeny v mikrogramech na ekvivalent jedné cigarety. Na základě našich výpočtů jsme stanovili, že 15 standardních „vdechnutí“ kouře odpovídá jedné klasické cigaretě, takže množství akrylamidu a akroleinu bylo vyjádřeno v mikrogramech na 15 „vdechnutí“ kouře.

Metoda pro stanovení akrylamidu a akroleinu byla validována v těchto parametrech:

Linearita

Roztoky byly připraveny přidáním 10 μ l akroleinu a akrylamidu při šesti různých koncentračních úrovních v rozmezí 0 – 2 μ g/ml do vodného roztoku s absorbovaným kouřem. Vzorky kalibračních řad byly připraveny ve třech opakováních a byly podrobeny celému procesu zpracování vzorku od derivatizace až po extrakci a zakoncentrování. Každý z kalibračních bodů byl následně 3-krát analyzován. Kalibrační křivka pro akrylamid byla sestavena jako závislost koncentrace na průměrné ploše píku. Rovnice kalibrační přímky byla vypočtena metodou nejmenších čtverců pomocí programu Microsoft Excel. V posuzovaném rozsahu byla lineární (koeficient determinace $R^2 = 0,9990$).

Limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ)

Limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byly vypočítány jako $3,3 \times \sigma/S$ respektive $10 \times \sigma/S$, přičemž σ odpovídá směrodatné odchylce úseku na ose y a S hodnotě směrnice kalibrační závislosti.

Preciznost

Preciznost byla vypočítána jako relativní směrodatná odchylka (RSD) z ploch píků.

4.2. Stanovení zbytkových rozpouštědel v isobutylboronové kyselině – využití maskovací derivatizace ke zlepšení stability GC kolony [143]

4.2.1. Chemikálie, činidla

Použity byly tyto chemikálie: Isobutylboronová kyselina (IBBA) byla dodána dvěma dodavateli Apollo Scientific (Stockport, UK) a Optima Chemical (Douglas, GA, USA). 1,8-diaminonafthalen (DAN; $\geq 99\%$), 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO; $\geq 99\%$) a *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA, pro GC derivatizaci) byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Methylpyrrolidon (MP; $\geq 99,5\%$) a benzylalkohol (BA; $\geq 99,5\%$) byly dodány společností Merck (Darmstadt, Germany).

Standardy: *tert*-butyl methyl ether (*t*-BME), toluen, ethylacetát (EtAc), hexan, methanol (MeOH), 2-propanol, tetrahydrofuran (THF) a heptan (vše $\geq 99,5\%$) použité pro přípravu kalibračních roztoků zbytkových rozpouštědel byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany).

4.2.2 Příprava roztoků a vzorku

Příprava maskovacího roztoku

Maskovací roztok (MR) byl připraven přesným navážením 11,0 g DAN a 2,5 g DABCO do 50ml odměrné baňky. Vše bylo následně rozpuštěno asi ve 40 ml BA za současného zahřívání při teplotě 60°C po dobu 15 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla odměrná baňka doplněna po rysku BA.

Příprava vzorku

Asi 50,0 mg vzorku bylo přesně naváženo do 20ml headspace vialky, do které bylo následně pomocí plynotěsné stříkačky přidáno 0,5 ml MR, vialka byla propláchnuta argonem a okamžitě utěsněna. Maskovací reakce mezi vzorkem IBBA a činidlem DAN byla prováděna v sušárně při teplotě 50°C po dobu 60 minut. Po 10 minutách zahřívání byla headspace vialka lehce promíchána, tak aby došlo k úplnému rozpuštění vzorku IBBA. Po inkubaci a ekvilibraci byl 1 ml plynné fáze dávkován do plynového chromatografu. Každá z vialek byla analyzována jen jednou. Jako blank bylo použito 0,5 ml MR.

Příprava kalibračních roztoků

Příprava zásobního kalibračního roztoku (SCS)

Přibližně 15 ml MP bylo nalito do 50ml odměrné baňky. Následně byla pomocí plynotěsné stříkačky pod hladinu MP postupně přidávána vybraná rozpouštědla, přičemž přírůstek každého rozpouštědla byl přesně zvážen. Poté byla odměrná baňka doplněna po rysku MP. Množství jednotlivých rozpouštědel v SCS roztoku a jejich přibližná koncentrace v pracovním kalibračním roztoku (WCS) jsou vztaženy k navážce vzorku (Tab. I). Zásobní kalibrační roztok byl připraven ve dvou opakováních.

Tab. I: Obsah jednotlivých rozpouštědel v kalibračních roztocích.

Analyt	ICH limit (ppm)	Navážka v SCS roztoku (mg)	Obsah ve WCS roztoku (µg/ml)	Obsah vztažený k navážce vzorku (ppm)
MeOH	3000	375	300	3000
2-propanol	5000	625	500	5000
<i>t</i> -BME	5000	625	500	5000
hexan	290	36	28,8	288
EtAc	5000	625	500	5000
THF	720	90	72	720
heptan	5000	625	500	5000
toluen	890	111	88,8	888

Příprava pracovního kalibračního roztoku (WCS)

Přibližně 5 ml MR bylo nalito do 10ml odměrné baňky a následně bylo přesně přidáno 0,4 ml roztoku SCS plynotěsnou stříkačkou a baňka byla doplněna po rysku roztokem MR. Pracovní kalibrační roztoky byly připraveny ve dvou opakováních. Přesně 0,5 ml WCS roztoku bylo inkubováno a ekvilibrováno ve 20ml headspace vialce s následným nadávkováním 1,0 ml plynné fáze do plynového chromatografu. Z každé vialky byla provedena jedna analýza.

Příprava roztoku pro test způsobilosti (TSS)

Přibližně 5 ml MR bylo nalito do 10ml odměrné baňky a následně bylo přesně přidáno 200 µl roztoku WCS plynotěsnou stříkačkou a baňka byla doplněna po rysku roztokem MR. Přesně 0,5 ml TSS roztoku bylo inkubováno a ekvilibrováno ve 20ml headspace vialce s následným nadávkováním 1,0 ml plynné fáze do plynového chromatografu. Z každé vialky byla provedena jedna analýza.

4.2.3. Optimalizace reakční doby maskovací reakce

Reakce mezi IBBA a DAN v molárním poměru 1:1,4 (vše rozpuštěno v 1 ml benzylalkoholu s přídavkem DABCO) byla provedena ve 2ml krimpovacích vialkách při 50°C s dobou reakce v rozmezí 0-90 minut. V příslušném čase bylo vždy do čisté vialky odebráno 100 µl reakční směsi. Reakce byla zastavena silylací nezreagovaného činidla DAN přídavkem 250 µl BSTFA a 50 µl pyridinu. Směs byla ponechána po dobu 30 minut při teplotě 80°C. Následně k ní bylo přidáno 0,5 ml toluenu a byla provedena analýza metodou přímého nástřiku do plynového chromaotgrafu.

4.2.4. Přístrojové vybavení a parametry metody

K vlastnímu měření byl použit plynový chromatograf *Agilent 7890A* ve spojení s plamenoionizačním detektorem (FID) a kapilární kolonou (RES-SOLV, 30 m × 0,53 mm × 1 µm) (vše Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Statické headspace dávkování vzorku bylo provedeno pomocí automatického headspace dávkovače *Agilent 7697A* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Zakrmpované 20ml headspace vialky obsahující vzorek byly ekvilibrovány při teplotě 90°C po dobu 20 min. Doba nástřiku vzorku byla nastavena na 2 minuty při teplotě dávkovací smyčky 150°C a teplotě transferline 160°C. Nástřik plynné fáze byl proveden za těchto podmínek: teplota nástřikového prostoru byla nastavena na 220°C, dávkován byl 1 ml v módu split 1:6. Teplotní program metody byl nastaven následovně: 40°C po dobu 4,2 minuty, následně nárůst teploty o 25°C/min do 220°C a poté byla tato teplota udržována 1 minutu. Parametry detektoru byly nastaveny na následující hodnoty: teplota 280°C, průtok vzduchu 300 ml/min, průtok vodíku 30 ml/min, průtok makeup plynu (N₂) 20 ml/min. Jako nosný plyn bylo zvoleno helium (4.6) s průtokem kolonou 4,8 ml/min.

4.2.5. Validační parametry

Specificita

Specificita metody byla testována na základě měření blanku, roztoku TSS, WCS a roztoku vzorku. V chromatogramu z analýzy blanku byla následně v retenčních časech (RT) analytů zjišťována přítomnost interferujících píků o ploše větší než je úroveň Reporting level (RL).

Z analýzy roztoku TSS bylo stanoveno rozlišení vypočítané dle vzorce:

$$R = 1,176 \times \left(\frac{t_{RB} - t_{RA}}{w_{\frac{1}{2}A} + w_{\frac{1}{2}B}} \right)$$

kde t_{RA} , t_{RB} – jsou retenční časy látek A a B, $w_{\frac{1}{2}A}$, $w_{\frac{1}{2}B}$ – šířka píků v polovině výšky látky A a B.

Linearita

Linearita kalibrační závislosti zbytkových rozpouštědel (MeOH, 2-propanol, t-BME, hexan, EtAc, THF, heptan a toluen) byla testována na koncentračních úrovních 2 % (RL), 5 %, 10 %, 100 % a 120 % ICH limitu (viz Tab. II). Pro testování linearity bylo ředěním ze dvou zásobních kalibračních roztoků (SCS) připraveno celkem 6 roztoků ve dvou kalibračních řadách. Korelační koeficient pro každé rozpouštědlo byl vypočítán na základě sestrojení kalibrační závislosti plochy píku analytu na jeho koncentraci. Lineární regrese byla vypočtena metodou nejmenších čtverců pomocí programu Microsoft Excel.

Tab. II: Obsah zbytkových rozpouštědel v roztocích pro měření linearitu.

Roztok pro linearitu č.	SCS roztok č.	MeOH	2-propanol	t-BME	hexan	EtAc	THF	heptan	toluen
		(% ICH specifikace/ppm)							
Lin1 (RL)	1	2/60	2/100	2/100	2/5,8	1/50	2/14,4	2/100	2/17,8
Lin2	2	5/150	5/250	5/250	5/14,5	2,5/125	5/36	5/250	5/44,5
Lin3	1	10/300	10/500	10/500	10/29	5/250	10/72	10/500	10/89
Lin4	2	50/1500	50/2500	50/2500	50/145	25/1250	50/360	50/2500	50/445
Lin5	1	100/3000	100/5000	100/5000	100/290	50/2500	100/720	100/5000	100/890
Lin6	2	120/3600	120/6000	120/6000	120/348	60/3000	120/864	120/6000	120/1068

Preciznost

Preciznost byla stanovována na úrovni Reporting Level na základě 6-ti nástríků roztoku TSS. Preciznost byla vypočtena jako relativní směrodatná odchylka (RSD) z ploch píků a rovněž i z retenčních časů.

Přesnost

Přesnost byla stanovována na základě tří opakování nástríku roztoku pro linearitu (Lin1 – Lin6). Přesnost byla určena porovnáním hodnot získaných z kalibračních závislostí a pravých hodnot (obsah standardu v roztoku pro linearitu).

Výtěžnost

Výtěžnost byla stanovena na základě spikování IBBA vzorku známým množstvím analytů na čtyřech různých úrovních (120 %, 100 %, 10 % a 2 % (RL) ICH limitů).

Limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ)

Limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) analytů (s výjimkou toluenu) byly vypočítány na základě 6-ti nástriků roztoku TSS, dle rovnice 1 a 2.

$$LOD = 3 \times c \times \frac{n}{s} \quad (1)$$

$$LOQ = 10 \times c \times \frac{n}{s} \quad (2)$$

kde n – je šum, s – výška píku (signálu), c – koncentrace analytu v roztoku TSS v jednotkách ppm.

V případě toluenu byly hodnoty LOD a LOQ stanoveny z lineární regresní rovnice z důvodu jeho přítomnosti v blanku. LOD a LOQ byly vypočítány jako $3 \times \sigma/S$ respektive $10 \times \sigma/S$, přičemž σ odpovídá směrodatné odchylce úseku na ose y a S hodnotě směrnice kalibrační závislosti.

Akceptační kritéria vybraných validačních parametrů jsou uvedena v Tab. IV, která je součástí kapitoly 5.2.3.

4.3. GC/MS metoda pro stanovení alloxanu a jeho rozkladných produktů v mouce

4.3.1. Chemikálie, činidla a vzorky

Použity byly tyto chemikálie: alloxan monohydrát, *N-terc*-butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoracetamid (MTBSTFA) s obsahem 1 % *terc*-butyldimethylchlorsilanu (*t*-BDMCS), *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA), vše zakoupeno od společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 1,2-fenylendiamin, 4-chlor-1,2-fenylendiamin, 4,5-dichlor-1,2-fenylendiamin, 4-brom-1,2-fenylendiamin a 4,5-dibrom-1,2-fenylendiamin byly dodány společností TCI Chemicals (Tokyo, Japonsko). Methanol, acetonitril, pyridin a kyselina chlorovodíková (HCl; 37 %) byly pořízeny od společnosti Merck (Darmstadt, Německo). Voda byla přečištěna Milli-Q systémem (Millipore, Darmstadt, Německo) s 0,22 μ m filtrem. Pro extrakci tuhou fází (SPE) byly použity kolonky Oasis HLB 3 cc Vac Cartridge (60 mg, 30 μ m) od firmy Waters (Milford, MA, USA). Pro filtraci methanolického extraktu byl využit stříkačkový nylonový filtr o velikosti pórů 0,45 μ m dodaný firmou Labicom. Pro testování reálných vzorků byly zakoupeny 3 druhy bělených mouk z amerického trhu (Obr. 22) a dále také několik nebělených mouk českých výrobců.

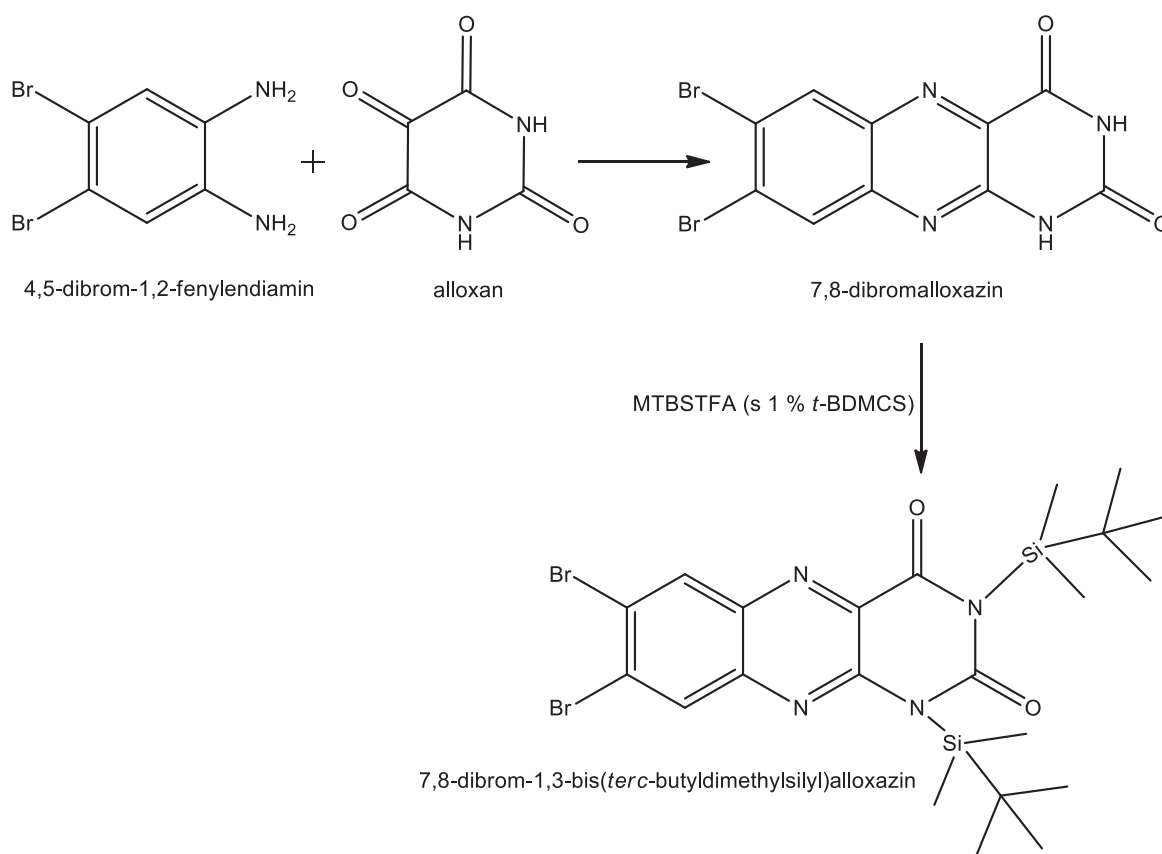


Obr. 22: Bělené mouky dodané z USA, které byly testovány na obsah alloxanu.

4.3.2. Příprava vzorku pro stanovení alloxanu v mouce

Do plastové centrifugační zkušavky byl navážen 1 g mouky, ke kterému bylo následně přidáno 5 ml 0,3M HCl. Připravená směs byla třepána po dobu 2 minut, dalších 5 minut sonifikována a 3 minuty při 4400 rpm centrifugována. 0,5 ml tohoto extraktu bylo odpipetováno do skleněné 20ml vialky a smícháno se 4,5 ml derivatizačního roztoku, který

byl připraven rozpuštěním 18 mg 4,5-dibrom-1,2-fenylendiaminu v 50 ml 0,3M HCl. Reakční směs byla temperována při teplotě 60°C po dobu 60 minut a následně ochlazená na laboratorní teplotu a postupně nanášena na SPE kolonku OASIS HLB, která byla předem kondicionována 1 ml acetonitrilu, 1 ml pyridinu a 1 ml 0,3M HCl. 7,8-dibromalloxazin, připravený kondenzací 4,5-dibrom-1,2-fenylendiaminu s alloxanem (Obr. 23), byl z SPE kolonky eluován 2 ml směsí acetonitrilu a pyridinu (v poměru 1:1). Tento extrakt byl ve skleněné krimpovací champagne vialce postupně pod jemným proudem dusíku odpařen do sucha a poté rozpuštěn ve 100 µl pyridinu a 100 µl silylačního činidla MTBSTFA s obsahem 1 % *t*-BDMCS. Směs byla v uzavřené vialce po dobu 45 minut zahřívána na teplotu 60°C a následně byla analyzována prostřednictvím GC/MS.



Obr. 23: Schéma derivatizace alloxanu.

4.3.3. Identifikace produktů vznikajících rozkladem krystalického alloxanu

Krystalický alloxan (500 µg) byl ponechán v otevřené skleněné krimpovací champagne vialce po dobu 24 hodin při laboratorních podmínkách. Následně bylo do vialky přidáno 100 µL pyridinu a 100 µL silylačního činidla BSTFA. Směs byla po dobu jedné

hodiny zahřívána v uzavřené vialce na teplotu 60°C a následně byla analyzována prostřednictvím GC/MS.

4.3.4. Příprava vzorku pro stanovení kyseliny parabanové a alloxanové v mouce

Do plastové centrifugační zkumavky byl navážen 1 g mouky, ke kterému bylo následně přidáno 5 ml methanolu. Připravená směs byla třepána po dobu 2 minut, dalších 5 minut sonifikována a 3 minuty při 4400 rpm centrifugována. Methanolický extrakt byl zfiltrován pomocí nylonového stříkačkového filtru o velikosti pórů 0,45 μm , převeden do skleněné krimpovací champagne vialky, kde byl postupně pod jemným proudem dusíku odpařen do sucha. Poté byl rozpuštěn ve 100 μl pyridinu se 100 μl silylačního činidla BSTFA. Směs byla v uzavřené vialce po dobu 30 minut zahřívána na teplotu 70°C a následně byla analyzována prostřednictvím GC/MS.

4.3.5. Přístrojové vybavení a parametry metod

K vlastnímu měření byl použit plynový chromatograf *Agilent 6890N* s automatickým dávkovačem *Agilent 7963* a nepolární kapilární kolonou (HP-5ms, 30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 μm) ve spojení s *hmotnostním spektrometrem Agilent 5973N* (vše Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Parametry metody pro analýzu degradačních produktů alloxanu a analýzu parabanové a alloxanové kyseliny v mouce

Kapalné vzorky byly dávkovány v pulzním splitless módu při tlaku 20 psi po dobu 0,4 minuty. Teplota nástřikového prostoru byla nastavena na 280°C a teplotní program metody byl následující: 90°C po dobu 2 minut, následně nárůst teploty o 5°C/min do 200°C a poté nárůst teploty o 10°C/min do 300°C a tato teplota udržována po dobu 10 minut. Jako nosný plyn bylo zvoleno helium čistoty 5.0 s průtokem kolonou 0,9 ml/min.

V případě hmotnostního spektrometru byla zvolena elektronová ionizace (EI) při 70 eV. Data byla sbírána jak v módu TIC, tak také v režimu SIM, kdy pro kyselinu parabanovou byly sbírány ionty 243 a 258 m/z, a pro kyselinu alloxanovou ionty 331, 405 a 433 m/z. Přístroje byly ovládány a data byla sbírána softwarem GC/MSD ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Parametry metody pro analýzu alloxanu v mouce

Kapalné vzorky byly dávkovány v pulzním splitless módu při tlaku 20 psi po dobu 0,6 minuty. Teplota nástřikového prostoru byla nastavena na 300°C a teplotní program metody byl následující: 90°C po dobu 2 minut, následně nárůst teploty o 10°C/min do 300°C a tato teplota udržována po dobu 20 minut. Jako nosný plyn bylo zvoleno helium čistoty 5.0 s průtokem kolonou 0,9 ml/min.

V případě hmotnostního spektrometru byla zvolena elektronová ionizace (EI) při 70 eV. Data byla sbírána jak v módu TIC, tak také v režimu SIM, ve kterém byly monitorovány ionty 541, 543, 545 m/z. Přístroje byly ovládány a data byla sbírána softwarem GC/MSD ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. GC/MS metoda pro současné stanovení akrylamidu a akroleinu v tabákovém kouři a kouři (aerosolu) z elektronických cigaret

Výsledky uvedené v této části byly publikovány v práci: R. Papoušek, Z. Pataj, P. Nováková, K. Lemr, P. Barták, *Determination of Acrylamide and Acrolein in Smoke from Tobacco and E-Cigarettes*, *Chromatographia* 77 (2014) 1145-1151.

5.1.1. Záchyt plyných vzorků

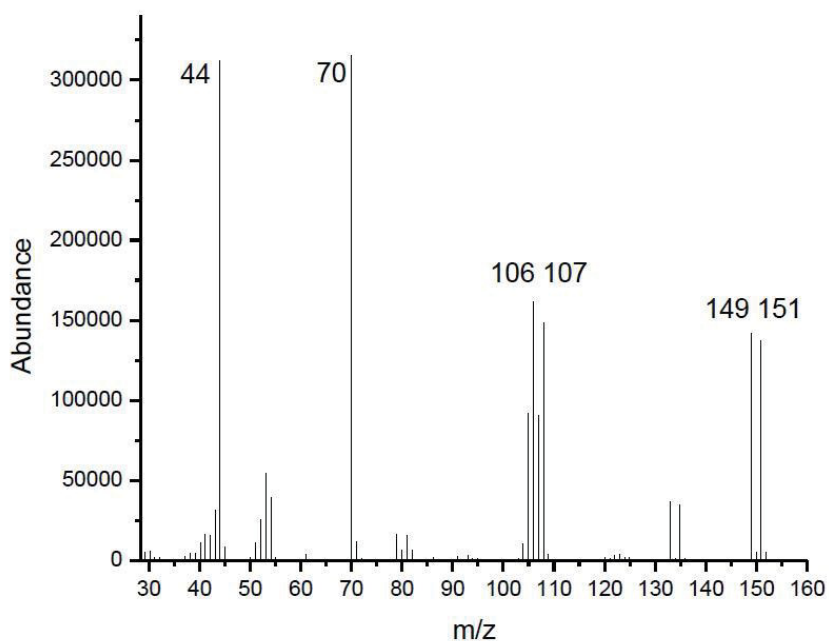
Jedním z nejdůležitějších kroků celé analýzy bylo vytvoření vhodného způsobu vzorkování, které by věrně napodobovalo reálného uživatele tabákových výrobků a elektronických cigaret. Pomocí aparatury (Obr. 20), která byla speciálně pro tento účel navržena, bylo možné dodržet standardizovaný postup záchytu vzorku zahrnující simulaci kouření s odběrem definovaného množství vzorku v pravidelných intervalech. Místo filtru ze skelných vláken a vzduchotěsného vaku, které jsou doporučeny ISO normou [178], byl záchyt pevných i plyných částic přítomných v kouři uskutečněn prostřednictvím promývačky naplněné Milli-Q vodou. Pro záchyt polárních analytů a jejich následnou chemickou derivatizaci se toto prostředí ukázalo být jako nejvhodnější [62].

5.1.2. Derivatizace

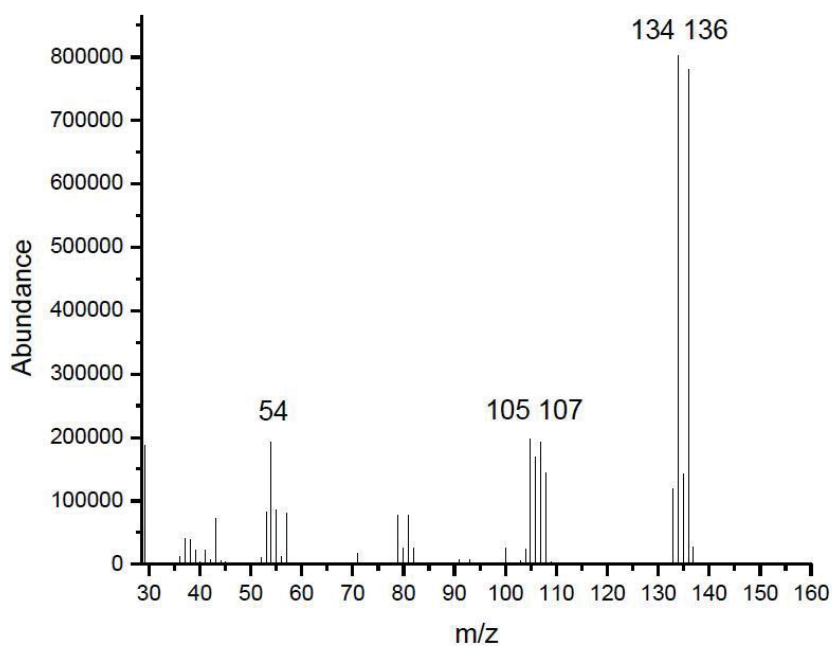
Separace neiontových, vysoce polárních molekul s nízkým bodem varu a nízkou molekulovou hmotností může být z důvodu příliš slabé retence těchto látek na standardně používaných nepolárních stacionárních fázích problematická. Rovněž jejich detekce může být negativně ovlivňována interferencemi s jinými nízkomolekulárními látkami nebo fragmenty pocházejícími ze složek matrice a také horší odezvou hmotnostně spektrometrického detektoru na sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností. Společným řešením většiny uvedených problémů může být derivatizace těchto malých polárních analytů spojená se zvýšením jejich molekulové hmotnosti.

Při vývoji metody pro současné stanovení akrylamidu a akroleinu v kouři z tabákových výrobků a elektronických cigaret byla využita derivatizace těchto analytů bromací (Obr. 21). Adicí bromu na dvojnou vazbu přítomnou v molekule těchto sloučenin lze docílit významného zlepšení vlastností cílových molekul. Vedle snížení polarit obou

analytů je další výhodou zejména zvýšení jejich extrahovatelnosti a taktéž jejich molekulové hmotnosti. V neposlední řadě pro bromovaný akrylamid i akrolein jsou typické více symetrické píky v naměřených chromatogramech. Rovněž přítomnost specifického isotopického vzoru v jejich hmotnostních spektrech (Obr. 24 a 25) přispívá k podstatně lepší selektivitě, snadné identifikaci píků a nižším detekčním limitům.



Obr. 24: Hmotnostní spektrum 2-bromprop-2-enamidu.

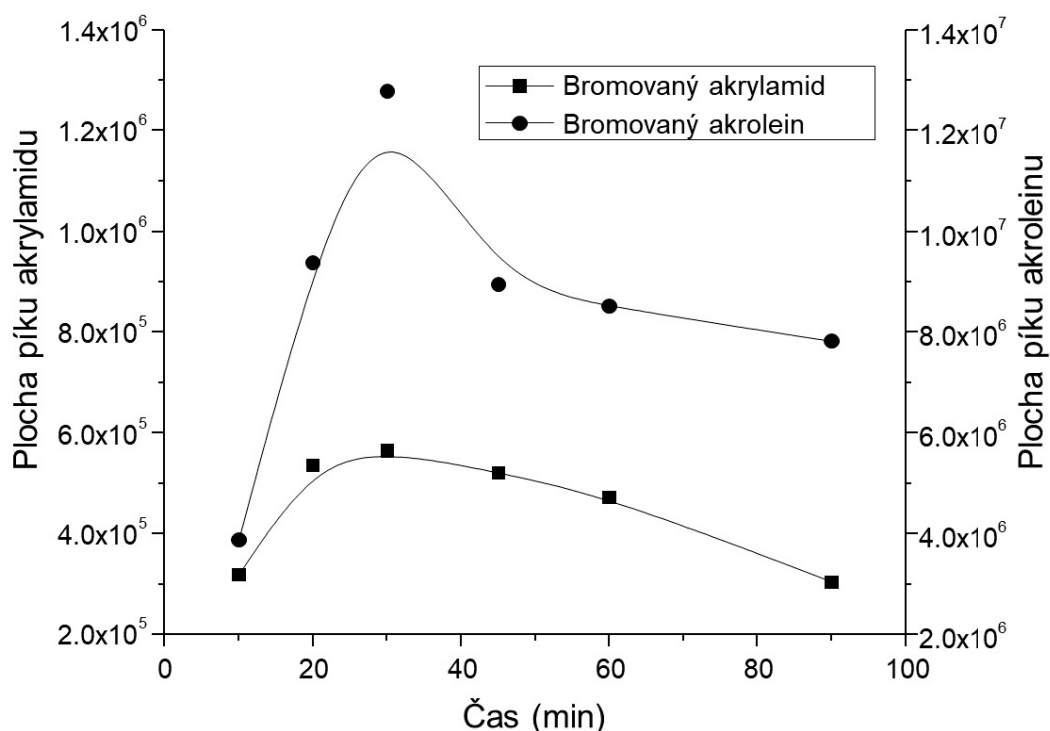


Obr. 25: Hmotnostní spektrum 2-bromprop-2-enalu.

5.1.3. Vývoj metody

Při vývoji metody byly využity jak komerčně dostupné standardy akroleinu a akrylamidu, tak rovněž čerstvě připravený vodný roztok akroleinu. K tomuto kroku bylo přistoupeno z důvodu přítomnosti stabilizátorů zabraňujících polymerizaci v komerčně dostupném standardu [179].

Pro zjištění vlivu reakčního času na proces bromace akrylamidu a akroleinu bylo současně připraveno 6 vzorků a to tak, že bylo smícháno 15 μ l vodného roztoku akrylamidu o koncentraci 1 mg/ml s 10 μ l čerstvě připraveného vodného roztoku akroleinu a s 10 ml deionizované vody. Pro každý z těchto vzorků byl použit jiný čas bromace v rozmezí 10-90 minut. Pokusem bylo zjištěno, že nejúčinněji jsou oba analyty derivatizovány při délce bromace v čase 30 minut (Obr. 26). Rovněž byl zjištěn vliv prostředí na proces derivatizace, kdy nejlepších výsledků bylo dosaženo v tmavém a chladném prostředí. *Tareke a kol.* využili pro stanovení akrylamidu taktéž bromaci [60], avšak derivatizační reakci nechali probíhat přes noc, což se při současném stanovení akrylamidu a akroleinu ukázalo být nevhodné. Bromace alkenů je dvoustupňovou elektrofilní adicí. V prvním pomalejším kroku vzniká cyklický kationtový intermediát s můstkovým atomem bromu. Delší reakční doba může být v tomto případě užitečná, ovšem některé vedlejší a následné reakce mohou derivatizační proces komplikovat. V případě, že nebyly reakční podmínky správně nastaveny, tak bylo možné v naměřených chromatogramech pozorovat přítomnost i dalších bromovaných derivátů vznikajících radikálovou a elektrofilní substitucí. Tmavé a chladné derivatizační prostředí účinně eliminuje radikálovou substituci a významně zpomaluje substituci elektrofilní. Přítomná reaktivní karbonylová skupina může podléhat dalším reakcím např. oxidaci, elektrofilní adicí a nukleofilní substitucí [180,181], a to v závislosti na složkách matrice a primárních produktech vzniklých při reakci s nadbytkem bromu. V důsledku následných reakcí poklesla po 30 minutách výtěžnost jak dibromderivátu akrylamidu, tak také akroleinu, a to i v tmavém a chladném prostředí.



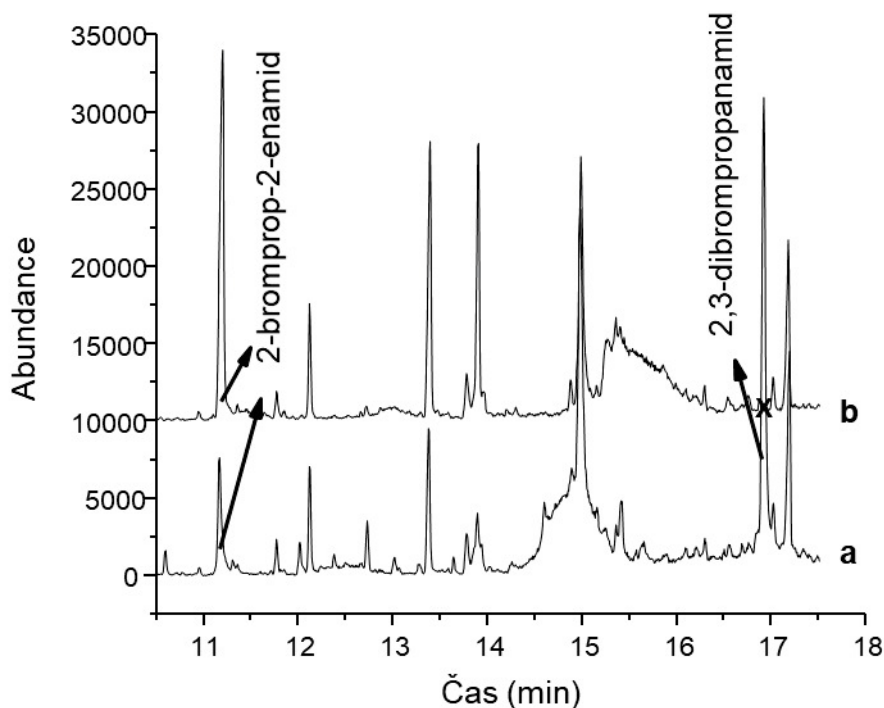
Obr. 26: Studium vlivu reakčního času na proces bromace akrylamidu (čtverečky) a akroleinu (kolečka).

Aby bylo zabráněno nežádoucí reverzibilní nukleofilní adici vody na karbonylovou skupinu [182], bylo nezbytné získané ethylacetátové extrakty vysušit pomocí síranu hořečnatého. Navíc, aby bylo zamezeno reaktivní karbonylové skupině v dalších nežádoucích reakcích, tak bylo ke vzorku po prekoncentračním kroku přidáno 10 μ l *n*-propanolu. Na základě informací z literatury lze předpokládat, že přidávkem *n*-PrOH dochází v kyselém prostředí ke tvorbě acetalu a tím také k ochraně aldehydové skupiny [182]. Vzhledem k tomu, že vysoká teplota nástríkového prostoru způsobuje eliminaci alkoholu, tak se v chromatogramu acetal již neobjevuje a je tak možné kvantitativně detegovat obnovený brompropenal.

Z hlediska účinnosti separace byla taktéž podstatná teplota nástríkového prostoru, která by měla být dostatečně vysoká, tak aby bylo zajištěno okamžité zplynění/odpaření nadávkovaného vzorku. Obvykle využívaná teplota inletu (280°C) nebyla dostatečnou pro kvantitativní dehydrobromaci derivátu akrylamidu (Obr. 27), protože byl v chromatogramu pozorován jak ve formě monobromderivátu, tak také dibromderivátu. Pro získání jedné derivatizované formy v podobě stabilnějšího 2-bromprop-2-enamidu byl tedy

ke konečnému extraktu před nástřikem do GC přidán triethylamin. Konjugace nevazebného elektronového páru aminoskupiny akrylamidu vedla ve srovnání s akroleinem ke zvýšení delokalizační energie a částečné kompenzaci negativního indukčního efektu atomu bromu, což vedlo k získání stabilnějšího derivátu. V případě akroleinu nastavená teplota nástřikového prostoru pro kvantitativní dehydrobromaci dostačovala [177].

Dalším faktorem ovlivňujícím významně separaci, byla počáteční teplota teplotního programu. Při počáteční teplotě nižší než 50°C byla pozorována nízká reprodukovatelnost retenčních časů dříve eluovaného bromovaného akroleinu. Posuny retenčních časů byly pravděpodobně způsobeny kondenzací ethylacetátu (bod varu 77,1°C) na začátku kolony, což vedlo k nereprodukovatelnému odpařování a nereprodukovatelnému příspěvku zkondenzovaného filmu k retenci těkavých látek. Nastavení počáteční teploty na více než 50°C pak vedlo k silnému snížení retence bromovaného akroleinu a jeho interferenci s píkem rozpouštědla. Z těchto důvodů bylo tedy za optimální počáteční teplotu zvoleno 50°C.



Obr. 27: Chromatogram bromovaného akrylamidu bez přídavku (a) a s přídavkem triethylaminu (b).

5.1.4. Validace metody a analýza reálných vzorků

V případě stanovení akrylamidu byla pozorována velmi dobrá linearita kalibrační závislosti s koeficientem determinace $R^2 = 0,9990$ ($y = 21,657x - 22,797$). Limit detekce (LOD) pro akrylamid byl stanoven na $0,27 \mu\text{g/cig. ek.}$ a pro akrolein $8,35 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/cig. ek.}$, zatímco hodnota limitu kvantifikace (LOQ) pro akrylamid činila $0,81 \mu\text{g/cig. ek.}$ a pro akrolein $2,50 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/cig. ek.}$. Z hlediska preciznosti bylo pro oba analyty opakovanými GC/MS analýzami dosaženo v případě plochy píků RSD o hodnotě menší než 7 %, pro retenční časy pak byla hodnota RSD menší než 1 %. Průměrný retenční čas bromovaného akrylamidu a akroleinu činil 11,39 min, respektive 4,29 min.

Analýzou reálných vzorků bylo zjištěno, že v žádném vzorku kouře z elektronických cigaret akrylamid nebyl přítomen, respektive jeho koncentrace byla nižší než limit detekce použité metody. Jak již bylo zmíněno, zdraví škodlivý akrylamid se vytváří během Maillardovy reakce z aminokyselin a redukujících cukrů vystavených teplotám vyšších jak 120°C . Jelikož zmíněné prekurzory nebyly v náplních elektronických cigaret přítomné, tak také nebyl akrylamid nalezen (Tab. III). Avšak při analýze reálného tabákového kouře (z doutníku) byl prokázán relativně vysoký obsah akrylamidu, a to jak v hlavním, tak ve vedlejším kouři ($2,40$ respektive $1,52 \mu\text{g/cig. ek.}$).

Z důvodu charakterizace složení náplní do elektronických cigaret byla rovněž provedena přímá analýza těchto vzorků, kterou byl mimo jiné zjištěn vysoký obsah glycerolu. Jedná se o látku bezpečnou, která však může být zdrojem akroleinu, na který se působením vysokých teplot rozkládá. Existuje řada průmyslových postupů pro konverzi glycerolu na akrolein, které popisují použití různých katalyzátorů za různých podmínek a za optimalizovaných teplot pohybujících se nejčastěji v rozmezí $267\text{--}307^\circ\text{C}$ [183]. Přestože pracovní teplota elektronické cigarety je nižší, tak určité kovové části odpařovače (vaporizéru) jsou schopny dodat dostatek energie, případně i katalytický povrch potřebný k tomuto tepelnému rozkladu. To je pravděpodobně důvod, proč byla nalezena přítomnost akroleinu ve všech testovaných vzorcích elektronických cigaret, přičemž jeho nejvyšší obsah se nacházel v jednorázové elektronické cigaretě (Tab. III).

Tab. III: Výsledky z analýz akrylamidu a akroleinu v tabákovém kouři a kouři z elektronických cigaret.

Vzorek	Akrylamid (µg/cig. ek.)	Akrolein (µg/cig. ek.)
Doutník – hlavní kouř	2,40	4,48
Doutník – vedlejší kouř	1,52	8,27
E-cigareta – příchuť višně	ND	0,17
E-cigareta – příchuť turecký tabák	ND	0,70
Jednorázová E-cigareta – příchuť Marlboro	ND	3,70
ND µg/cig. ek.	nebylo detegováno množství v µg uvolněné z jedné běžné cigarety nebo ekvivalentu elektronické cigarety (vypočteno na základě počtu vdechnutí kouře podle podle normy ISO)	

5.1.5. Závěr

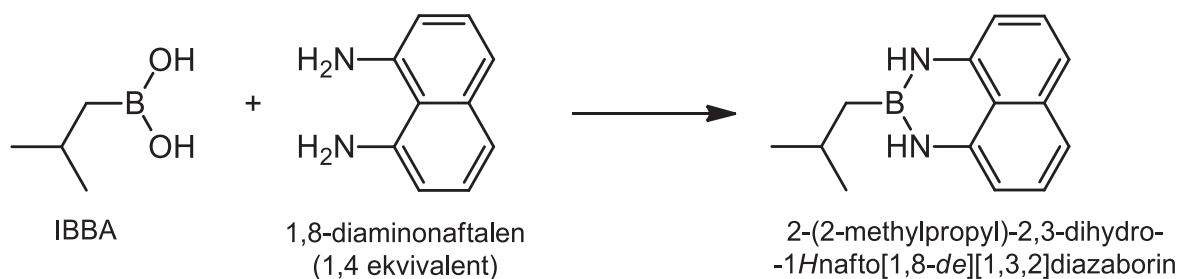
Byla vyvinuta GC/MS metoda pro současné stanovení akrylamidu a akroleinu v tabákovém kouři a kouři z elektronických cigaret. Metoda využívá derivatizace obou analytů prostřednictvím bromace elementárním bromem ve vodném prostředí. Byla provedena optimalizace derivatizační reakce a jejích podmínek. Nejúčinnější bromace obou analytů bylo dosaženo po 30 minutách v tmavém a chladném prostředí. Metodou byla prokázána přítomnost akroleinu ve všech testovaných vzorcích a rovněž přítomnost akrylamidu, který se ovšem vyskytoval pouze v kouři tabákovém. Spolehlivost metody byla potvrzena validačním procesem.

5.2. Stanovení zbytkových rozpouštědel v isobutylboronové kyselině – využití maskovací derivatizace ke zlepšení stability GC kolony

Výsledky uvedené v této části byly publikovány v práci: R. Papoušek, S. Žák, P. Štverka, A. Gavenda, L. Borovcová, P. Barták, *Determination of residual solvents in isobutylboronic acid: Masking derivatization improves stability of GC column*, J. Sep. Sci. (2019) - v tisku.

5.2.1. Optimalizace maskovací reakce mezi IBBA a DAN

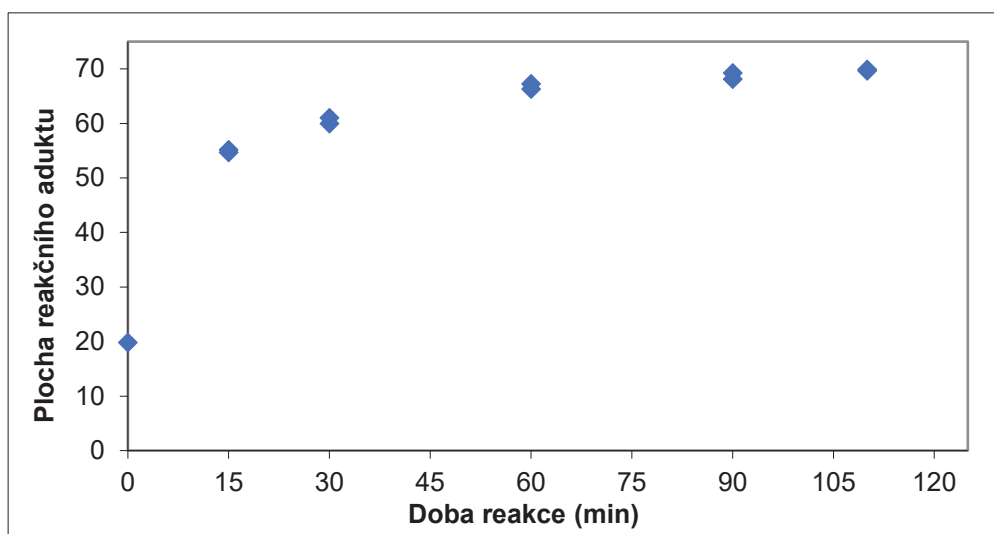
Významné poškození stacionární fáze kapilární kolony, ke kterému docházelo po provedení několika headspace analýz vzorku kyseliny isobutylboronové, vedlo k nutnosti vývoje metody umožňující stanovení zbytkových rozpouštědel v IBBA tak, aniž by byla negativně ovlivňována separační schopnost příslušné stacionární fáze. Proto byl navržen derivatizační postup založený na maskovací reakci IBBA s 1,8-diaminonaftalenem (DAN), jakožto vhodným činidlem umožňujícím konverzi těkavé a reaktivní IBBA na méně těkavý a méně reaktivní 2-(2-methylpropyl)-2,3-dihydro-1H-nafto[1,8-de][1,3,2]diazaborin (Obr. 28).



Obr. 28: Schéma reakce IBBA s DAN.

Kondenzační reakce mezi IBBA a DAN byla prováděna při 50°C, za bazické katalýzy DABCO rozpuštěným v benzylalkoholu. Toto rozpouštědlo se díky jeho dostatečně vysokému bodu varu často využívá při headspace analýzách zbytkových rozpouštědel. V tomto případě bylo vybráno i na základě jeho dobré schopnosti rozpouštět IBBA i DAN. Právě díky dobré rozpustnosti má IBBA malou tendenci přecházet do plynné fáze, což je důležité pro kvantitativní průběh maskovací reakce. Bazický katalyzátor DABCO přidáný do maskovacího roztoku úspěšně akceleroval průběh kondenzační reakce. Reakční doba 60 minut byla stanovena na základě optimalizace provedené v rozmezí 0 až 90 minut (Obr. 29). Za pomoci činidla BSTFA, které bylo použito pro silylaci nezreagovaného DAN, byla

ve zvolených časových intervalech ukončena probíhající reakce. Následnou GC analýzou s přímým nástřikem byl stanoven reakční produkt (přesný postup je uveden v kapitole 4.2.).

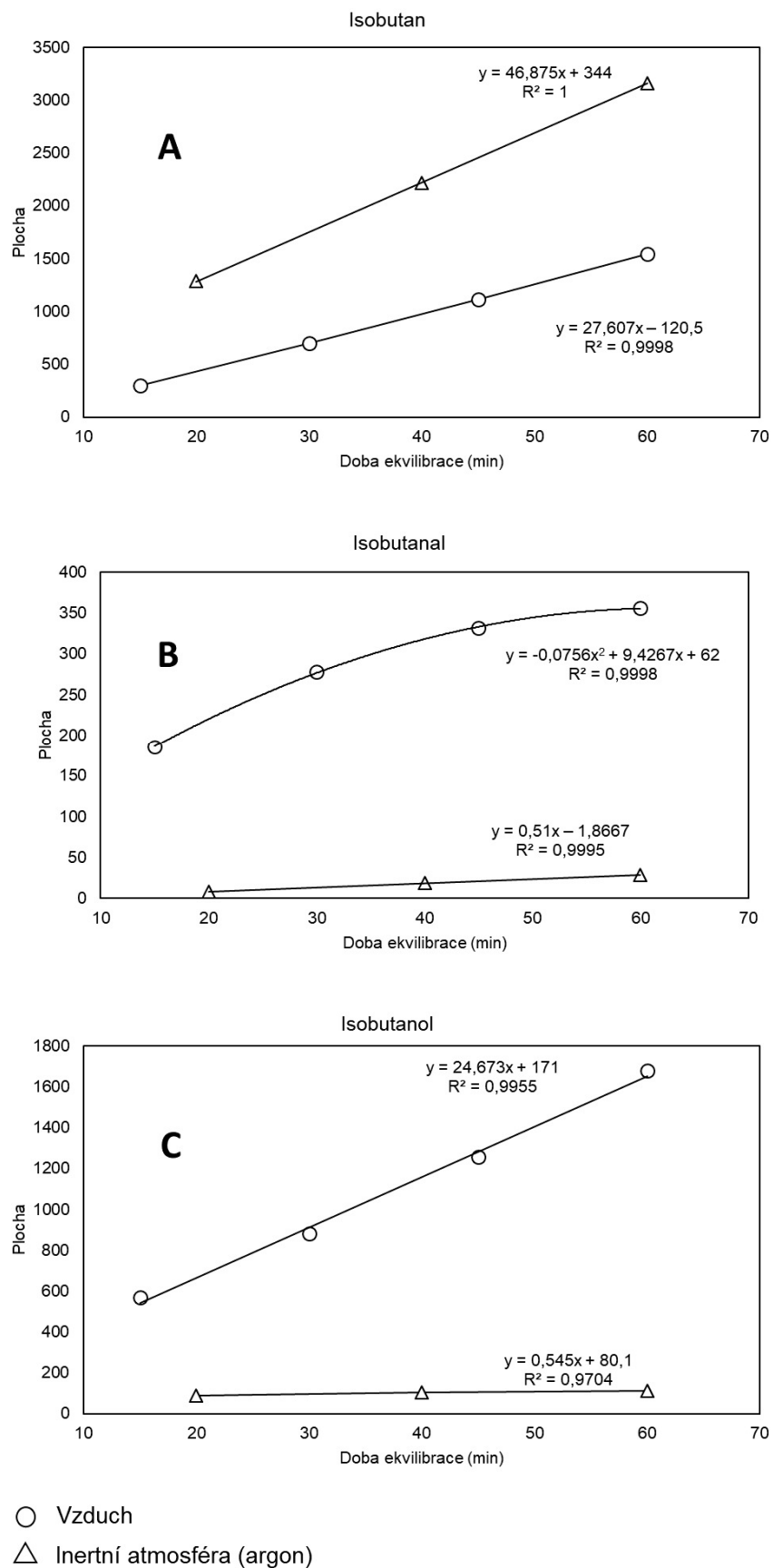


Obr. 29: Závislost plochy aduktu IBBA+DAN na době reakce.

5.2.2. Optimalizace headspace GC metody

Pro stanovení zbytkových rozpouštědel v IBBA byla využita běžně používaná plynově chromatografická metoda se statickým headspace dávkováním vzorků. Optimální doba ekvibrace analytů mezi kapalnou a plynnou fází v headspace vialce byla stanovena z experimentů provedených při teplotě 90°C a v časovém rozmezí 15-60 minut. Prakticky v celém časovém intervalu ekvibrace byla pozorována konstantní odezva pro jednotlivá zbytková rozpouštědla, kterými byl vzorek IBBA spikován na úroveň odpovídající jejich ICH limitům. Nicméně, s narůstající dobou ekvibrace byl pozorován vznik degradačních produktů isobutanu, isobutanalu a isobutanolu. Z tohoto důvodu bylo vybráno 20 minut jako dostatečná doba pro ekvibraci vzorku.

K degradaci aduktu IBBA+DAN dochází pravděpodobně dvěma způsoby. Jeden z procesů degradace souvisí s eliminací isobutanu, zatímco druhý spočívá v oxidativní hydrolýze vedoucí ke vzniku isobutanalu a isobutanolu. Bylo testováno, zdali by druhý z procesů mohl být potlačen odstraněním vody a oxidantů, například vzdušného kyslíku. Přímý přídavek dehydratačního činidla v podobě bezvodého Na_2SO_4 , MgSO_4 , případně CaC_2 , nevedl k potlačení vzniku degradačních produktů. Při propláchnutí headspace vialky argonem, ještě před zahájením inkubace vzorku, byla nahrazena přítomná oxidativní atmosféra inertním plynem. Tím byl významně potlačen vznik oxidačních produktů (isobutanalu a isobutanolu) za současně mírného nárůstu tvorby isobutanu.



Obr. 30: Závislost plochy píků degradačních produktů na době ekvilibrace v přítomnosti vzduchu, respektive inertní atmosféry argonu.

Obr. 30 znázorňuje nárůst koncentrací všech degradačních produktů během ekvilibrace, a to jak ve vzduchu, tak v atmosféře argonu. Zatímco koncentrace isobutanu v inertní atmosféře mírně vzrostla (Obr. 30A), tak koncentrace obou oxidačních produktů (isobutanalu a isobutanolu) se v inertní atmosféře argonu přibližně o jeden řád snížily (Obr. 30B, C). Na základě tohoto zjištění bylo do procesu přípravy vzorku zahrnuto rovněž propláchnutí headspace vialek argonem.

5.2.3. Validace metody a analýza reálných vzorků

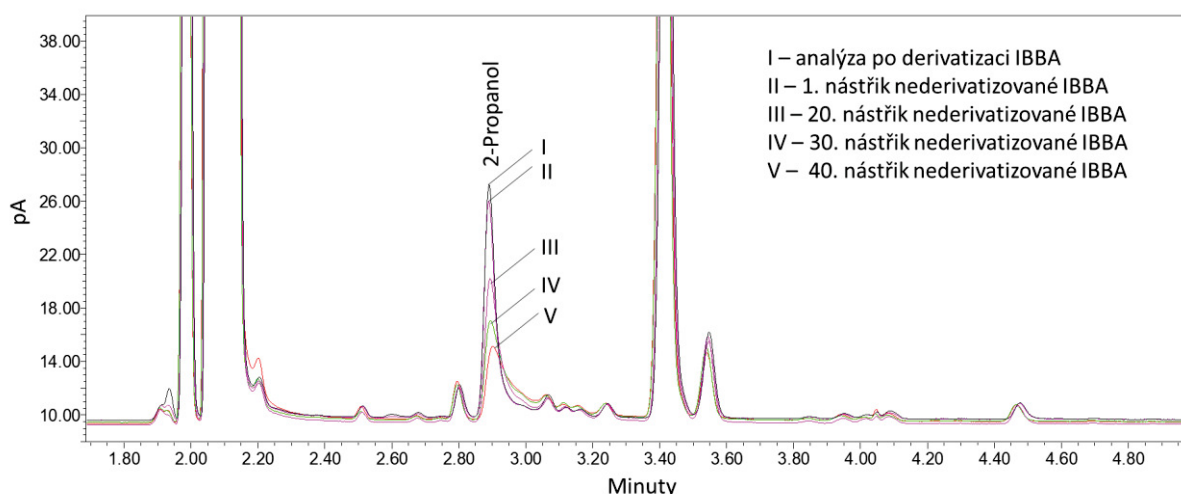
Navržená metoda byla validována a aplikována pro stanovení zbytkových rozpouštědel ve vzorcích IBBA určených k syntéze Bortezomibu. Validačním procesem bylo zjištěno, že použitá metoda je precizní, specifická, lineární a přesná v rozmezí 2-120 % ICH limitů (Tab. IV). Při ověřování specifity byla v roztoku blanku prokázána přítomnost toluenu, avšak v množství pod hodnotou RL.

Rozlišení (R) mezi kritickými páry bylo vždy větší než 1,0 a to pro všechna rozpouštědla v chromatogramu z analýzy roztoku TSS. Hodnoty LOD se pro jednotlivá rozpouštědla pohybovaly v rozmezí 0,06-0,53 ppm, v případě LOQ pak v rozmezí 0,20-1,76 ppm. Vyjimku tvořil toluen, pro který byly stanoveny vyšší limity a to z důvodu jeho přítomnosti v blanku (LOD = 7,40 ppm; LOQ = 24,67 ppm). Přesnost vyjádřená odchylkou od linearit se pro všechna zbytková rozpouštědla pohybovala v rozmezí 101,5-103,7 %.

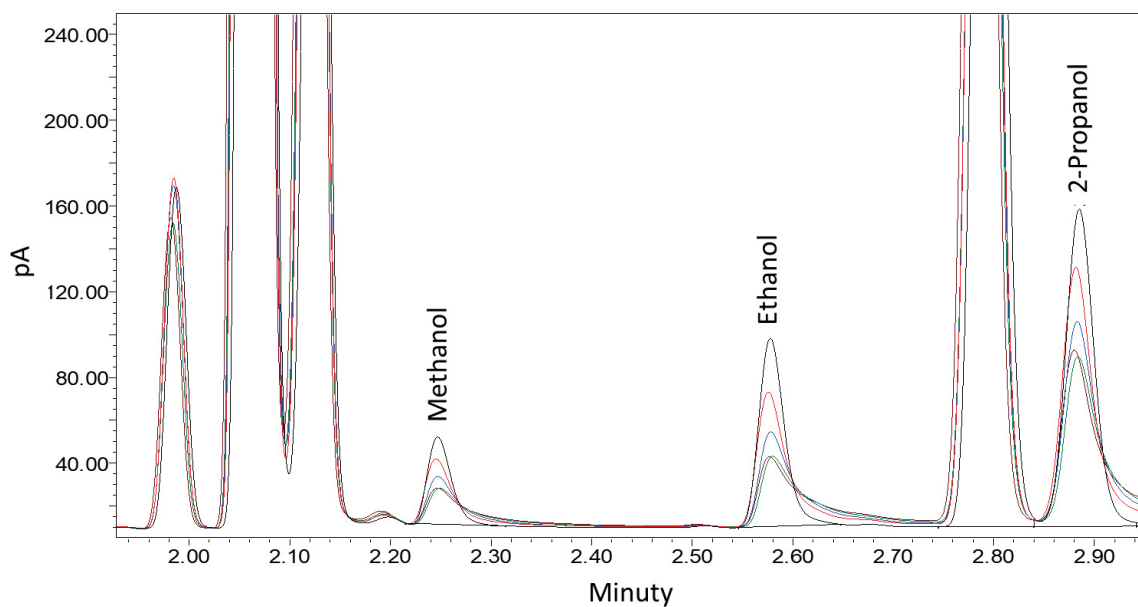
Tab. IV: Souhrn výsledků získaných validací metody včetně jejich akceptačních kritérií.

Parametr	Akceptační kritérium	Výsledky z validace							
		MeOH	2-Propanol	<i>t</i> -BME	hexan	EtAc	THF	heptan	toluen
Koncentrační rozsah [ppm]	-	60 - 3600	100 - 6000	100 - 6000	5,8 - 348	50 - 3000	14,4 - 864	100 - 6000	17,8 - 1068
Linearita: - korelační koef. R^2 - úsek na ose y	$\geq 0,990$ $\leq 10,0\%$ na úrovni 100%	0,9998 0,38%	0,9999 0,13%	0,9999 < 0,01%	0,9996 0,08%	0,9996 0,06%	0,9996 0,18%	0,9996 0,10%	0,9999 0,36%
RL Preciznost: - opakovatelnost	RSD plochy, $\leq 10,0\%^*$ RSD ret. časů, $\leq 5,0\%$ průměrný S/N ≥ 10	1,2% < 0,1% 606	0,8% < 0,1% 909	0,7% < 0,1% 2020	0,7% < 0,1% 266	1,1% < 0,1% 279	1,4% < 0,1% 82	0,8% < 0,1% 3694	5,7% < 0,1% 307
Přesnost: - odchylka od linearity (max. hodnota) - průměrná výtěžnost (max. hodnota)	95,0 – 105,0%* 80,0 – 120,0%	102,7% 110,7%	102,3% 108,2%	101,7% 107,2%	102,8% 102,8%	101,5% 102,3%	102,5% 100,0%	103,1% 119,8%	103,7% 119,5%
LOD [ppm]	-	0,30	0,33	0,09	0,06	0,06	0,53	0,08	7,40
LOQ [ppm]	-	0,99	1,10	0,30	0,20	0,20	1,76	0,28	24,67

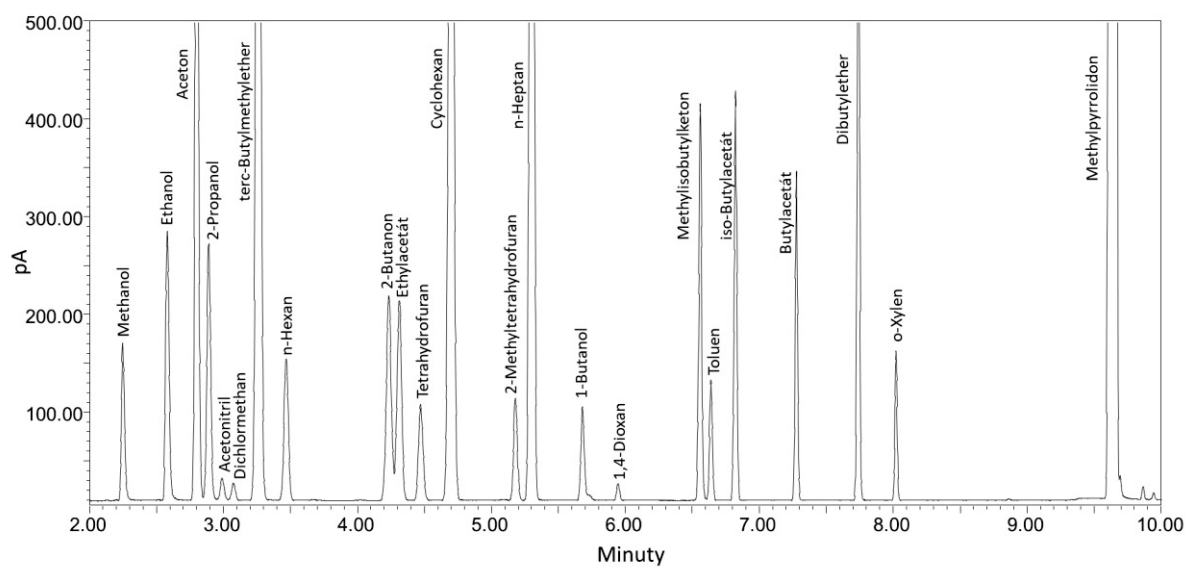
Chromatogramy odpovídající analýzám derivatizovaného vzorku IBBA na nové koloně, nederivatizovaného vzorku na nové koloně a nederivatizovaného vzorku na koloně se stacionární fází poškozenou dvaceti (třiceti, čtyřiceti) analýzami nederivatizované IBBA jsou znázorněny na Obr. 31. Chromatogramy odpovídající opakovaným analýzám spikovaných vzorků a standardní směsi obsahující 22 rozpouštědel jsou uvedeny na Obr. 32 a 33. Z těchto výsledků je jasné patrná nízká výtěžnost polárních sloučenin po 20 analýzách nederivatizované IBBA (v případě 2-propanolu se jedná o výtěžnost 64 %) ve srovnání s prakticky neovlivněnými výsledky po 20 analýzách derivatizované IBBA (pro 2-propanol více než 99 %). Chromatogramy získané z analýzy standardní směsi rozpouštědel na nové koloně a na téže koloně po 40 nástřích derivatizované IBBA jsou uvedeny na Obr. 34. Toto srovnání jednoznačně dokazuje pozitivní vliv maskovací derivatizace, která chrání analytickou kolonu, zlepšuje stabilitu systému a zajišťuje kvalitu dat při rutinních analýzách.



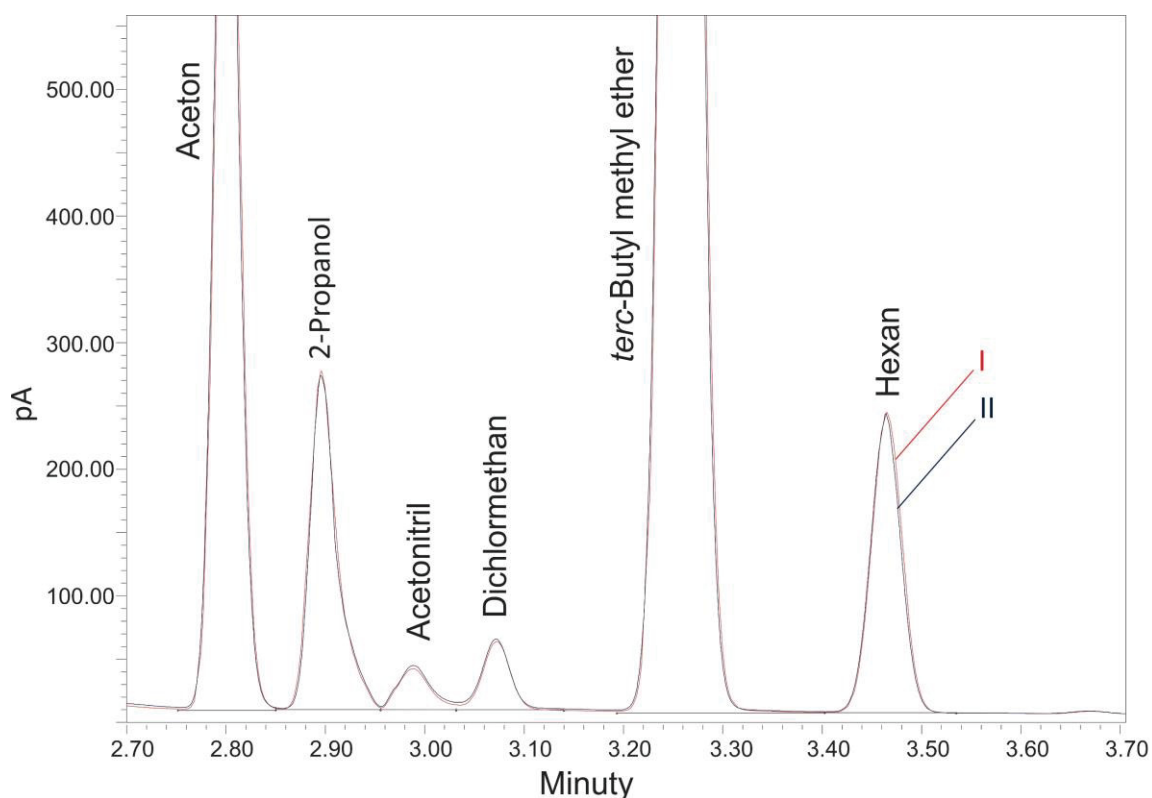
Obr. 31: Chromatogramy z analýzy derivatizovaného vzorku na nové koloně (I), nederivatizovaného vzorku na nové koloně (II) a nederivatizovaného vzorku na koloně poškozené 20 (30; 40) analýzami nederivatizované IBBA (III; IV; V).



Obr. 32: Chromatogramy z opakovaných analýz nederivatizovaných vzorků IBBA spikovaných kalibračním roztokem.



Obr. 33: Chromatogram z analýzy standardní směsi obsahující 22 rozpouštědel v methylpyrrolidonu.



Obr. 34: Chromatogramy z analýzy standardní směsi rozpouštědel na nové koloně (I) a na stejné koloně po 40 nástřicích derivatizovaného vzorku (II).

Z reálných vzorků byly analyzovány 4 různé šarže IBBA zakoupené od dvou různých dodavatelů. Naměřené výsledky týkající se obsahu zbytkových rozpouštědel v těchto šaržích jsou shrnuty v Tab. V.

Tab. V: Shrnutí výsledků z analýzy zbytkových rozpouštědel v různých šaržích IBBA.

Šarže č.	2-Propanol	t-BME	Hexan	Ethylacetát	THF
	(ppm)				
01	< RL	127	< RL	< RL	< RL
02	898	< RL	< RL	< RL	< RL
03	128	< RL	7,0	< RL	48
04	< RL	< RL	6,0	56	< RL

5.2.4. Závěr

Byla navržena, optimalizována a validována headspace GC-FID metoda pro stanovení zbytkových rozpouštědel v IBBA. Metoda využívá derivatizace IBBA činidlem DAN za vzniku stabilní a netěkavé sloučeniny, čímž je zabráněno přechodu IBBA

do plynné headspace fáze. Díky tomu je chráněna stacionární fáze GC kolony před negativním působením IBBA. Tento koncept maskovací derivatizace otevírá nové možnosti při analýze stopových nečistot přítomných v přebytku vysoce reaktivních sloučenin.

5.3. GC/MS metoda pro stanovení alloxanu a jeho rozkladných produktů v mouce

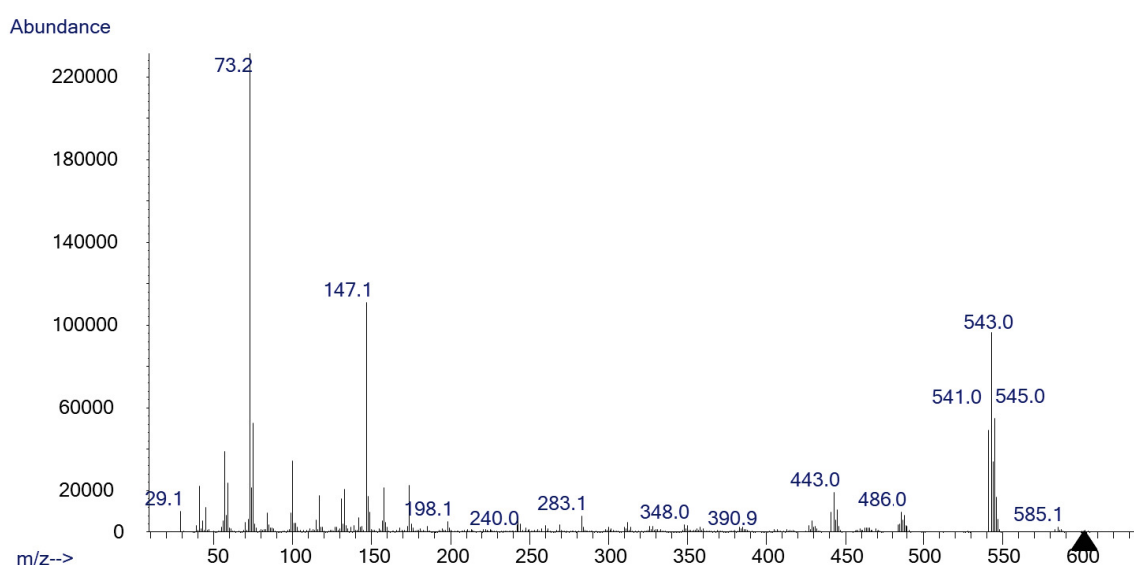
Výsledky uvedené v této části byly prezentovány formou plakátových sdělení v rámci vědeckých konferencí: *20th International Conference „Analytical Methods and Human Health“, Patince, SK, (15. – 18. 6. 2015)*, *Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal, Olomouc, ČR, (6. – 9. 6. 2016)*.

5.3.1. Vývoj derivatizační a chromatografické metody

Alloxan je analytem s nižší molekulovou hmotností, vykazující jak zvýšenou reaktivitu, tak také hydrofilitu. Aby bylo možné jej ze vzorku mouky/spikované mouky izolovat a následně pomocí GC/MS techniky stanovit, tak bylo nezbytné navrhnout vhodný derivatizační a prekoncentrační postup. Pro snížení polaritu a současné zvýšení stability alloxanu byla vyvinuta dvoukroková chemická derivatizace (Obr. 23). První derivatizační krok je založen na reakci alloxanu se 4,5-dibrom-1,2-fenylendiaminem. Kondenzační reakcí mezi aminoskupinami činidla a karbonylovými skupinami alloxanu vzniká 7,8-dibromalloxazin, derivát obsahující dvě vazby C=N. Tato reakce probíhá ve vodném prostředí za přítomnosti HCl jako katalyzátoru. Připravený derivát byl z reakční směsi izolován prostřednictvím extrakce tuhou fází za použití kolonek Oasis HLB, ze kterých byl následně eluován 2 ml směsí acetonitrilu a pyridinu. Po odpaření extraktu do sucha byl odparek rekonstituován v pyridinu. V rámci druhého derivatizačního kroku byl 7,8-dibromalloxazin silylován pomocí MTBSTFA s obsahem 1 % t-BDMCS za vzniku 7,8-dibrom-1,3-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)alloxazinu, jehož hmotnostní spektrum je zobrazeno na Obr. 35. Tato kombinace silylačních činidel ve srovnání s BSTFA prokázala vyšší účinnost silylace 7,8-dibromalloxazinu a rovněž i vyšší stabilitu a odolnost tohoto *tert*-butyldimethylsilyl derivátu proti vlhkosti [32].

V případě prvního derivatizačního kroku byl pro reakci s alloxanem testován 1,2-fenylendiamin a jeho halogenované formy 4-chlor-1,2-fenylendiamin, 4,5-dichlor-1,2-fenylendiamin, 4-brom-1,2-fenylendiamin a 4,5-dibrom-1,2-fenylendiamin. Všechna tato činidla prokázala schopnost reagovat s alloxanem za vzniku stabilního produktu extrahovatelného z reakční směsi. Hlavní nevýhodou reakce alloxanu se 4-chlor- respektive 4-brom- substituovaným 1,2-fenylendiaminem je tvorba dvou izomerů projevující se v chromatogramu přítomností dvou píků. Nejlepších výsledků bylo dosaženo se 4,5-dibrom-

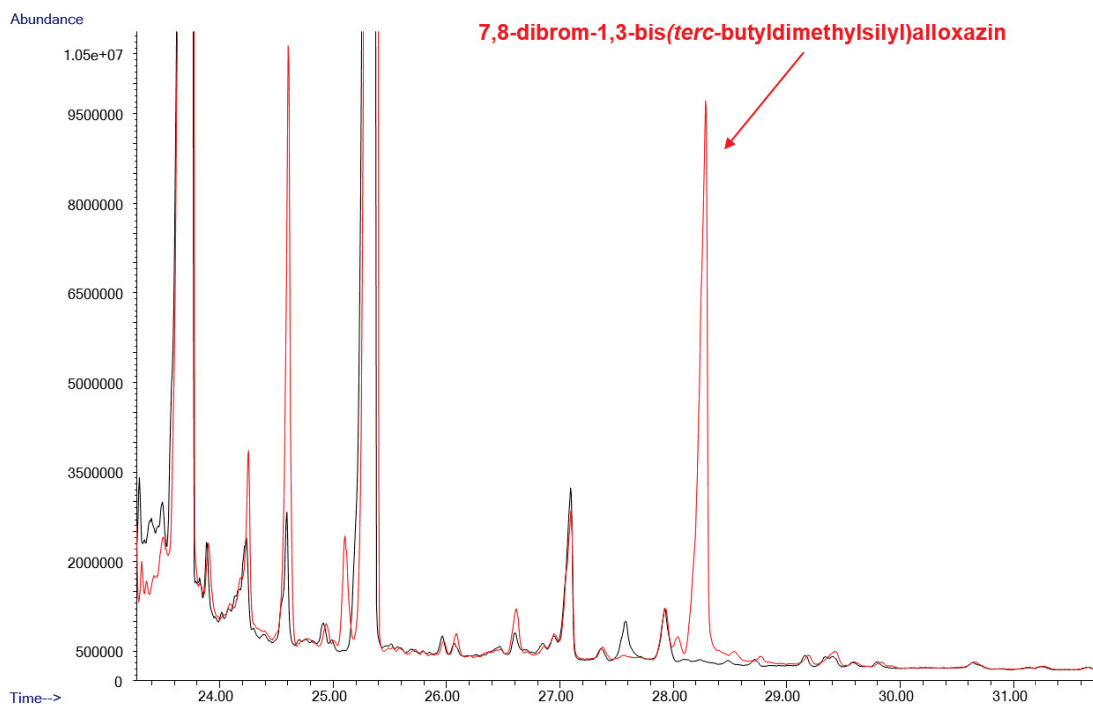
1,2-fenylendiaminem, který byl v souvislosti s derivatizací alloxanu použit vůbec poprvé. Toto činidlo efektivně reagovalo s alloxanem za vzniku jednotného produktu vykazujícího vyšší retenci na nepolární stacionární fázi, což umožnilo získat chromatogram s píkem jasně separovaným od matričních složek. Výhodnost této reakce je také dána symetrií molekul činidla i analytu. Tak jako v případě bromovaných derivátů akroleinu a akrylamidu, tak i zde lze díky přítomnosti dvou atomů bromu v molekule derivátu pozorovat v naměřeném hmotnostním spektru charakteristický isotopický vzor (ionty 541, 543, 545 m/z).



Obr. 35: Naměřené hmotnostní spektrum 7,8-dibrom-1,3-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)alloxazinu.

5.3.2. Analýza reálného vzorku mouky

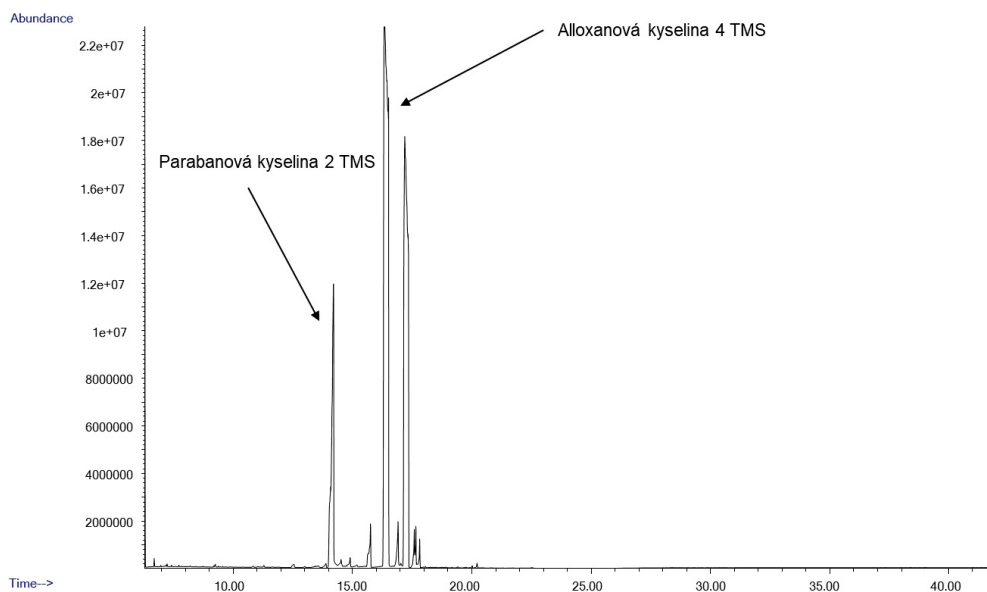
Výše popsaná metoda pro stanovení alloxanu byla aplikována na 3 reálné vzorky bělené mouky původem z USA (Obr. 22) a na 2 vzorky české nebělené mouky. Přítomnost alloxanu v žádném z testovaných vzorků nebyla prokázána, avšak funkčnost metody byla ověřena prostřednictvím vzorku mouky spikovaného alloxanem (Obr. 36) v koncentraci 10 µg/g. Podle dostupné literatury se předpokládá, že alloxan vzniká jako meziprodukt při bělení plynným chlorem [184]. U testovaných vzorků mouky nebyl znám způsob, jakým byly běleny, což může být jedním z důvodů, proč v nich nebyl alloxan detegován. Dalším důvodem může být zvýšená reaktivita alloxanu, čímž by se v mouce nemusel vyskytovat v nativní podobě, ale ve formě svých degradačních produktů (viz kapitola 5.3.3).



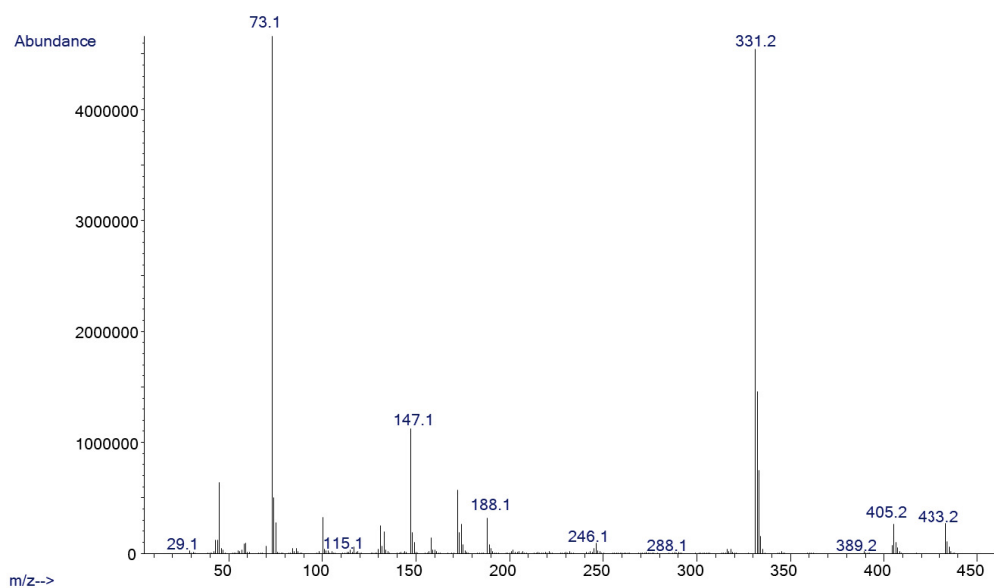
Obr. 36: Překryv chromatogramů (TIC mód) z analýzy mouky nespikované (černá linie) a mouky spikované alloxanem (červená linie).

5.3.3. Identifikace degradačních produktů alloxanu a stanovení kyseliny parabanové a alloxanové v mouce

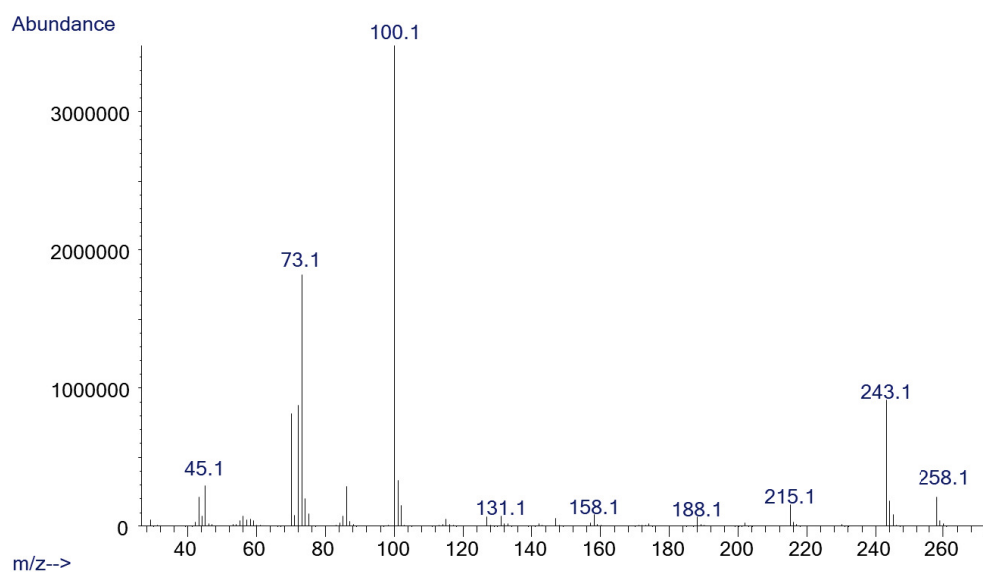
Na základě literární rešerše bylo zjištěno, že jedním z degradačních produktů alloxanu je kyselina alloxanová. Pro ověření tohoto tvrzení byl proveden experiment, kdy byl standard alloxanu, který má být z důvodu jeho nestability skladován v chladném a temném prostředí, ponechán po dobu 24 hodin při laboratorních podmínkách. Po silylaci a následné GC/MS analýze tohoto vzorku byla ze získaného chromatogramu (Obr. 37) a hmotnostních spekter (Obr. 38 a 39) kromě jiného potvrzena přítomnost kyseliny alloxanové a rovněž i kyseliny parabanové v podobě jejich TMS derivátů (Obr. 40). Byly tedy provedeny experimenty zaměřené na přítomnost těchto dvou rozkladných produktů alloxanu v testovaných vzorcích mouky. Pro tento účel byl navržen jednoduchý postup zahrnující extrakci mouky methanolem, následovaný jeho odpařením a silylací odparku pomocí směsi pyridinu a BSTFA. Avšak ani prostřednictvím těchto experimentů nebyla v žádném z testovaných vzorků prokázána přítomnost rozkladných produktů alloxanu.



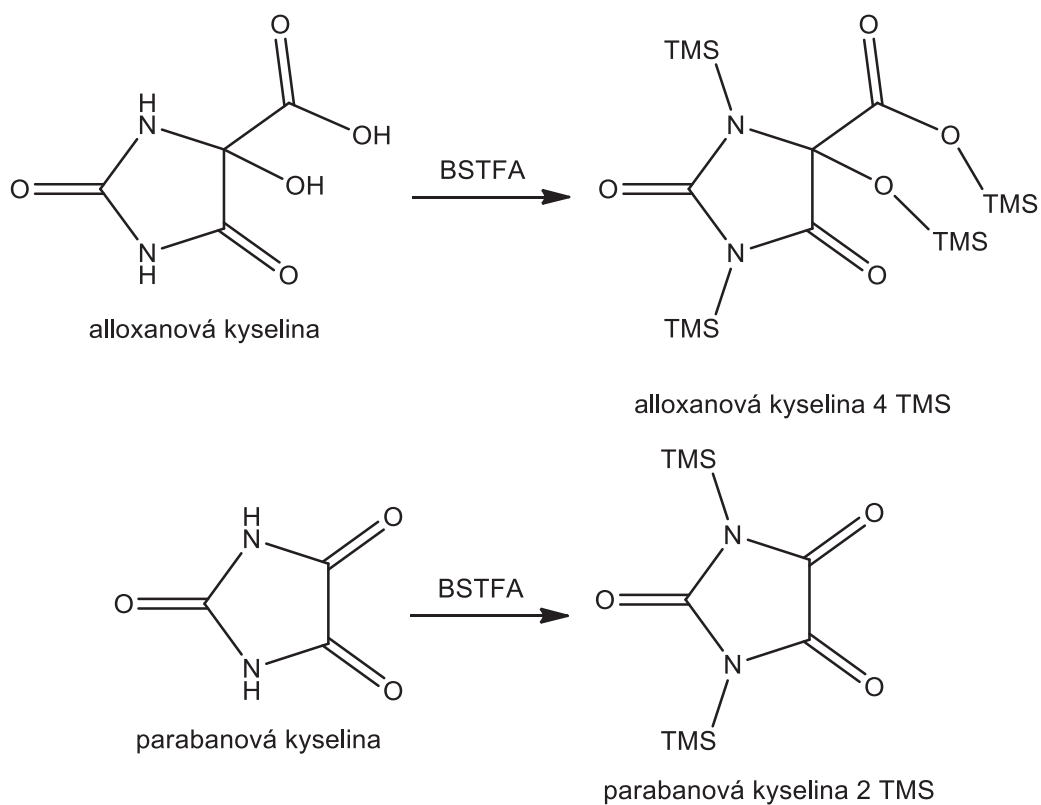
Obr. 37: Chromatogram z analýzy degradačních produktů alloxanu.



Obr. 38: Naměřené hmotnostní spektrum 4 TMS derivátu kyseliny alloxanové.



Obr. 39: Naměřené hmotnostní spektrum 2 TMS derivátu kyseliny parabanové.



Obr. 40: Schéma silylace kyseliny alloxanové a parabanové.

5.3.4. Závěr

Byla navržena a testována GC/MS metoda jak pro stanovení alloxanu, tak také metoda pro stanovení jeho degradačních produktů ve vzorcích bělené a nebělené mouky. Experimenty, které byly provedeny na standardu alloxanu, přispěly k identifikaci jeho dvou rozkladných produktů – kyseliny alloxanové a parabanové. Alloxan a jeho zmíněné rozkladné produkty však nebyly nalezeny v žádném z testovaných vzorků mouky.

6. ZÁVĚR

V souladu se stanovenými cíli byla v rámci této disertační práce studována problematika analýzy polárních látek prostřednictvím plynové chromatografie. Prvotní výzkum v této oblasti byl zaměřen na vývoj metody umožňující současné stanovení dvou nízkomolekulárních polárních analytů - akroleinu a akrylamidu v tabákovém kouři a kouři z elektronických cigaret. Navržená a optimalizovaná metoda zahrnuje chemickou derivatizaci obou analytů elementárním bromem, čímž bylo docíleno snížení jejich polarit, oba analyty byly snadněji izolovatelné od matrice a lépe detegovatelné díky charakteristickým fragmentům poskytovaným v hmotnostních spektrech. Metodou, jejíž spolehlivost byla ověřena validací, byl potvrzen relativně vysoký obsah obou analytů v tabákovém kouři. V případě elektronických cigaret, které jsou mnohými preferovány jako zdravější alternativa tabákových výrobků, byla detegována přítomnost akroleinu, jakožto degradačního produktu glycerolu, který je hlavní komponentou náplně používané v tomto zařízení.

V další fázi vědecko-výzkumné činnosti byla ve spolupráci s farmaceutickou společností Teva Czech Industries, s.r.o. vyvinuta GC-FID metoda se statickým headspace dávkováním vzorků určená ke stanovení zbytkových rozpouštědel v kyselině isobutylboronové. Jedná se o látku využívanou při syntéze protinádorového léčiva Bortezomibu, u které je nezbytné monitorovat obsah zbytkových rozpouštědel. Z důvodu zvýšené těkavosti a reaktivity IBBA docházelo při použití běžné headspace metody k poškození stacionární fáze již po několika analýzách. Takto poškozená GC kolona byla poté prakticky nepoužitelná pro další analýzy, především pak pro stanovení alkoholů. Navržená maskovací metoda využívá reakce IBBA s 1,8-diaminonafthalenem za vzniku stabilní a netěkavé sloučeniny, která zůstává v roztoku a nepřechází do plynné headspace fáze. Následné stanovení zbytkových rozpouštědel tak není ovlivněno interferencemi s reaktivní maticí. Metoda byla úspěšně validována podle směrnic ICH a mezinárodních lékopisů a je rutinně využívána.

Alloxan a jeho identifikované degradační produkty, kyseliny alloxanová a parabanová, jsou dalšími ze skupiny polárních látek, kterým byla v rámci této práce věnována pozornost. Alloxan, který pravděpodobně vzniká při procesu bělení mouky, je reaktivní látkou způsobující diabetes. Pro jeho stanovení v mouce byla navržena metoda zahrnující dvoustupňovou derivatizaci vedoucí k zisku stabilního a těkavého derivátu.

Z důvodu nízké stability alloxanu byla rovněž navržena metoda pro stanovení jeho degradačních produktů. Všechny zmíněné analyty se podařilo detegovat ve spikovaných vzorcích, avšak v reálných vzorcích bělené mouky nebyla jejich přítomnost potvrzena.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, *A new form of chromatogram employing two liquid phases. 1. A theory of chromatography, 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins*, Biochem. J., 35 (1941), 1358-1368.
- [2] A.T. James, A.J.P. Martin, *Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid*, Biochem. J., 50 (1952), 679-690.
- [3] R. P. W. Scott, *Introduction to analytical gas chromatography*, 2nd ed., CRC Press, 1998.
- [4] M. Warner, *Pioneers in Gas Chromatography*, Anal. Chem. 62 (1990) 1015-1017.
- [5] I.G. Kolomnikov, A. M. Efremov, T.I. Tikhomirova, N.M. Sorokina, Y.A. Zolotov, *Early stages in the history of gas chromatography*, J. Chromatogr. A, 1537 (2018) 109–117.
- [6] K.D. Bartle, P. Myers, *History of gas chromatography*, TrAC-Trends Anal. Chem., 21, (2002), 547-557.
- [7] H.M. McNair, J.M. Miller, *Basic Gas Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey 2009.
- [8] G.A. Eiceman, *Instrumentation of Gas Chromatography*, v knize Encyclopedia of Analytical Chemistry, Applications, Theory and Instrumentation, R. A. Meyers, John Wiley & Sons, Inc., Chichester 2007, str. 11340-11348.
- [9] R.L. Grob, E.F. Barry, *Modern Practice of Gas Chromatography 4th Ed.*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey 2004.
- [10] R.N. Mead, P.J. Seaton, *GC-MS Quantitation and Identification of Bisphenol-A Isolated from Water*, J. Chem. Educ. 88 (2011) 1130-1132.
- [11] J.B. Quintana, J. Carpinteiro, I. Rodríguez, R.A. Lorenzo, A.M. Carro, R. Cela, *Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection*, J. Chromatogr. A 1024 (2004) 177-185.
- [12] C. Lee, I. Mangion, *A GC-FID method for quantitative analysis of N,N-carbonyldiimidazole*, J. Pharm. Biomed. Anal., 121 (2016) 1-5.

- [13] J. Segura, R. Ventura, C. Jurado, *Derivatization procedures for gas chromatographic–mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents*, J. Chromatogr. B 713 (1998) 61-90.
- [14] A. Krokos, E. Tsakelidou, E. Michopoulou, N. Raikos, G. Theodoridis, H. Gika, *NSAIDs Determination in Human Serum by GC-MS*, Separations 5 (2018) 1-13.
- [15] H. Dahmani, K. Louati, A. Hajri, S. Bahri, F. Safta, *Development of an extraction method for anabolic androgenic steroids in dietary supplements and analysis by gas chromatography-mass spectrometry: Application for doping-control*, Steroids 138 (2018) 134-160.
- [16] C.A. Valdez, R.N. Leif, S. Hok, B.R. Hart, *Analysis of chemical warfare agents by gas chromatography-mass spectrometry: methods for their direct detection and derivatization approaches for the analysis of their degradation products*, Rev. Anal. Chem. 37 (2017) 1-26.
- [17] T.G. Sobolevsky, A.I. Revelsky, B. Miller, V. Oriedo, E.S. Chernetsova, I.A. Revelsky, *Comparison of silylation and esterification/acylation procedures in GC-MS analysis of amino acids*, J. Sep. Sci. 26 (2003) 1474-1478.
- [18] Y.R. Kim, H.S. Pyo, B.C. Chung, M.H. Moon, J. Lee, *GC-MS Analysis of Various Phytoestrogens in Health Functional Foods*, Bull. Korean Chem. Soc. 38 (2017) 448-458.
- [19] H.S. Shin, E.Y. Yang, *Simultaneous determination of methylcarbamate and ethylcarbamate in fermented foods and beverages by derivatization and GC-MS analysis*, Chem. Cent. J. 6 (2012) 1-8.
- [20] M.C. Haven, G.A. Tetrault, J.R. Schenken, *Laboratory Instrumentation 4th Ed.*, John Wiley & Sons, Inc., Canada 1994.
- [21] P. Atkins, J. Paula, *Physical Chemistry: Thermodynamics, Structure, and Change 10th Ed.*, Oxford University Press Inc., Great Britain 2014.
- [22] G. Gilli, P. Gilli, *The Nature of the Hydrogen Bond: Outline of a Comprehensive Hydrogen Bond Theory*, Oxford University Press Inc., United States 2009.
- [23] Y. Maréchal, *The Hydrogen Bond and The Water Molecule*, Elsevier, Amsterdam 2007.

- [24] Polarita vazeb a molekul.
<https://is.muni.cz/el/1411/podzim2011/BLKLC011p/um/4-Polarita.pdf>, staženo 4. 1. 2019
- [25] J. Drozd, J. Novák, *Chemical derivatization in gas chromatography*, Elsevier, Amsterdam 1981.
- [26] T. Hayward, Y. Hua, R. Gras, J. Luong, G. Lee, A. Vickers, N.A. Dang, *Industrial Applications with a New Polyethylene Glycol-Based GC Column*, Application Note, Agilent Technologies, Inc., <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-7961EN.pdf>, staženo 5. prosince 2018.
- [27] N.H. Hashim, S.J. Khan, *Enantioselective analysis of ibuprofen, ketoprofen and naproxen in wastewater and environmental water samples*, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 4746-4754.
- [28] A. Zlatkis, C.F. Poole, Electron Capture, Volume 20, 1st Edition, *Theory and Practice in Chromatography*, Elsevier Science 2000.
- [29] K. Blau, J.M. Halket, *Handbook of Derivatives for Chromatography*, 2nd Ed., John Wiley & Sons, Ltd., Chichester 1993.
- [30] Supelco, TMSI – Product Specification.
https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/tmsi.pdf, staženo 5. prosince 2018.
- [31] Fluka Chemika, Silylating Agents.
https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Aldrich/General_Information/silylation_overview.pdf, staženo 10. prosince 2018.
- [32] C. Schummer, O. Delhomme, B.M.R. Appenzeller, R. Wennig, M. Millet, *Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis*, Talanta 77 (2009) 1473-1482.
- [33] T.G. Sobolevsky, A.I. Revelsky, B. Miller, V. Oriedo, E.S. Chernetsova, I.A. Revelsky, *Comparison of silylation and esterification/acylation procedures in GC-MS analysis of amino acids* J. Sep. Sci. 26 (2003) 1474-1478.
- [34] Sigma-Aldrich, Derivatization Reagents.

<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/migrationresource4/Derivatization%20Rgts%20brochure.pdf>, staženo 10. prosince 2018.

[35] S. Moldoveanu, V. David, *Modern Sample Preparation for Chromatography*, Elsevier, Amsterdam 2015.

[36] N.D. Danielson, P.A. Gallagher, J.J. Bao, *Chemical Reagents and Derivatization Procedures in Drug Analysis*, v knize Encyclopedia of Analytical Chemistry, Applications, Theory and Instrumentation, R. A. Meyers, John Wiley & Sons, Inc., Chichester 2000, str. 7042-7076.

[37] V. Zaikin, J.M. Halket, *A Handbook of Derivatives for Mass Spectrometry*, IM Publications LLP, Chichester 2009.

[38] C.F. Poole, S.K. Poole, *Chromatography today*, Elsevier Science, Amsterdam 1991.

[39] D.R. Knapp, *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*, John Wiley & Sons, Somerset, 1979.

[40] J.M. Vogh, *Isolation and Analysis of Carbonyl Compounds as Oximes*, Anal. Chem. 43 (1971) 1618-1623.

[41] M. Vogel, A. Büldt, U. Karst, *Hydrazine reagents as derivatizing agents in environmental analysis – a critical review*, Fresenius J. Anal. Chem. 366 (2000) 781-791.

[42] Supelco, Alternative Analysis of Formaldehyde-DNPH and Other Carbonyl-DNPH Derivatives by Capillary GC.

https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Application_Notes/4650.pdf, staženo 11. prosince 2018.

[43] T. Shiraishi, Y. Soma, O. Ishitani, K. Sakamoto, *Application of an integrated PrepStation–GC–NPD system to automated continuous measurement of formaldehyde and acetaldehyde in the atmosphere*, J. Environ. Monit. 3 (2001) 654-660.

[44] P. Hušek, Derivatization, v knize Encyclopedia of Separation Science, I. Wilson, C. Poole, M. Cooke, Academic Press, 2000, str. 434-443.

[45] Y. Zhang, Y. Ren, Y. Zhang, *New Research Developments on Acrylamide: Analytical Chemistry, Formation Mechanism, and Mitigation Recipes*, Chem. Rev. 109 (2009) 4375-4397.

- [46] J.C. Lee, D.L. Trimm, M.S. Wainwright, M.A. Kohler, N.I. Onuoha, N.W. Cant, *Copper Catalysts for the Hydrolysis of Acrylonitrile to Acrylamide: Deactivation and Cure*, Stud. Surf. Sci. Catal. 34 (1987) 235-243.
- [47] S. Eriksson: *Acrylamide in food products: Identification, formation and analytical methodology*, doctoral Thesis, Stockholm University, Stockholm 2005.
- [48] Acrylamide.
www.nicnas.gov.au., staženo 21. leden 2013.
- [49] D.A. Vatter, K. Shetty, *Acrylamide in food: a model for mechanism of formation and its reduction*, Innovat. Food Sci. Emerg. Tech. 4 (2003) 331-338.
- [50] H. Mojska, I. Gielecinska, L. Szponar, M. Oltarzewski, *Estimation of the dietary acrylamide exposure of the Polish population*, Food Chem. Toxicol. 48 (2010) 2090-2096.
- [51] A. Chrambach, D. Rodbard, *Polyacrylamide gel electrophoresis*, Science 172 (1971) 440-451.
- [52] Y.H. Chen, E.Q. Xia, X.R. Xu, W.H. Ling, S. Li, S. Wu, G.F. Deng, Z.F. Zou, J. Zhou, H.B. Li, *Evaluation of Acrylamide in Food from China by a LC/MS/MS Method*, Int. J. Environ. Res. Public Health 9 (2012) 4150-4158.
- [53] O. Arihan, N.B. Seringec, E.I. Gurel, N.H. Dikmenoglu, *Effects of oral acrylamide intake on blood viscosity parameters in rats*, Clin. Hemorheol. Microcirc. 47 (2011) 45-52.
- [54] K.A. Johnson, S.J. Gorzinski, K.M. Bodner, R.A. Campbell, C.H. Wolf, M.A. Friedman, R.W. Mast, *Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats* Toxicol. Appl. Pharm. 85 (1986) 154-168.
- [55] X. Zhang, *Simultaneous exposure to dietary acrylamide and corn oil developed carcinogenesis through cell proliferation and inhibition of apoptosis by regulating p53-mediated mitochondria-dependent signaling pathway*, Toxicol. Ind. Health 25 (2009) 101-109.
- [56] E. Zamani, M. Shokrzadeh, M. Fallah, F. Shaki, *A review of acrylamide toxicity and its mechanism*, Pharm. Biomed. Res. 3 (2017) 1-7.
- [57] L. Jiang, J. Cao, Y. An, C. Geng, S. Qu, L. Jiang, L. Zhong, *Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells*, Toxicol. In Vitro 21 (2007) 1486-1492.

- [58] Y. Yener, M. Dikmenli, *The effects of acrylamide on the frequency of megakaryocytic emperipolesis and the mitotic activity of rat bone marrow cells*, J. Sci. Food Agr. 91 (2011) 1810-1813.
- [59] D.S. Mottram, B.L. Wedzicha, A.T. Dodson, *Acrylamide is formed in the Maillard reaction*, Nature 419 (2002) 448-449.
- [60] E. Tareke, P. Rydberg, P. Karlsson, S. Eriksson, M. Tornqvist, *Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs*, J. Agr. Food Chem. 50 (2002) 4998-5006.
- [61] J. Diekmann, A. Wittig, R. Stabbert, *Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of Acrylamide and Acetamide in Cigarette Mainstream Smoke after On-Column Injection*, J. Chromatograph. Sci. 46 (2008) 659-663.
- [62] R. Papoušek, P. Nováková, E. Marková, P. Barták, *Analýza akrylamidu metodou GC-MS*, Chem. Listy 107 (2013) 255-260.
- [63] J.H. Exon, *A review of the toxicology of acrylamide*, J. Toxicol. Environ. Health B 9 (2006) 397-412.
- [64] L. Chen, *Acrolein*, Synlet 24 (2013) 2775-2776.
- [65] D. Arntz, A. Fischer, M. Hopp, S. Jacobi, J. Sauer, T. Ohara, T. Sato, N. Shimizu, H. Schwind, *Acrolein and methacrolein*, v knize Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim 2007, str. 226-244.
- [66] Toxicological Profile for Acrolein.
<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=557&tid=102>, staženo 10. prosince 2018.
- [67] V.M. Osorio, Z.L. Cardeal, *Determination of acrolein in french fries by solid-phase microextraction gas chromatography and mass spectrometry*, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 3332-3336.
- [68] H.H. Lim, H.S. Shin, *Simple Determination of Acrolein in Surface and Drinking Water by Headspace SPME GC-MS*, Chromatographia 75 (2012) 943-948.
- [69] S.L. Macallister, N. Martin-Brisac, V. Lau, K. Yang, P.J. O'Brien, *Acrolein and chloroacetaldehyde: an examination of the cell and cell-free biomarkers of toxicity*, Chem Biol Interact. 202 (2013) 259-266.

- [70] Y. Endo, C. Hayashi, T. Yamanaka, K. Takayose, M. Yamaoka, T. Tsuno, S. Nakajima, *Linolenic acid as the main source of acrolein formed during heating of vegetable oils*, J. Am. Oil Chem. Soc. 90 (2013) 959-964.
- [71] US EPA (1994) Integrated risk information system (IRIS). US EPA, Washington DC.
- [72] IARC (1995) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 63. IARC, Lyon.
- [73] US EPA (2003) Toxicological review of acrolein. US EPA, Washington DC.
- [74] D.P. Ghilarducci, R.S. Tjeerdema, *Fate and effects of acrolein*, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 144 (1995) 95–146.
- [75] S.A. Steinmetz, J.S. Herrington, C.K. Winterrowd, W.L. Roberts, J.O.L. Wendt, W.P. Linak, *Crude glycerol combustion: Particulate, acrolein, and other volatile organic emissions*, Proc. Combust. Inst. 34 (2013) 2749-2757.
- [76] W. Buhler, E. Dinjus, H.J. Ederer, A. Kruse, C. Mas, *Ionic reactions and pyrolysis of glycerol as competing reaction pathway in near- and supercritical water*, J. Supercrit. Fluids 22 (2002) 37-53.
- [77] M. Watanabe, T. Iida, Y. Aizawa, T.M. Aida, H. Inomata, *Acrolein synthesis from glycerol in hot-compressed water*, Bioresource Technol. 98 (2007) 1285-1290.
- [78] US EPA (1992) Respiratory health effects of passive smoking: lung cancer and other disorders. US EPA, Washington DC.
- [79] WHO (2008) Marketers of electronic cigarettes should halt unproved therapy claims. WHO, Geneva.
- [80] K. Ohta, S. Uchiyama, Y. Inaba, H. Nakagome, N. Kunugita, *Determination of carbonyl compounds generated from the electronic cigarette using coupled silica cartridges impregnated with hydroquinone and 2, 4-dinitrophenylhydrazine*, Bunseki Kagaku 60 (2011) 791-797.
- [81] S. Uchiyama, Y. Inaba, N. Kunugita, *Determination of acrolein and other carbonyls in cigarette smoke using coupled silica cartridges impregnated with hydroquinone and 2,4-dinitrophenylhydrazine*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 4383-4388.

- [82] T.L. Wang, H.W. Tong, X.Y. Yan, L.Q. Sheng, J. Yang and S.M. Liu, *Determination of volatile carbonyl compounds in cigarette smoke by LC-DAD*, *Chromatographia* 62 (2005) 631-636.
- [83] S. Xie, K. Wang, R. Zhu, X. Zhu, W. Wei, *Solid phase extraction–ultra performance liquid chromatography for the determination of acrylamide in mainstream cigarette smoke*, *Mendeleev Commun.* 19 (2009) 344-345.
- [84] L. Xu, L. Zhang, X. Qiao, Z. Xu, J. Song, *Determination of trace acrylamide in potato chip and bread crust based on SPE and HPLC*, *Chromatographia* 75 (2012) 269-274.
- [85] R. Bortolomeazzi, M. Munari, M. Anese, G. Verardo, *Rapid mixed mode solid phase extraction method for the determination of acrylamide in roasted coffee by HPLC-MS/MS*, *Food Chem.* 135 (2012) 2687-2693.
- [86] S. Uchiyama, T. Tomizawa, Y. Inaba, N. Kunugita, *Simultaneous determination of volatile organic compounds and carbonyls in mainstream cigarette smoke using a sorbent cartridge followed by two-step elution*, *J. Chromatogr. A* 1314 (2013) 31-37.
- [87] T.R. McAuley, P.K. Hopke, J. Zhao, S. Babaian, *Comparison of the effects of e-cigarette vapor and cigarette smoke on indoor air quality*, *Inhal. Toxicol.* 24 (2012) 850-857.
- [88] S. Uchiyama, K. Ohta, Y. Inaba, N. Kunugita, *Determination of Carbonyl Compounds Generated from the E-cigarette Using Coupled Silica Cartridges Impregnated with Hydroquinone and 2,4-Dinitrophenylhydrazine, Followed by High-Performance Liquid Chromatography*, *Anal. Sci.* 29 (2013) 1219-1222.
- [89] M.S. Eschner, I. Selmani, T.M. Groger, R. Zimmermann, *On-line comprehensive two-dimensional characterization of puff-by-puff resolved cigarette smoke by hyphenation of fast gas chromatography to single-photon ionization time-of-flight mass spectrometry: quantification of hazardous volatile organic compounds*, *Anal. Chem.* 83 (2011) 6619-6627.
- [90] K. Fujioka, T. Shibamoto, *Determination of toxic carbonyl compounds in cigarette smoke*, *Environ. Toxicol.* 21 (2006) 47-54.
- [91] H.H. Lim, H.S. Shin, *Ultra trace level determinations of acrylamide in surface and drinking water by GC-MS after derivatization with xanthidrol*, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 3059-3066.

- [92] R.C. Alves, C. Soares, S. Casal, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira, *Acrylamide in espresso coffee: influence of species, roast degree and brew length*, Food Chem. 119 (2010) 929-934.
- [93] F. Tateo, M. Bononi, G. Andreoli, *Acrylamide levels in cooked rice, tomato sauces and some fast food on the Italian market*, J. Food Compos. Anal. 20 (2007) 232-235.
- [94] J.Z. Dong, S.C. Moldoveanu, *Gas chromatography-mass spectrometry of carbonyl compounds in cigarette mainstream smoke after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine*, J. Chromatogr. A 1027 (2004) 25-35.
- [95] S. Takamoto, N. Sakura, M. Yashiki, T. Kojima, *Determination of acrolein by headspace solid-phase microextraction gas chromatography and mass spectrometry*, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 758 (2001) 123-128.
- [96] D. Saison, D.P.D. Schutter, F. Delvaux, F.R. Delvaux, *Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry*, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5061-5068.
- [97] S. Baskan, F.B. Erim, *NACE for the analysis of acrylamide in food*, Electrophoresis 28 (2007) 4108-4113.
- [98] E. Bermudo, V. Ruiz-Calero, L. Puignou, M.T. Galceran, *Microemulsion electrokinetic chromatography for the analysis of acrylamide in food*, Electrophoresis 25 (2004) 3257-3262.
- [99] E. Bermudo, O. Núñez, L. Puignou, M.T. Galceran, *Analysis of acrylamide in food samples by capillary zone electrophoresis*, J. Chromatogr. A 1120 (2006) 199-204.
- [100] E. Bermudo, O. Núñez, L. Puignou, M.T. Galceran, *Analysis of acrylamide in food products by in-line preconcentration capillary zone electrophoresis*, J. Chromatogr. A 1129 (2006) 129-134.
- [101] A. Preston, T. Fodey, C. Elliott, *Development of a high-throughput enzyme-linked immunosorbent assay for the routine detection of the carcinogen acrylamide in food, via rapid derivatisation pre-analysis*, Anal. Chim. Acta 608 (2008) 178-185.
- [102] S. Zhou, C. Zhang, D. Wang, M. Zhao, *Antigen synthetic strategy and immunoassay development for detection of acrylamide in foods*, Analyst 133 (2008) 903-909.

- [103] N. Silva, D. Gil, A. Karmali, M. Matos, *Biosensor for acrylamide based on an ion-selective electrode using whole cells of Pseudomonas aeruginosa containing amidase activity*, Biocatal. Biotransform. 27 (2009) 143-151.
- [104] A. Krajewska, J. Radecki, H. Radecka, *A Voltammetric Biosensor Based on Glassy Carbon Electrodes Modified with Single-Walled Carbon Nanotubes/Hemoglobin for Detection of Acrylamide in Water Extracts from Potato Crisps*, Sensors 8 (2008) 5832-5844.
- [105] Z. Geng, P. Wang, A. Liu, *Determination of acrylamide in starch-based foods by HPLC with pre-column ultraviolet derivatization*, J. Chromatogr. Sci. 49 (2011) 818-824.
- [106] O. Núñez, E. Moyano, M.T. Galceran, *LC-MS/MS analysis of organic toxics in food*, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 683-703.
- [107] J. Liu, G. Zhao, Y. Yuan, X. Hu, *Quantitative analysis of acrylamide in tea by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry*, Food Chem. 108 (2008) 760-767.
- [108] A. Paci, A. Rieutord, D. Guillaume, F. Traoré, J. Ropenga, H.P. Husson, F. Brion, *Quantitative high-performance liquid chromatographic determination of acrolein in plasma after derivatization with Luminarin 3*, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 739 (2000) 239-246.
- [109] D. Guilleme, J. Schappler, S. Rudaz, J.L. Veuthey, *Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry*, Trends Anal. Chem. 29 (2010) 15-27.
- [110] Y. Zhang, J. Wang, Y. Zhang, *Study on formation of acrylamide under low-moisture asparagine-sugar reaction system*, Food Chem. 104 (2007) 1127-1135.
- [111] E. Bermudo, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, *Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of acrylamide in typical Spanish products*, Talanta 76 (2008) 389-394.
- [112] Y. Ren, Y. Zhang, J. Jiao, Z. Cai, Y. Zhang, *Sensitive isotope dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry method for the determination of acrylamide in chocolate*, Food Addit. Contam. 23 (2006) 228-236.
- [113] W. Haiyan, F. Feng, G. Yong, S. Shaomin, M.M.F. Choi, *HPLC-UV quantitative analysis of acrylamide in baked and deep-fried Chinese foods*, J. Food Compos. Anal. 31 (2013) 7-11.

- [114] M. Oroian, S. Amariei, G. Gutt, *Acrylamide in Romanian food using HPLC-UV and a health risk assessment*, Food Addit. Contam. Part B Surveill. 8 (2015) 136-141.
- [115] P. Schieberle, P. Köhler, M. Granvogl, *New Aspects on the Formation and Analysis of Acrylamide*, v knize Chemistry and Safety of Acrylamide in Food. Advances in Experimental Medicine and Biology, M. Friedman, D. Mottram, Springer, Boston 2005, str. 205-222.
- [116] S. Al-Rawithi, A. El-Yazigi, P.J. Nicholls, *Determination of Acrolein in Urine by Liquid Chromatography and Fluorescence Detection of Its Quinoline Derivative*, Pharm. Res. 10 (1993) 1587-1590.
- [117] T. Imazato, M. Kanematsu, N. Kishikawa, K. Ohyama, T. Hino, Y. Ueki, E. Maehata, N. Kuroda, *Determination of acrolein in serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after pre-column fluorogenic derivatization using 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene*, Biomed. Chromatogr. 29 (2015) 1304-1308.
- [118] P. Vesely, L. Lusk, G. Basarova, J. Seabrooks, D. Ryder, *Analysis of Aldehydes in Beer Using Solid-Phase Microextraction with On-Fiber Derivatization and Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 6941–6944.
- [119] K. Wiesenthal, A. Jehlar, S.S.Q. Hee, *Synthesis of the O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine oximes of selected carbonyl compounds and their determination by liquid chromatography with ultraviolet detection*, J. AOAC Int. 83 (2000) 859-869.
- [120] K. Yamazaki, S. Isagawa, N. Kibune, T. Urushiyama, *A method for the determination of acrylamide in a broad variety of processed foods by GC-MS using xanthidrol derivatization*, Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk. Assess. 29 (2012), 705-715.
- [121] F. Tateo, M. Bononi, G. Andreoli, *Acrylamide levels in cooked rice, tomato sauces and some fast food on the Italian market*, J. Food Compos. Anal. 20 (2007) 232-235.
- [122] I. Notardonato, P. Avino, A. Centola, G. Cinelli, M.V. Russo, *Validation of a novel derivatization method for GC-ECD determination of acrylamide in food*, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 6137-6141.

- [123] V.M. Osório, Z. de L. Cardeal, *Determination of acrolein in french fries by solid-phase microextraction gas chromatography and mass spectrometry*, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 3332-3336.
- [124] H.H. Lim, H.S. Shin, *Simple Determination of Acrolein in Surface and Drinking Water by Headspace SPME GC-MS*, Chromatographia 75 (2012) 943-948.
- [125] J. Ledauphina, A. Lefrancoisa, N. Marqueta, M. Beljean-Leymarieb, D. Barillier, *Development of an accurate and sensitive gas chromatographic method for the determination of acrolein content in Calvados and cider*, LWT 39 (2006) 1045-1052.
- [126] N. Sakura, S.-i. Nishimura, N. Fujita, A. Namera, M. Yashiki, T. Kojima, *Determination of acrolein in human urine by headspace gas chromatography and mass spectrometry*, J. Chromatogr. B 719 (1998) 209-212.
- [127] L. Castle, *Determination of Acrylamide Monomer in Mushrooms Grown on Polyacrylamide Gel*, J. Agr. Food Chem. 41 (1993) 1261-1263.
- [128] F.J. Casado, A. Montano, *Influence of processing conditions on acrylamide content in black ripe olives*, J. Agr. Food Chem. 56 (2008) 2021-2027.
- [129] M. Yuzo, K. Katsunori, Y. Yuichi, H. Nobuyuki, S. Yusuke, C. Yoshihiro, O. Hiroshi, Y. Hiroshi, Y. Mitsuru, *Analysis of Acrylamide in Green Tea by Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, J. Agr. Food Chem. 54 (2006) 7370-7377.
- [130] R. Mikulíková, K. Sobotová, *Determination of Acrylamide in Malt with GC/MS*, Acta Chim. Slov. 54 (2007) 98-101.
- [131] R. Papoušek, Z. Pataj, P. Nováková, K. Lemr, P. Barták, *Determination of Acrylamide and Acrolein in Smoke from Tobacco and E-Cigarettes*, Chromatographia 77 (2014) 1145-1151.
- [132] P. Kolář, J.W. Shen, A. Tsuboi, T. Ishikawa, *Solvent selection for pharmaceuticals*, Fluid Phase Equilib. 194-197 (2002) 771-782.
- [133] ICH Harmonised Tripartite Guideline, Q3C (R6) Guideline for Residual Solvents. ICH, Geneva 2016.
- [134] K. Grodowska, A. Parczewski, *Organic solvents in the pharmaceutical industry*, Acta Pol. Pharm. 67 (2010) 3-12.

- [135] C. Camarasu, C. Madichie, R. Williams, *Recent progress in the determination of volatile impurities in pharmaceuticals*, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 768-777.
- [136] S.B. Puranik, P.N.S. Pai, G.K. Rao, *Organic volatile impurities in pharmaceuticals*, Indian J. Pharm. Sci. 69 (2007) 352-359.
- [137] European Pharmacopoeia 7.0, 2.4.24 Identification and control of residual solvents. Strasbourg 2008.
- [138] XXXI USP, <467> General Chapter, Organic Volatile Impurities. Rockville 2007.
- [139] Z.E. Penton, *Headspace gas chromatography*, Compr. Anal. Chem. 37 (2002) 279-296.
- [140] W. D'Autry, C. Zheng, K. Wolfs, S. Yarramraju, J. Hoogmartens, A.V. Schepdael, E. Adams, *Mixed aqueous solutions as dilution media in the determination of residual solvents by static headspace gas chromatography*, J. Sep. Sci. 34 (2011) 1299-1308.
- [141] F. David, R. Szücs, J. Makwana, P. Sandra, *Fast capillary GC using a low thermal mass column oven for the determination of residual solvents in pharmaceuticals*, J. Sep. Sci. 29 (2006) 695-698.
- [142] A. Gupta, Y. Singh, K.S. Srinivas, G. Jain, V.B. Sreekumar, V.P. Semwal, *Development and validation of a headspace gas chromatographic method for the determination of residual solvents in arterolane (RBx11160) maleate bulk drug*, J. Pharm. BioAllied Sci. 2 (2010) 32-37.
- [143] R. Papoušek, S. Žák, P. Štverka, A. Gavenda, L. Borovcová, P. Barták, *Determination of Residual Solvents in Isobutylboronic Acid: Masking Derivatization Improves Stability of GC Column*, J. Sep. Sci., (2019), DOI:10.1002/jssc.201800968.
- [144] D.G. Hall, *Boronic Acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis*, 2nd Edition, Wiley-VCH, Weinheim 2005.
- [145] Isobutylboronic acid.
http://www.apolloscientific.co.uk/display_item.php?id=28585, staženo 31. srpna 2018.
- [146] W.L.A. Brooks, B.S. Sumerlin, *Synthesis and applications of boronic acid-containing polymers: From materials to medicine*, Chem. Rev. 116 (2016) 1375-1397.
- [147] W. Yang, X. Gao, B. Wang, *Boronic acid compounds as potential pharmaceutical agents*, Med. Res. Rev. 23 (2003) 346-368.

- [148] B.C. Das, P. Thapa, R. Karki, C. Schinke, S. Das, S. Kambhampati, S.K. Banerjee, P.V. Veldhuizen, A. Verma., L.M. Weiss, T. Evans, *Boron chemicals in diagnosis and therapeutics*, Future Med. Chem. 5 (2013) 653-676.
- [149] P.C. Trippier, C. McGuigan, *Boronic acids in medicinal chemistry: anticancer, antibacterial and antiviral applications*, Med. Chem. Commun. 1 (2010) 183-198.
- [150] A. Field-Smith, G.J. Morgan, F.E. Davies, *Bortezomib (Velcade™) in the Treatment of Multiple Myeloma*, Ther. Clin. Risk. Manag. 2 (2006) 271-279.
- [151] M. Tobisu, N. Chatani, *Devising boron reagents for orthogonal functionalization through Suzuki–Miyaura cross-coupling*, Angew. Chem., Int. Ed. 48 (2009) 3565-3568.
- [152] Protecting Groups for Boronic Acids.
<https://en.chem-station.com/reactions-2/2016/05/protecting-groups-for-boronic-acids.html>,
 staženo 31. srpna 2018.
- [153] J. Sun, M.T. Perfetti, W.L. Santos, *A method for the deprotection of alkylpinacolyl boronate esters*, J. Org. Chem. 76 (2011) 3571-3575.
- [154] H. Noguchi, K. Hojo, M. Suginome, *Boron-masking strategy for the selective synthesis of oligoarenes via iterative Suzuki–Miyaura coupling*, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 758-759.
- [155] H. Noguchi, T. Shioda, C.M. Chou, M. Suginome, *Differentially protected benzenediboronic acids: Divalent cross-coupling modules for the efficient synthesis of boron-substituted oligoarenes*, Org. Lett. 10 (2008) 377-380.
- [156] P.M. Pour, *Toxicology of the Pancreas* (2006) CRC Press, Boca Raton, USA.
- [157] T. Szkudelski, *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas*, Physiol. Res. 50 (2001) 536-546.
- [158] S. Lenzen, M. Tiedge, A. Jorns, R. Munday, *Alloxan derivatives as a tool for the elucidation of the mechanism of the diabetogenic action of alloxan*, v knize Lessons from Animal Diabetes, E. Shafrir, Birkhauser, Boston, 113-122.
- [159] F.K. Gorus, W.J. Malaisse, D.G. Pipeleers, *Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells*, Biochem. J. 208 (1982) 513-515.
- [160] S.S. Walde, C. Dohle, P. Schott-Ohly, H. Gleichmann, *Molecular target structures in alloxan-induced diabetes in mice*, Life Sci. 71 (2002) 1681-1694.

- [161] S. Lenzen, *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes*, Diabetologia 51 (2008) 216-226.
- [162] Diabetes.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>, staženo 1. března 2016.
- [163] D.A. Rees, J.C. Alcolado, *Animal models of diabetes mellitus*, Diabet. Med. 22 (2005) 359-370.
- [164] E.U. Etuk, *Animals models for studying diabetes mellitus*, Agric. Biol. J. N. Am. 1 (2010) 130-134.
- [165] R. Ankur, A. Shahjad, *Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects*, Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci. 3 (2012) 819-823.
- [166] A. Mrozikiewicz, D. Kielczewska-Mrozikiewicz, Z. Lowicki, E. Chmara, K. Korzeniowska, P.M. Mrozikiewicz, *Blood Levels of Alloxan in Children with Insulin-dependent Diabetes Mellitus*, Acta Diabetologica 4 (1994) 236-237.
- [167] D.A. Korzhenevskiy, A.A. Selischeva, S.V. Saveliev, *Measurement of endogenous alloxan in human blood*, Biochem. Moscow Suppl. Ser. B 3 (2009) 404-407.
- [168] The Little-Known Secrets about Bleached Flour...
<http://articles.mercola.com/sites/articles/archive/2009/03/26/The-Little-Known-Secrets-about-Bleached-Flour.aspx>, staženo 26. března 2016.
- [169] A.C. Raghavamenon, C.L. Dupard-Julien, B. Kandlakunta, R.M. Uppu, *Determination of alloxan by fluorometric high-performance liquid chromatography*, Toxicol. Mech. Methods 19 (2009) 498-502.
- [170] V. Giaccone, G. Cammilleri, V. di Stefano, R. Pitonzo, A. Vella, A. Pulvirenti, G.M.L. Dico, V. Ferrantelli, A. Macaluso, *First report on the presence of Alloxan in bleached flour by LC-MS/MS method*, J. Cereal Sci. 77 (2017) 120-125.
- [171] R.M. Archibald, *Methods for the determination of alloxan together with observations of certain properties of alloxan*, J. Biol. Chem. 158 (1945) 347-373.
- [172] R. Gortner, J. Am. Chem. Soc. 33 (1911) 85-85.
- [173] A. Said, G.M. El-Naggar, *Determination of Alloxan via paper chromatography in solutions, blood and plasma*, Chemist Analyst 53 (1964) 69-71.

- [174] L.K. Shpigun, S.L. Margolin, M.A. Suranova, J. Flow Injection Anal. 25 (2008) 53-56.
- [175] V. Šedivec, J. Flek, *Příručka analýzy organických rozpouštědel*, SNTL, Praha, 1968.
- [176] ISO (2012) Routine analytical cigarette-smoking machine—definition and standard conditions: ISO 3308. International Organization for Standardization, Geneva.
- [177] A. Hashimoto, *Improved method for the determination of acrylamide monomer in water by means of gas-liquid chromatography with an electron-capture detector*, Analyst 101 (1976) 932-938.
- [178] O. Geiss, D. Kotzias, Tobacco, cigarettes and cigarette smoke: an overview. European Commission, Institute for Health and Consumer Protection, Ispra, 2007.
- [179] A.C.Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop, *Clarke's analysis of drugs and poisons*, 4th Edition. Pharmaceutical Press, London 2011.
- [180] F.A. Carey, R.J. Sundberg, *Advanced Organic Chemistry*, 5th Edition, Springer, New York 2008.
- [181] J.G. Smith, *Organic Chemistry*, 3rd Edition, McGraw-Hill, New York 2010.
- [182] J. McMurray, *Organic Chemistry*, 7th Edition, Thomson, Belmont 2008.
- [183] C. H. Zhou, H. Zhao, D. S. Tong, L. M. Wu and W. H. Yu, *Recent Advances in Catalytic Conversion of Glycerol*, Catal. Rev. Sci. Eng., 2013, 55, 369-453.
- [184] S. Cohen, *Diabetes without Drugs*, Rodale Inc., USA 2010.

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

BA – benzylalkohol

BSA – *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid

BSTFA – *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid

c – koncentrace

CAR – karboxen

DABCO – 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan

DAD – diode array detector, detektor s diodovým polem

DAN – 1,8-diaminonaftalen

DMSO – dimethylsulfoxid

DNPH – 2,4-dinitrofenylhydrazin

ECD – electron capture detector, detektor elektronového záchytu

EI – electron ionization, ionizace elektronem

EtAc – ethylacetát

FID – flame ionization detector, plamenoionizační detektor

GC – gas chromatography, plynová chromatografie

HFBA – anhydrid kyseliny heptafluormásečné

HFBI – heptafluorbutyrylimidazol

HMDS – hexamethyldisilazan

HPLC – high performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HS – headspace

IARC – International Agency for Research on Cancer, Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny

IBBA – isobutylboronová kyselina

ICH – International Committee for Harmonization, Mezinárodní výbor pro harmonizaci

ISO – International Organization for Standardization, Mezinárodní organizace pro normalizaci

LOD – limit of detection, limit detekce

LOQ – limit of quantitation, limit kvantifikace

MIDA – ester kyseliny *N*-methyliminodioctové

MBTH – 3-methylbenzothiazolinon hydrazin

MeOH – methanol
MP – methylpyrrolidon
MR – masking solution, maskovací roztok
MS – mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie
MS/MS – tandem mass spectrometry, tandemová hmotnostní spektrometrie
MTBSTFA – *N-terc*-butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoracetamid
n – šum
NCI – negative chemical ionization, negativní chemická ionizace
ND – nebylo detegováno
NPD – nitrogen-phosphorous detector, dusíko-fosforový detektor
***n*-PrOH** – *n*-propanol
PDMS – polydimethylsiloxan
PEG – polyethylenglykol
PFPA – anhydrid kyseliny pentafluorpropionové
R – rozlišení
RL – reporting level
R² – coefficient of determination, koeficient determinace
RSD – relative standard deviation, relativní směrodatná odchylka
RT příp. **t_r** – retention time, retenční čas
s – výška píku
S – směrnice kalibrační závislosti
SAB – Mezinárodní agentura Science Advisory Board
SCS – stock calibration solution, zásobní kalibrační roztok
σ – směrodatná odchylka úseku na ose y
SIM – selected ion monitoring, monitorování selektivního iontu
SPE – solid phase extraction, extrakce tuhou fází
SPME – solid phase microextraction, mikroextrakce na tuhé fázi
***t*-BDMCS** – *terc*-butyldimethylchlorsilan
TBDMS – *terc*-butyldimethylsilyl
***t*-BME** – *terc*-butyl methyl ether
TEA – triethylamin
TFA – trifluoracetamid
TFAA – anhydrid kyseliny trifluoroctové
TFAI – trifluoracetylimidazol

THF – tetrahydrofuran

TIC – total ion current, celkový iontový proud

TMCS – trimethylchlorsilan

TMS – trimethylsilyl

TMSI – *N*-trimethylsilylimidazol

TSS – test suitability solution, roztok testu způsobilosti

UHPLC – ultra-high performance liquid chromatography, ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

U.S. EPA – United States Environmental Protection Agency, Americká agentura pro ochranu životního prostředí

UV – ultraviolet detection, ultrafialová detekce

$w_{1/2}$ – full width at half of maximum, šířka píku v polovině výšky

WCS – working calibration solution, pracovní kalibrační roztok

WHO – World Health Organisation, Světová zdravotnická organizace

ŽIVOTOPIS

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno: Roman Papoušek
Adresa: Opavská 13, 748 01 Hlučín
Email: roman.papousek@hotmail.com

VZDĚLÁNÍ

- **09/2012 – současnost**

Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, PhD studium oboru Analytická chemie

Disertační práce: Analýza polárních látek plynovou chromatografií

- **2010 – 06/2012**

Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, magisterský navazující obor Analytická chemie, obdržel titul Mgr.

Diplomová práce: Analýza akrylamidu metodou GC/MS

V rámci tohoto studijního oboru získáno osvědčení o absolvování rozšiřujícího studijního modulu „Analytická chemie ve forenzních vědách“.

- **2007 – 2010**

Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální chemie, bakalářský obor Ekochemie, obdržel titul Bc.

PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI

- **02/2018 – současnost**

HPST s.r.o., Praha

Servisní inženýr analytické instrumentace (GC, GC/MS) Agilent Technologies, Inc.

- **10/2016 – 01/2018**

Teva Czech Industries s.r.o., Opava

Výzkumný a vývojový analytik (laboratoř GC, oddělení R&D)

STÁŽE

- **10/2014 – 12/2014**

University of Vienna, Rakousko

Hmotnostně spektrometrická analýza *O*-glykanů (pod vedením prof. Andrease Rizziho).

- **07/2014**

University of Szeged, Maďarsko

HPLC enantioseparace beta3-aminokyselin na zwitterionických stacionárních fázích (pod vedením prof. Antala Pétera).

- **03/2014 – 06/2014**

University of Tasmania, Hobart, Austrálie

Vývoj analytické metody pro identifikaci složek esenciálních olejů pomocí 2-D GC-MS/NMR systému (pod vedením Assoc/Prof Roberta Shellieho).

PROJEKTY

- | | |
|--------------------------|---|
| • IGA_PrF_2015_020 | Matricový efekt a jeho potlačení při analýze vzorků (člen týmu) |
| • CZ.1.07/2.2.00/28.0029 | Modulární výuka jako nástroj odezvy vzdělávacího systému na potřeby praxe (člen týmu) |
| • IGA_PrF_2014_031 | Matricový efekt a jeho vliv na výtěžnost analytického postupu (člen týmu) |
| • IGA PrF_2013_030 | Úprava vzorku při analýze složitých matric (člen týmu) |
| • IGA PrF_2012_020 | Selektivita a analýza složitých matric (člen týmu) |

PEDAGOGICKÁ ČINNOST

- ZS 2015/2016 ACH/APACHC (Cvičení z aplikované analytické chemie - blokově)
- LS 2014/2015 ACH/PAC (Pokročilá analytická chemie – 2 x 7 hod./týden)
- ZS 2014/2015 ACH/APACHC (Cvičení z aplikované analytické chemie - blokově)
- ZS 2013/2014 ACH/APACHC (Cvičení z aplikované analytické chemie - blokově)
- LS 2012/2013 ACH/PAC (Pokročilá analytická chemie - 7 hod./týden)

- ZS 2012/2013 ACH/APACHC (Cvičení z aplikované analytické chemie - blokově)
- Oponent bakalářské práce Edity Zatloukalové na téma: „Vysokotlaké extrakce máty peprné“ – úspěšně obhájeno květen 2016.
- Konzultant diplomové práce Bc. Zuzany Ropkové na téma: „Analýza syntetických analogů pižma plynovou chromatografií“ – úspěšně obhájeno květen 2014.

PUBLIKACE

- **Papoušek R.**, Žák S., Štverka P., Gavenda A., Borovcová L., Barták P., *Determination of Residual Solvents in Isobutylboronic Acid: Masking Derivatization Improves Stability of GC Column*, J. Sep. Sci., (2019) – v tisku
DOI: 10.1002/jssc.201800968
- Skopalová J., Barták P., Bednář P., Tomková H., Ingr T., Lorencová I., Kučerová P., **Papoušek R.**, Borovcová L., Lemr K., *Carbon fiber brush electrode as a novel substrate for atmospheric solids analysis probe (ASAP) mass spectrometry: Electrochemical oxidation of brominated phenols*, Anal. Chim. Acta 999 (2018) 60-68.
- Kučera L., **Papoušek R.**, Kurka O., Barták P., Bednář P., *Study of composition of espresso coffee prepared from various roast degrees of Coffea arabica L. coffee beans*, Food Chem. 199 (2016) 727-735.
- Ilisz I., Grecsó N., **Papoušek R.**, Pataj Z., Barták P., Lázár L., Fülöp F., Lindner W., Péter A., *High-performance liquid chromatographic separation of unusual β 3-amino acid enantiomers in different chromatographic modes on Cinchona alkaloid-based zwitterionic chiral stationary phases*, Amino Acids 47 (2015) 2279-2291.
- **Papoušek R.**, Pataj Z., Nováková P., Lemr K., Barták P., *Determination of Acrylamide and Acrolein in Smoke from Tobacco and E-Cigarettes*, Chromatographia 77 (2014) 1145-1151.
- **Papoušek R.**, Nováková P., Marková E., Barták P. *Analýza akrylamidu metodou GC-MS*, Chem. Listy 107 (2013) 255-260.

KONFERENCE

- Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2016 (Olomouc).
Prezentovaný poster:

Papoušek R., Borovcová L., Táborský J., Skopalová J., Barták P.: *Determination of alloxan and products of its decomposition by GC/MS*. Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2016, Olomouc, June 6-9, 2016. Book of abstracts and program, p. 133-134. ISBN 978-80-244-4961-6.

- Analytical Methods and Human Health (Patince, Slovakia). Prezentovaný poster:
Papoušek R., Borovcová L., Petr J., Barták P.: *Analysis of Alloxan by GC/MS*. Analytical Methods and Human Health, Patince, Slovakia, June 15 - 18, 2015. Conference Proceedings p. 249. ISBN 978-80-971179-5-5.
- Konference projektu MOSYP (Branná, ČR). Přednesený příspěvek:
Papoušek R., Deans B., Shellie R.: *Heart-Cutting 2-D GC-MS/NMR System for Essential Oil Components Identification*. Conference of the project CZ.1.07/2.2.00/28.0029 „Modular education as a tool that enables the educational system to respond to needs of practice“ from the Education for Competitiveness Operational Programme, Branná, Czech Republic, September 24 - 26, 2014.
- Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2014 (Olomouc). Prezentovaný poster:
Papoušek R., Ropková Z., Pataj Z., Bednář P., Barták P.: *Analysis of Synthetic Musk Compounds by GC/MS using HS-SPME and SPE Techniques*. Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2014, Olomouc, February 10-14, 2014. Book of abstracts and program. Acta Univ. Palacki Olomuc., Fac. Rerum Natur., Chemica 51S, p. 171-172. Palacky University, Olomouc 2014. ISBN 978-80-244-3950-1, ISSN 0232-0061.
- XXXVI. Kémiai Előadói Napok (Szeged, Hungary). Přednesený příspěvek:
Papoušek R., Pataj Z., Nováková P., Barták P.: *Acrylamide and Acrolein Analysis – From Tobacco Smoke to E-smoke*. XXXVI. Kémiai Előadói Napok, Szeged, Hungary, October 28-30, 2013. Program and book of abstracts, p. 47, ISBN 978-963-315-145-7.

- 9th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods (Siófok, Hungary). Prezentovaný poster:
Papoušek, R., Pataj, Z., Nováková, P., Barták, P.: *Tobacco and E-smoke – GC/MS Approach II. Derivatization Techniques: Acrylamide Determination in Smoke*. 9th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok, Hungary, September 4-6, 2013. Book of Abstracts, p. 75, ISBN 978-963-89335-2-2.
- Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2012 (Olomouc). Prezentovaný poster:
R. Papoušek, P. Nováková, P. Bednář, P. Barták: *GC/MS analysis of acrylamide in foods*. Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2012, Olomouc, June 11th-14th, 2012. Book of abstracts and program. Acta Univ. Palacki Olomuc., Fac. Rerum Natur., Chemica 50S, p.134-135. Palacky University, Olomouc 2012. ISBN 978-80-244-3115-4, ISSN 0232-0061.

DALŠÍ AKTIVITY

- Asistenční činnost při organizaci exkurzí škol a popularizačních akcí.
- Diskuze ve vysílání Českého rozhlasu Olomouc na téma výroby ovocných destilátů a bezpečnosti lihovin (19. září 2014).
- Vývoj metody pro analýzu léčiv v odpadních a povrchových vodách pro firmu Litolab (výzkumná zpráva).
- Analýzy methanolu v lihovinách a destilátech – měření pro veřejnost v rámci methanolové aféry (2012-2013).

PŘÍLOHY

PUBLIKAČNÍ VÝSTUPY VZTAHUJÍCÍ SE K DISERTAČNÍ PRÁCI

1. **Papoušek R.**, Pataj Z., Nováková P., Lemr K., Barták P., *Determination of Acrylamide and Acrolein in Smoke from Tobacco and E-Cigarettes*, Chromatographia 77 (2014) 1145-1151.
2. **Papoušek R.**, Žák S., Štverka P., Gavenda A., Borovcová L., Barták P., *Determination of Residual Solvents in Isobutylboronic Acid: Masking Derivatization Improves Stability of GC Column*, J. Sep. Sci., (2019) – v tisku
DOI: 10.1002/jssc.201800968

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



Analýza polárních látek plynovou chromatografií

AUTOREFERÁT

k disertační práci

Autor práce:

Mgr. Roman Papoušek

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí disertační práce:

doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Olomouc 2019

SOUHRN

Disertační práce je zaměřena na vývoj nových plynově-chromatografických metod určených pro separaci a stanovení vybraných polárních látek, pro které byly navrženy vhodné derivatizační postupy. Díky chemické derivatizaci bylo možné stanovit i polární sloučeniny, které by v jejich nativní podobě nebylo možno analyzovat. Teoretická část práce pojednává o definici polaritý látek, problematice spojené s jejich analýzou, popisuje příčiny vedoucí k využití chemické derivatizace a v neposlední řadě rovněž podává přehled tradičních i méně častých derivatizačních způsobů. Teoretickou část uzavírají kapitoly poskytující bližší informace o vybraných polárních analytech, pro které byly v rámci této práce navrženy a vyvinuty prekoncentrační a derivatizační postupy, včetně chromatografických a detekčních podmínek.

Výsledky práce zahrnují studium a vývoj metody určené pro současné stanovení akroleinu a akrylamidu, ve vzorcích tabákového kouře a kouře z elektronických cigaret. Pro tento účel byla navržena aparatura umožňující zachyt jak hlavního, tak vedlejšího kouře do vodného prostředí. Z důvodu vysoké polaritý a nízké molekulové hmotnosti akroleinu i akrylamidu, bylo přistoupeno k jejich chemické derivatizaci prostřednictvím bromace, přičemž byla provedena optimalizace celého procesu. Výsledkem této modifikace bylo snížení polaritý obou analytů, zvýšení jejich stability, molekulové hmotnosti a extrahovatelnosti. Vnesením atomů bromu do molekul těchto analytů bylo rovněž dosaženo lepší selektivity a nižších detekčních limitů. Navržená metoda byla úspěšně validována. Limit detekce byl v případě akrylamidu stanoven na 0,27 µg/cig. ek., a pro akrolein na $8,35 \cdot 10^{-3}$ µg/cig. ek. Analýzou reálných vzorků byl zjištěn obsah akroleinu ve všech testovaných vzorcích, tzn. v tabákovém kouři i kouři z elektronických cigaret, u kterých je jeho přítomnost vysvětlena degradací glycerolu nacházejícího se v náplni tohoto zařízení. Přítomnost akrylamidu pak byla prokázána jen v případě kouře z tabákových výrobků, ve kterých akrylamid vzniká prostřednictvím Maillardovy reakce.

Mezi další studie prováděné v rámci této práce patří návrh, vývoj a validace headspace metody určené ke stanovení zbytkových rozpouštědel v kyselině isobutylboronové, která je využívána při syntéze protinádorového léčiva Bortezomibu. Z důvodu vysoké reaktivitý a těkavosti této kyseliny bylo nezbytné, pro úspěšné stanovení přítomných zbytkových rozpouštědel, provedení jejího maskování pomocí činidla 1,8-diaminonafthalenu. Touto kondenzační reakcí byl připraven produkt, který již neměl

tendenci přecházet do headspace fáze, a nedocházelo tak k poškozování stacionární fáze kolony jako v případě analýzy nemaskované kyseliny isobutylboronové. Celý navržený proces byl optimalizován a validován podle směrnic mezinárodních lékopisů. Vyvinutá metoda je rutinně využívána ve farmaceutické společnosti Teva, v jejichž spolupráci byl tento projekt řešen.

Další polární látkou, pro kterou byla v rámci této práce navržena analytická metoda, je alloxan. Tato sloučenina je známá svojí schopností způsobovat diabetes a existuje důvodné podezření na její přítomnost v bělené mouce. Alloxan je opět látka reaktivní a nízkomolekulární, pro niž byl vyvinut dvoukrokový derivatizační postup vedoucí ke snížení její polariry a zvýšení stability. V prvním derivatizačním kroku bylo využito dosud nepublikované kondenzační reakce mezi alloxanem a 4,5-dibrom-1,2-fenylendiaminem za vzniku 7,8-dibromalloxazinu, který byl v druhém kroku podroben silylaci. Díky vyšší retenci výsledného derivátu na nepolární stacionární fázi se podařilo získat pík jasně separovaný od matričních složek. Přítomnost dvou atomů bromu v molekule derivátu napomohla jeho citlivé detekci. Funkčnost metody byla ověřena prostřednictvím analýzy vzorku mouky spikovaného alloxanem, avšak u žádného z testovaných reálných vzorků nebyl obsah alloxanu prokázán. Z tohoto důvodu byla zaměřena pozornost na degradační produkty alloxanu – kyselinu alloxanovou a parabanovou. Obě kyseliny bylo možné analyzovat jako TMS deriváty, avšak ani tyto produkty vznikající rozkladem alloxanu nebyly v reálných vzorcích mouky detegovány.

SUMMARY

The dissertation is focused on the development of new gas-chromatographic methods, intended for separation and determination of selected polar substances, for which suitable derivatization procedures have been proposed. Chemical derivatization allowed for determination of polar compounds, which could not be analyzed in their native form. The theoretical part deals with the definition of the polarity of substances, the problems associated with their analysis, describes the causes leading to the use of chemical derivatization and last but not least, it also gives an overview of traditional and less frequent derivatization methods. The theoretical part is terminated with chapters providing more detailed information about selected polar analytes for which preconcentration and derivatization procedures have been proposed and developed, including chromatographic and detection conditions.

The results include the study and method development for the simultaneous determination of acrolein and acrylamide in samples of tobacco smoke and smoke from electronic cigarettes. For this purpose, an apparatus for capturing both the main and the secondary smoke in the aqueous solution has been devised. Due to the high polarity and low molecular weight of acrolein and acrylamide, both analytes were chemically derivatized by bromination. Optimization of the whole derivatization process was performed concurrently. As a result of this modification, the polarity of both analytes was reduced, their stability, molecular weight and extractability increased. Introduction of bromine atoms into the molecules of these analytes led to better selectivity and lower detection limits. The proposed method has been successfully validated. The limit of detection was 0.27 µg/cig. eq. for acrylamide and $8.35 \cdot 10^{-3}$ µg/cig. eq. for acrolein. Analysis of real samples revealed acrolein content in all tested samples, i.e. in tobacco smoke as well as smoke from electronic cigarettes, in which its presence is explained by the degradation of glycerol present in the e-liquid. The presence of acrylamide was proved only in the case of smoke from tobacco products in which acrylamide is generated during Maillard reaction.

Other studies in this thesis include the design, development and validation of a headspace method for determination of residual solvents in isobutylboronic acid, which is used in the synthesis of antitumor drug Bortezomib. Due to the high reactivity and volatility of this acid, it was necessary to use masking derivatization with 1,8-diaminonaphthalene, which allowed the determination of present residual solvents.

This condensation reaction led to formation of a product that no longer tended to transfer into the headspace phase, and thus did not damage the stationary phase of the column as in the case of unmasked isobutylboronic acid. The entire proposed process has been optimized and validated according to international pharmacopoeia guidelines. The developed method is routinely used in the pharmaceutical company Teva, where this project was carried out.

Alloxane is another polar substance for which an analytical method has been proposed. This compound is known for its ability to cause diabetes and there is a reasonable suspicion of its presence in bleached flour. Alloxane is reactive and has low molecular weight. Therefore, a two-step derivatization process has been developed to reduce its polarity and increase stability. In the first derivatization step, a previously unpublished condensation reaction between alloxane and 4,5-dibromo-1,2-phenylenediamine was utilized to give 7,8-dibromalloxazine, which was silylated in the second step. Due to the higher retention of the resulting derivative on the non-polar stationary phase, a peak clearly separated from the matrix components was obtained. The presence of two bromine atoms in the resulting molecule supported its sensitive detection. The performance of the method was verified by analyzing a sample of flour spiked with alloxan, but none of the tested real samples showed alloxane presence. For this reason, attention has been focused on the degradation products of alloxane, alloxanic and parabanic acid. Both acids could be analyzed as TMS derivatives. However, these alloxane decomposition products were not detected in real flour samples.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. ANALÝZA POLÁRNÍCH LÁTEK PLYNOVOU CHROMATOGRAPHIÍ.....	2
2.1. Akrylamid a akrolein.....	3
2.2. Isobutylboronová kyselina – stanovení zbytkových rozpouštědel.....	4
2.3. Alloxan.....	4
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	6
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	7
4.1. GC/MS metoda pro současné stanovení akrylamidu a akroleinu v tabákovém kouři a kouři (aerosolu) z elektronických cigaret	7
4.1.1. Záchyt plyných vzorků	7
4.1.2. Derivatizace	8
4.1.3. Vývoj metody	9
4.1.4. Validace metody a analýza reálných vzorků	11
4.1.5. Závěr.....	12
4.2. Stanovení zbytkových rozpouštědel v isobutylboronové kyselině – využití maskovací derivatizace ke zlepšení stability GC kolony	13
4.2.1. Optimalizace maskovací reakce mezi IBBA a DAN	13
4.2.2. Optimalizace headspace GC metody	14
4.2.3. Validace metody a analýza reálných vzorků	16
4.2.4. Závěr.....	19
4.3. GC/MS metoda pro stanovení alloxanu a jeho rozkladných produktů v mouce... ..	20
4.3.1. Vývoj derivatizační a chromatografické metody	20
4.3.2. Analýza reálného vzorku mouky	21
4.3.3. Identifikace degradačních produktů alloxanu a stanovení kyseliny parabanové a alloxanové v mouce	22
4.3.4. Závěr.....	23
5. ZÁVĚR.....	24
POUŽITÁ LITERATURA	26
ŽIVOTOPIS.....	30

1. ÚVOD

Plynová chromatografie je analytickou separační technikou, která je již po několik desetiletí v mnoha zavedených aplikacích nezastupitelná. Uplatnění nachází jak ve vědecko-výzkumné oblasti, tak také při rutinních analýzách ve farmacii, forenzních a klinických laboratořích, v petrochemickém, potravinářském a kosmetickém průmyslu, monitoringu životního prostředí aj. K jejímu rozšíření přispívají nejen její separační schopnosti, cenová dostupnost a relativně nízké provozní náklady, ale také flexibilita, se kterou lze tuto techniku využít při zcela odlišných aplikacích. Široké spektrum těkavých látek, které lze prostřednictvím této instrumentace analyzovat, je možné díky správně zvolené chemické derivatizaci dále ještě doplnit o řadu dalších analytů. Chemickou modifikací cílových sloučenin je možné dosáhnout významného zlepšení nejen z hlediska jejich separace a detekce, ale taktéž samotné izolace analytů ze vzorku, která může být v případě analýzy polárních látek přítomných v komplexních matricích vcelku komplikovaná. A právě problematice analýzy polárních látek prostřednictvím plynové chromatografie ve spojení s chemickou derivatizací je věnována pozornost v této disertační práci.

Disertační práce je zaměřena na studium, vývoj a aplikaci nových plynově chromatografických metod v analýze polárních sloučenin. Konkrétně byla navržena plynově chromatografická metoda s hmotnostní detekcí (GC/MS) pro současné stanovení akroleinu a akrylamidu v tabákovém kouři a kouři z elektronických cigaret. Dále byla vyvinuta headspace plynově chromatografická metoda s plamenoionizační detekcí (HS-GC-FID) umožňující stanovení zbytkových rozpouštědel přítomných v kyselině isobutylboronové, přičemž tato metoda byla validována a je využívána pro rutinní analýzy ve farmaceutickém průmyslu. Byla rovněž studována problematika stanovení alloxanu a jeho degradačních produktů v bělené mouce, včetně aplikace navržených metod a derivatizačních postupů pro analýzu reálných vzorků.

2. ANALÝZA POLÁRNÍCH LÁTEK PLYNOVOU CHROMATOGRAFIÍ

Prvotní koncept plynové chromatografie (GC) byl navržen již ve 40. letech minulého století britským biochemikem Richardem Syngem a chemikem Archerem Martinem [1], který následně ve spolupráci s Anthony Jamesem představil roku 1952 první plynově chromatografický systém uplatněný při separaci směsi těkavých mastných kyselin [2]. Díky široké využitelnosti a možnostem, které plynová chromatografie nabízí, je tato technika již řadu let „zlatým standardem“ současné separační instrumentace s celosvětovým prodejem více než 30 000 systémů za rok [3]. Hlavními jejími výhodami jsou účinnost a vysoká rozlišovací schopnost, citlivost, vysoká přesnost při kvantitativní analýze, možnost rychlých analýz (v řádech sekund až minut), dávkování nízkých objemů vzorků, spolehlivost, finanční nenáročnost a dostupnost řady univerzálních i vysoce selektivních detektorů. Nejvíce limitujícím faktorem plynové chromatografie je závislost na těkavosti analytu a omezení jeho molekulovou hmotností (většina těkavých analytů zpravidla pod 500 Da) a dále nevhodnost pro analýzu termolabilních látek [3,4]. Iontové, velmi polární, termolabilní a vysokomolekulární látky nejsou pro GC analýzu vhodné. Avšak v závislosti na struktuře jejich molekuly a na přítomnosti různých funkčních skupin, je v řadě případů možné uplatnit chemickou derivatizaci těchto analytů, jejímž výsledkem jsou produkty, které již z hlediska těkavosti, teplotní stability apod., splňují podmínky pro plynově chromatografickou separaci [5].

Funkční skupiny typu hydroxylová, karboxylová, karbonylová, thiolová a aminoskupina jsou zodpovědné, kvůli jejich polaritě a sklonům vytvářet vodíkové vazby, za nízkou těkavost látek, za silnou adsorpci analytu na stacionární fázi a aktivní centra a tím za špatnou symetrii píku. V neposlední řadě rovněž za termální a chemickou nestabilitu vedoucí ke ztrátám sloučenin v chromatografickém systému během analýzy.

Obecně lze konstatovat, že k derivatizačnímu kroku se přistupuje především z následujících důvodů:

- zvýšení těkavosti
- zvýšení tepelné stability, popř. snížení reaktivity analytů
- zlepšení chromatografického chování (symetrie píků)
- zlepšení separace strukturně příbuzných sloučenin (izomery)
- zvýšení selektivity a citlivosti detekce

Mezi nejčastější způsoby derivatizace polárních funkčních skupin patří silylace následovaná acylací a alkylací včetně esterifikace. Mezi méně využívané, avšak účinné derivatizační postupy patří příprava oximů a hydrazonů, substituce na aromatický kruh, hydrolýza, oxidace a redukce, adice na dvojnou vazbu, případně bromace dvojných vazeb alkenů (adice elektrofilní) nebo arenů (substituce elektrofilní) [6-13].

2.1. Akrylamid a akrolein

Akrylamid (prop-2-enamid) je nejmenším nenasyceným primárním amidem s velmi vysokou polaritou. Jedná se o nízkomolekulární krystalickou látku bez barvy a zápachu, která ve své molekule obsahuje reaktivní dvojnou vazbu a amidovou skupinu, která nese aktivní atomy vodíku s ochotou vytvářet pevné vodíkové vazby [14]. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) zařadila akrylamid do skupiny 2A, která odpovídá pravděpodobným lidským karcinogenům [15]. V roce 2002 bylo zjištěno, že tepelně upravené potraviny bohaté na škrob obsahují právě akrylamid. K jeho vytváření dochází za teplot vyšších jak 120°C (při pečení, grilování, smažení) během Maillardovy reakce mezi aminokyselinou asparaginem a redukujícími cukry, typicky glukózou a fruktózou. Akrylamid se nachází v široké škále potravin a jeho relativně vysoké koncentrace byly rovněž nalezeny v cigaretovém kouři [16-19].

Akrolein (prop-2-enal) je nejjednodušším α,β -nenasyceným aldehydem se třemi atomy uhlíku a vysoce reaktivní dvojnou vazbou. Jedná se o bezbarvou až mírně žlutou kapalinu s nepříjemně štiplavým zápachem, nízkým bodem varu (52,6°C), vysokou těkavostí a velmi dobrou rozpustností ve vodě. Akrolein je vysoce toxický jak při inhalaci, orálním podání, tak také při dermální expozici. Je silně dráždivý, způsobuje nekrózu pokožky, očí a dýchacích cest [20-22]. Vykazuje mutagenní účinky způsobující poškození DNA a proteinů [23]. Z hlediska lidského zdraví patří mezi hlavní zdroje akroleinu kouř z tabákových výrobků a tepelně upravované potraviny bohaté na sacharidy a tuky. V řadě případů dochází ke vzniku akroleinu z důvodu tepelného rozkladu široce využívaného glycerolu, který nastává při teplotě dosahující 290°C [24-26].

Z řady hledisek se jako velice výhodný způsob derivatizace umožňující současné stanovení akrylamidu a akroleinu jeví bromace. Vývoj metody umožňující jejich současné stanovení v tabákovém kouři a kouři z elektronických cigaret [27] za využití bromace

jakožto způsobu jejich derivatizace je jedním z cílů této disertační práce a je součástí experimentální části a výsledků.

2.2. Isobutylboronová kyselina – stanovení zbytkových rozpouštědel

Organická rozpouštědla jsou nepostradatelnou součástí syntézy aktivních farmaceutických substancí a jejich rezidua jsou nežádoucí jak v samotných aktivních látkách, tak také v pomocných složkách léčiv [28]. Stanovení zbytkových rozpouštědel v surovinách, meziproduktech a konečných farmaceutických výrobcích prostřednictvím plynové chromatografie se statickým headspace dávkováním vzorků je již rutinní a dobře zavedenou praxí, která je rovněž doporučena evropským i americkým lékopisem [29-31]. Avšak ani tuto osvědčenou metodu nelze bez předchozí úpravy vzorku použít v případech, kdy těkavé složky matrice přecházejí do plynné fáze a působí negativně na stacionární fázi chromatografické kolony, případně způsobují interference během analýz. Do této kategorie těkavých a reaktivních látek, které mají vliv na spolehlivost analýzy v důsledku silného poškození stacionární fáze, spadá kyselina isobutylboronová (IBBA), používaná v posledním kroku syntézy Bortezomibu. Stacionární fáze kapilární kolony, která byla vystavena isobutylboronové kyselině v rámci cca 20 headspace analýz, je poškozená do té míry, že je prakticky nepoužitelná pro další analýzy, především pak pro stanovení polárních rozpouštědel, zejména alkoholů. Z tohoto důvodu je nezbytné zařadit do metody určené pro stanovení zbytkových rozpouštědel v IBBA takovou předúpravu vzorku, která povede ke snížení těkavosti a reaktivity této látky tak, aby bylo zamezeno interferencím během statické headspace analýzy. Na základě schopnosti 1,8-diaminonafthalenu tvořit spolu s kyselinou isobutylboronovou stabilní derivát bylo toto činidlo použito pro její maskování. Tento účinný způsob maskování boronylové skupiny byl aplikován při vývoji metody pro stanovení zbytkových rozpouštědel v IBBA, který je součástí experimentální části této disertační práce [32].

2.3. Alloxan

Alloxan (2,4,5,6-tetraoxypyrimidin) je pyrimidinovým derivátem s prokázaným diabetogenním účinkem, který se projevuje nekrózou beta-buněk slinivky břišní produkujících inzulin [33]. Z důvodu nestability se alloxan může rozkladat za vzniku řady

produktů v podobě oxidu uhličitého, močoviny, alloxantinu, kyseliny šťavelové, parabanové a alloxanové [34,35]. Tato nestabilita alloxanu může vést k problémům při vývoji metod pro jeho stanovení. Vývoj GC/MS metody pro stanovení alloxanu v bělené mouce (včetně metody pro stanovení produktů jeho rozkladu - kyseliny alloxanové a parabanové) je dalším tématem řešeným v rámci této disertační práce. V posledních letech se totiž lze setkat s tvrzeními o přítomnosti alloxanu právě v bělené pšeničné mouce, ve které vzniká jako vedlejší produkt oxidace xantofylů během procesu bělení mouky [36,37].

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Vědecko-výzkumná činnost v rámci doktorského studia byla zaměřena na nové možnosti a postupy v analýze polárních látek prostřednictvím plynové chromatografie, ať již ve spojení s FID nebo MS detekcí. Cílem bylo rozšířit spektrum látek analyzovatelných touto instrumentací o další analyty, a to především díky spojení této techniky s chemickou derivatizací, které je v této práci věnována zvláštní pozornost. Mezi konkrétní cíle výzkumné činnosti patří vývoj metod pro toxikologicky významné analyty z oblasti potravinářství i farmacie:

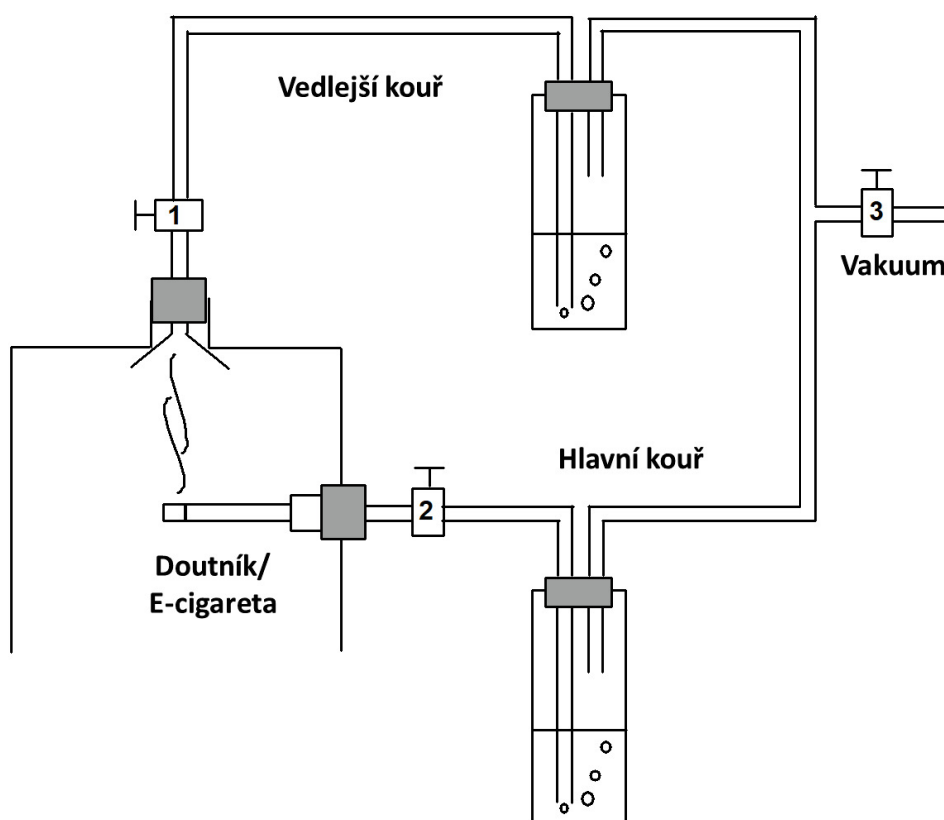
- Návrh a vývoj plynově chromatografické metody ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí umožňující současné stanovení akrylamidu a akroleinu v tabákovém kouři a kouři (aerosolu) z elektronických cigaret.
- Návrh, vývoj a validace metody pro stanovení zbytkových rozpouštědel v kyselině isobutylboronové, používané při syntéze léčiva Bortezomib, při jejíž analýze není možné z důvodu poškozování stacionární fáze kolony využít běžně používanou metodu pro stanovení zbytkových rozpouštědel.
- Návrh a vývoj GC/MS metod pro stanovení polárního analytu – alloxanu a jeho degradačních produktů v bělené mouce.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. GC/MS metoda pro současné stanovení akrylamidu a akroleinu v tabákovém kouři a kouři (aerosolu) z elektronických cigaret

4.1.1. Záchyt plyných vzorků

Jedním z nejdůležitějších kroků celé analýzy bylo vytvoření vhodného způsobu vzorkování, které by věrně napodobovalo reálného uživatele tabákových výrobků a elektronických cigaret. Pomocí aparatury (Obr. 1), která byla speciálně pro tento účel navržena, bylo možné dodržet standardizovaný postup záchytu vzorku zahrnující simulaci kouření s odběrem definovaného množství vzorku v pravidelných intervalech. Místo filtru ze skelných vláken a vzduchotěsného vaku, které jsou doporučeny ISO normou [38], byl záchyt pevných i plyných částic přítomných v kouři uskutečněn prostřednictvím promývačky naplněné Milli-Q vodou. Pro záchyt polárních analytů a jejich následnou chemickou derivatizaci se toto prostředí ukázalo být jako nejvhodnější [19].

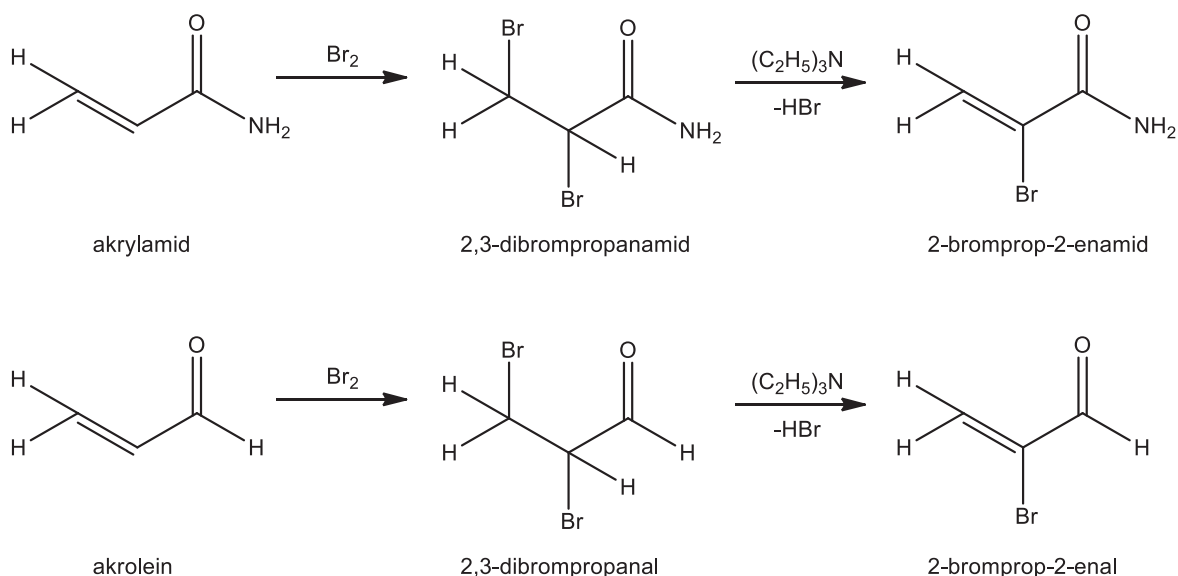


Obr. 1: Aparatura pro záchyt tabákového kouře a kouře z elektronických cigaret [27].

4.1.2. Derivatizace

Separace neiontových, vysoce polárních molekul s nízkým bodem varu a nízkou molekulovou hmotností může být z důvodu příliš slabé retence těchto látek na standardně používaných nepolárních stacionárních fázích problematická. Rovněž jejich detekce může být negativně ovlivňována interferencemi s jinými nízkomolekulárními látkami nebo fragmenty pocházejícími ze složek matrice a také horší odezvou hmotnostně spektrometrického detektoru na sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností. Společným řešením většiny uvedených problémů může být derivatizace těchto malých polárních analytů spojená se zvýšením jejich molekulové hmotnosti.

Při vývoji metody pro současné stanovení akrylamidu a akroleinu v kouři z tabákových výrobků a elektronických cigaret byla využita derivatizace těchto analytů bromací (Obr. 2). Adicí bromu na dvojnou vazbu přítomnou v molekule těchto sloučenin lze docílit významného zlepšení vlastností cílových molekul. Vedle snížení polaritý obou analytů je další výhodou zejména zvýšení jejich extrahovatelnosti a taktéž jejich molekulové hmotnosti. V neposlední řadě pro bromovaný akrylamid i akrolein jsou typické více symetrické píky v naměřených chromatogramech. Rovněž přítomnost specifického isotopického vzoru v jejich hmotnostních spektrech přispívá k podstatně lepší selektivitě, snadné identifikaci píků a nižším detekčním limitům.

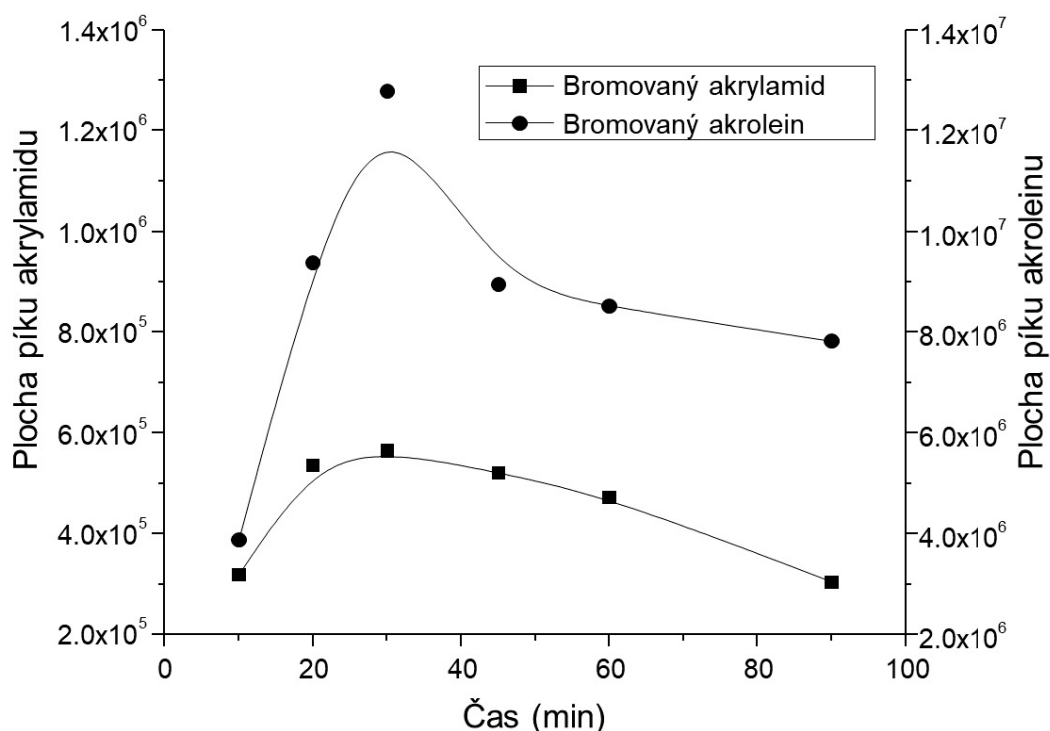


Obr. 2: Bromace a dehydrobromace akrylamidu a akroleinu.

4.1.3. Vývoj metody

Při vývoji metody byly využity jak komerčně dostupné standardy akroleinu a akrylamidu, tak rovněž čerstvě připravený vodný roztok akroleinu. K tomuto kroku bylo přistoupeno z důvodu přítomnosti stabilizátorů zabraňujících polymerizaci v komerčně dostupném standardu [39].

Pro zjištění vlivu reakčního času na proces bromace akrylamidu a akroleinu bylo současně připraveno 6 vzorků a to tak, že bylo smícháno 15 μ l vodného roztoku akrylamidu o koncentraci 1 mg/ml s 10 μ l čerstvě připraveného vodného roztoku akroleinu a s 10 ml deionizované vody. Pro každý z těchto vzorků byl použit jiný čas bromace v rozmezí 10-90 minut. Pokusem bylo zjištěno, že nejúčinněji jsou oba analyty derivatizovány při délce bromace v čase 30 minut (Obr. 3). Rovněž byl zjištěn vliv prostředí na proces derivatizace, kdy nejlepších výsledků bylo dosaženo v tmavém a chladném prostředí. *Tareke a kol.* využili pro stanovení akrylamidu taktéž bromaci [17], avšak derivatizační reakci nechali probíhat přes noc, což se při současném stanovení akrylamidu a akroleinu ukázalo být nevhodné. Bromace alkenů je dvouступňovou elektrofilní adicí. V prvním pomalejším kroku vzniká cyklický kationtový intermediát s můstkovým atomem bromu. Delší reakční doba může být v tomto případě užitečná, ovšem některé vedlejší a následné reakce mohou derivatizační proces komplikovat. V případě, že nebyly reakční podmínky správně nastaveny, tak bylo možné v naměřených chromatogramech pozorovat přítomnost i dalších bromovaných derivátů vznikajících radikálovou a elektrofilní substitucí. Tmavé a chladné derivatizační prostředí účinně eliminuje radikálovou substituci a významně zpomaluje substituci elektrofilní. Přítomná reaktivní karbonylová skupina může podléhat dalším reakcím např. oxidaci, elektrofilní adicí a nukleofilní substitucí [40,41], a to v závislosti na složkách matrice a primárních produktech vzniklých při reakci s nadbytkem bromu. V důsledku následných reakcí byl pozorován pokles výtěžnosti dibromderivátu akrylamidu i akroleinu při reakčních časech delších než 30 minut, a to i v tmavém a chladném prostředí.



Obr. 3: Studium vlivu reakčního času na proces bromace akrylamidu (čtverečky) a akroleinu (kolečka).

Aby bylo zabráněno nežádoucí reverzibilní nukleofilní adici vody na karbonylovou skupinu [42], bylo nezbytné získané ethylacetátové extrakty vysušit pomocí síranu hořečnatého. Navíc, aby bylo zamezeno reaktivní karbonylové skupině v dalších nežádoucích reakcích, tak bylo ke vzorku po prekoncentračním kroku přidáno 10 μ l *n*-propanolu. Na základě informací z literatury lze předpokládat, že přidavkem *n*-PrOH dochází v kyselém prostředí ke tvorbě acetalu a tím také k ochraně aldehydové skupiny [42]. Vzhledem k tomu, že vysoká teplota nástřikového prostoru způsobuje eliminaci alkoholu, tak se v chromatogramu acetal již neobjevuje a je tak možné kvantitativně detegovat obnovený brompropenal.

Z hlediska účinnosti separace byla taktéž podstatná teplota nástřikového prostoru, která by měla být dostatečně vysoká, tak aby bylo zajištěno okamžité zplynění/odpaření nadávkovaného vzorku. Obvykle využívaná teplota inletu (280°C) nebyla dostatečnou pro kvantitativní dehydrobromaci derivátu akrylamidu, protože byl v chromatogramu pozorován jak ve formě monobromderivátu, tak dibromderivátu. Pro získání jedné derivatizované formy v podobě stabilnějšího 2-bromprop-2-enamidu byl tedy ke konečnému

extraktu před nástřikem do GC přidán triethylamin. Konjugace nevazebného elektronového páru aminoskupiny akrylamidu vedla ve srovnání s akroleinem ke zvýšení delokalizační energie a částečné kompenzaci negativního indukčního efektu atomu bromu, což vedlo k získání stabilnějšího derivátu. V případě akroleinu nastavená teplota nástřikového prostoru pro kvantitativní dehydrobromaci dostačovala [43].

Dalším faktorem ovlivňujícím významně separaci, byla počáteční teplota teplotního programu. Při počáteční teplotě nižší než 50°C byla pozorována nízká reprodukovatelnost retenčních časů dříve eluovaného bromovaného akroleinu. Posuny retenčních časů byly pravděpodobně způsobeny kondenzací ethylacetátu (bod varu 77,1°C) na začátku kolony, což vedlo k nereprodukovatelnému odpařování a nereprodukovatelnému příspěvku zkondenzovaného filmu k retenci těkavých látek. Nastavení počáteční teploty na více než 50°C pak vedlo k silnému snížení retence bromovaného akroleinu a jeho interferenci s píkem rozpouštědla. Z těchto důvodů bylo tedy za optimální počáteční teplotu zvoleno 50°C.

4.1.4. Validace metody a analýza reálných vzorků

V případě stanovení akrylamidu byla pozorována velmi dobrá linearita kalibrační závislosti s koeficientem determinace $R^2 = 0,9990$ ($y = 21,657x - 22,797$). Limit detekce (LOD) pro akrylamid byl stanoven na 0,27 µg/cig. ek. a pro akrolein $8,35 \cdot 10^{-3}$ µg/cig. ek., zatímco hodnota limitu kvantifikace (LOQ) pro akrylamid činila 0,81 µg/cig. ek. a pro akrolein $2,50 \cdot 10^{-2}$ µg/cig. ek. Z hlediska preciznosti bylo pro oba analyty opakovanými GC/MS analýzami dosaženo v případě plochy píků RSD o hodnotě menší než 7 %, pro retenční časy pak byla hodnota RSD menší než 1 %. Průměrný retenční čas bromovaného akrylamidu a akroleinu činil 11,39 min, respektive 4,29 min.

Analýzou reálných vzorků bylo zjištěno, že v žádném vzorku kouře z elektronických cigaret akrylamid nebyl přítomen, respektive jeho koncentrace byla nižší než limit detekce použité metody. Jak již bylo zmíněno, zdraví škodlivý akrylamid se vytváří během Maillardovy reakce z aminokyselin a redukujících cukrů vystavených teplotám vyšším než 120°C. Jelikož zmíněné prekurzory nebyly v náplních elektronických cigaret přítomné, tak také nebyl akrylamid nalezen (Tab. I). Avšak při analýze reálného tabákového kouře (z doutníku) byl prokázán relativně vysoký obsah akrylamidu, a to jak v hlavním, tak ve vedlejší kouři (2,40 respektive 1,52 µg/cig. ek.).

Z důvodu charakterizace složení náplní do elektronických cigaret byla rovněž provedena přímá analýza těchto vzorků, kterou byl mimo jiné zjištěn vysoký obsah

glycerolu. Jedná se o látku bezpečnou, která však může být zdrojem akroleinu, na který se působením vysokých teplot rozkládá. Existuje řada průmyslových postupů pro konverzi glycerolu na akrolein, které popisují použití různých katalyzátorů za různých podmínek a za optimalizovaných teplot pohybujících se nejčastěji v rozmezí 267-307°C [44]. Přestože pracovní teplota elektronické cigarety je nižší, tak určité kovové části odpařovače (vaporizéru) jsou schopny dodat dostatek energie, případně i katalytický povrch potřebný k tomuto tepelnému rozkladu. To je pravděpodobně důvod, proč byla nalezena přítomnost akroleinu ve všech testovaných vzorcích elektronických cigaret, přičemž jeho nejvyšší obsah se nacházel v jednorázové elektronické cigaretě (Tab. I).

Tab. I: Výsledky z analýz akrylamidu a akroleinu v tabákovém kouři a kouři z elektronických cigaret.

Vzorek	Akrylamid (µg/cig. ek.)	Akrolein (µg/cig. ek.)
Doutník – hlavní kouř	2,40	4,48
Doutník – vedlejší kouř	1,52	8,27
E-cigareta – příchut' viševá	ND	0,17
E-cigareta – příchut' turecký tabák	ND	0,70
Jednorázová E-cigareta – příchut' Marlboro	ND	3,70
ND µg/cig. ek.	nebylo detegováno množství v µg uvolněné z jedné běžné cigarety nebo ekvivalentu elektronické cigarety (vypočteno na základě počtu vdechnutí kouře podle normy ISO)	

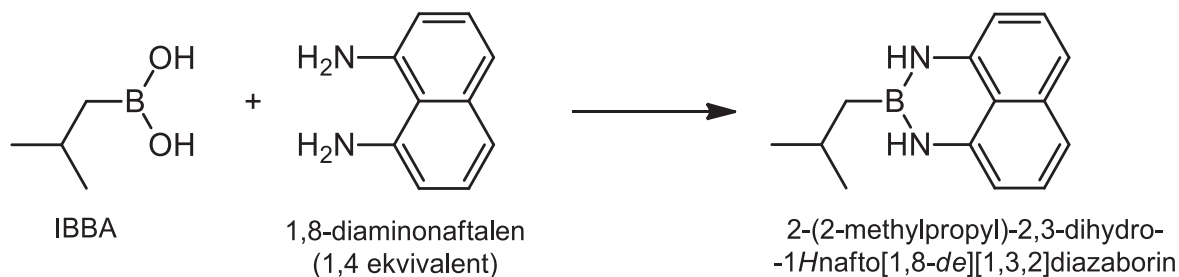
4.1.5. Závěr

Byla vyvinuta GC/MS metoda pro současné stanovení akrylamidu a akroleinu v tabákovém kouři a kouři z elektronických cigaret. Metoda využívá derivatizace obou analytů prostřednictvím bromace elementárním bromem ve vodném prostředí. Byla provedena optimalizace derivatizační reakce a jejích podmínek. Nejúčinnější bromace obou analytů bylo dosaženo po 30 minutách v tmavém a chladném prostředí. Metodou byla prokázána přítomnost akroleinu ve všech testovaných vzorcích a rovněž přítomnost akrylamidu, který se ovšem vyskytoval pouze v kouři tabákovém. Spolehlivost metody byla potvrzena validačním procesem.

4.2. Stanovení zbytkových rozpouštědel v isobutylboronové kyselině – využití maskovací derivatizace ke zlepšení stability GC kolony

4.2.1. Optimalizace maskovací reakce mezi IBBA a DAN

Významné poškození stacionární fáze kapilární kolony, ke kterému docházelo po provedení několika headspace analýz vzorku kyseliny isobutylboronové, vedlo k nutnosti vývoje metody umožňující stanovení zbytkových rozpouštědel v IBBA tak, aniž by byla negativně ovlivňována separační schopnost příslušné stacionární fáze. Proto byl navržen derivatizační postup založený na maskovací reakci IBBA s 1,8-diaminonaftalenem (DAN), jakožto vhodným činidlem umožňujícím konverzi těkavé a reaktivní IBBA na méně těkavý a méně reaktivní 2-(2-methylpropyl)-2,3-dihydro-1*H*-nafto[1,8-*de*][1,3,2]diazaborin (Obr. 4).



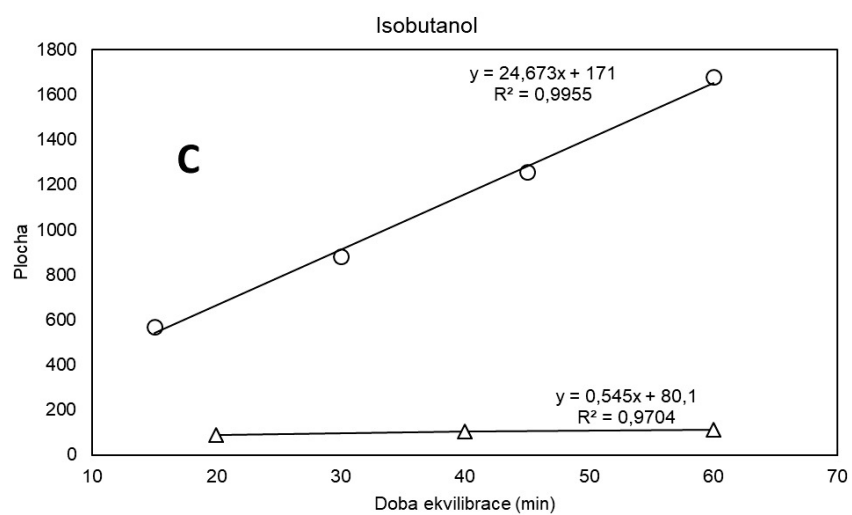
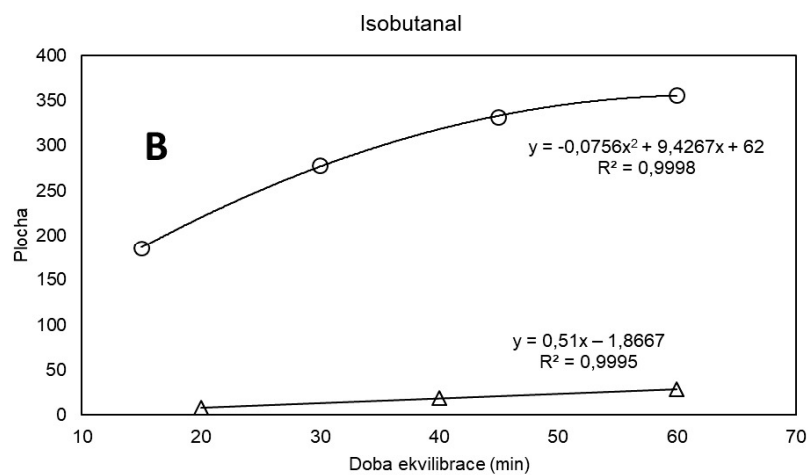
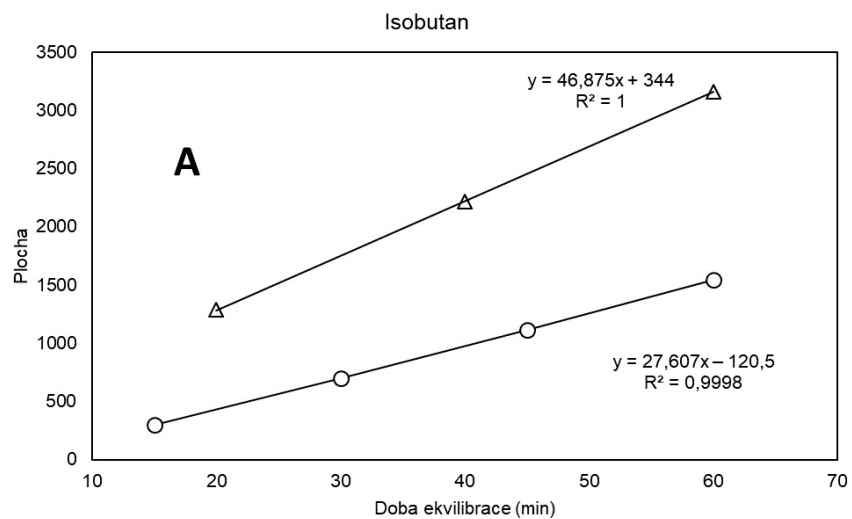
Obr. 4: Schéma reakce IBBA s DAN.

Kondenzační reakce mezi IBBA a DAN byla prováděna při 50°C, za bazické katalýzy DABCO rozpuštěným v benzylalkoholu. Toto rozpouštědlo se díky jeho dostatečně vysokému bodu varu často využívá při headspace analýzách zbytkových rozpouštědel. V tomto případě bylo vybráno i na základě jeho dobré schopnosti rozpouštět IBBA i DAN. Právě díky dobré rozpustnosti má IBBA malou tendenci přecházet do plynné fáze, což je důležité pro kvantitativní průběh maskovací reakce. Bazický katalyzátor DABCO přidaný do maskovacího roztoku úspěšně akceleroval průběh kondenzační reakce. Reakční doba 60 minut byla stanovena na základě optimalizace provedené v rozmezí 0 až 90 minut. Za pomoci činidla BSTFA, které bylo použito pro silylaci nezreagovaného DAN, byla ve zvolených časových intervalech ukončena probíhající reakce. Následnou GC analýzou s přímým nástřikem byl stanoven reakční produkt.

4.2.2. Optimalizace headspace GC metody

Pro stanovení zbytkových rozpouštědel v IBBA byla využita běžně používaná plynově chromatografická metoda se statickým headspace dávkováním vzorků. Optimální doba ekvilibrace analytů mezi kapalnou a plynnou fází v headspace vialce byla stanovena z experimentů provedených při teplotě 90°C a v časovém rozmezí 15-60 minut. Prakticky v celém časovém intervalu ekvilibrace byla pozorována konstantní odezva pro jednotlivá zbytková rozpouštědla, kterými byl vzorek IBBA spikován na úroveň odpovídající jejich ICH limitům. Nicméně, s narůstající dobou ekvilibrace byl pozorován vznik degradačních produktů isobutanu, isobutanalu a isobutanolu. Z tohoto důvodu bylo vybráno 20 minut jako dostatečná doba pro ekvilibraci vzorku.

K degradaci aduktu IBBA+DAN dochází pravděpodobně dvěma způsoby. Jeden z procesů degradace souvisí s eliminací isobutanu, zatímco druhý spočívá v oxidativní hydrolýze vedoucí ke vzniku isobutanalu a isobutanolu. Bylo testováno, zdali by druhý z procesů mohl být potlačen odstraněním vody a oxidantů, například vzdušného kyslíku. Přímý přídavek dehydratačního činidla v podobě bezvodého Na_2SO_4 , MgSO_4 , případně CaC_2 , nevedl k potlačení vzniku degradačních produktů. Při propláchnutí headspace vialky argonem, ještě před zahájením inkubace vzorku, byla nahrazena přítomná oxidativní atmosféra inertním plynem. Tím byl významně potlačen vznik oxidačních produktů (isobutanalu a isobutanolu) za současně mírného nárůstu tvorby isobutanu.



○ Vzduch
△ Inertní atmosféra (argon)

Obr. 5: Závislost plochy píků degradačních produktů na době ekvilibrace v přítomnosti vzduchu, respektive inertní atmosféry argonu.

Obr. 5 znázorňuje nárůst koncentrací všech degradačních produktů během ekvilibrace, a to jak ve vzduchu, tak v atmosféře argonu. Zatímco koncentrace isobutanu v inertní atmosféře mírně vzrostla (Obr. 5A), tak koncentrace obou oxidačních produktů (isobutanalu a isobutanolu) se v inertní atmosféře argonu přibližně o jeden řád snížily (Obr. 5B, C). Na základě tohoto zjištění bylo do procesu přípravy vzorku zahrnuto rovněž propláchnutí headspace vialek argonem.

4.2.3. Validace metody a analýza reálných vzorků

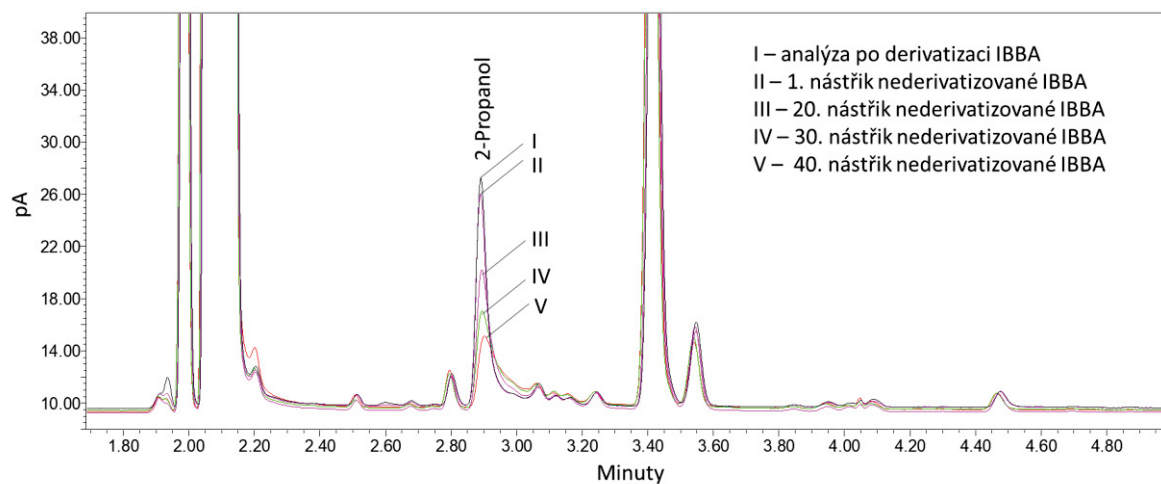
Navržená metoda byla validována a aplikována pro stanovení zbytkových rozpouštědel ve vzorcích IBBA určených k syntéze Bortezomibu. Validačním procesem bylo zjištěno, že použitá metoda je precizní, specifická, lineární a přesná v rozmezí 2-120 % ICH limitů (Tab. II). Při ověřování specificity byla v roztoku blanku prokázána přítomnost toluenu, avšak v množství pod hodnotou RL.

Rozlišení (R) mezi kritickými páry bylo vždy větší než 1,0 a to pro všechna rozpouštědla v chromatogramu z analýzy roztoku TSS. Hodnoty LOD se pro jednotlivá rozpouštědla pohybovaly v rozmezí 0,06-0,53 ppm, v případě LOQ pak v rozmezí 0,20-1,76 ppm. Vyjimku tvořil toluen, pro který byly stanoveny vyšší limity a to z důvodu jeho přítomnosti v blanku (LOD = 7,40 ppm; LOQ = 24,67 ppm). Přesnost vyjádřená odchylkou od linearit se pro všechna zbytková rozpouštědla pohybovala v rozmezí 101,5-103,7 %.

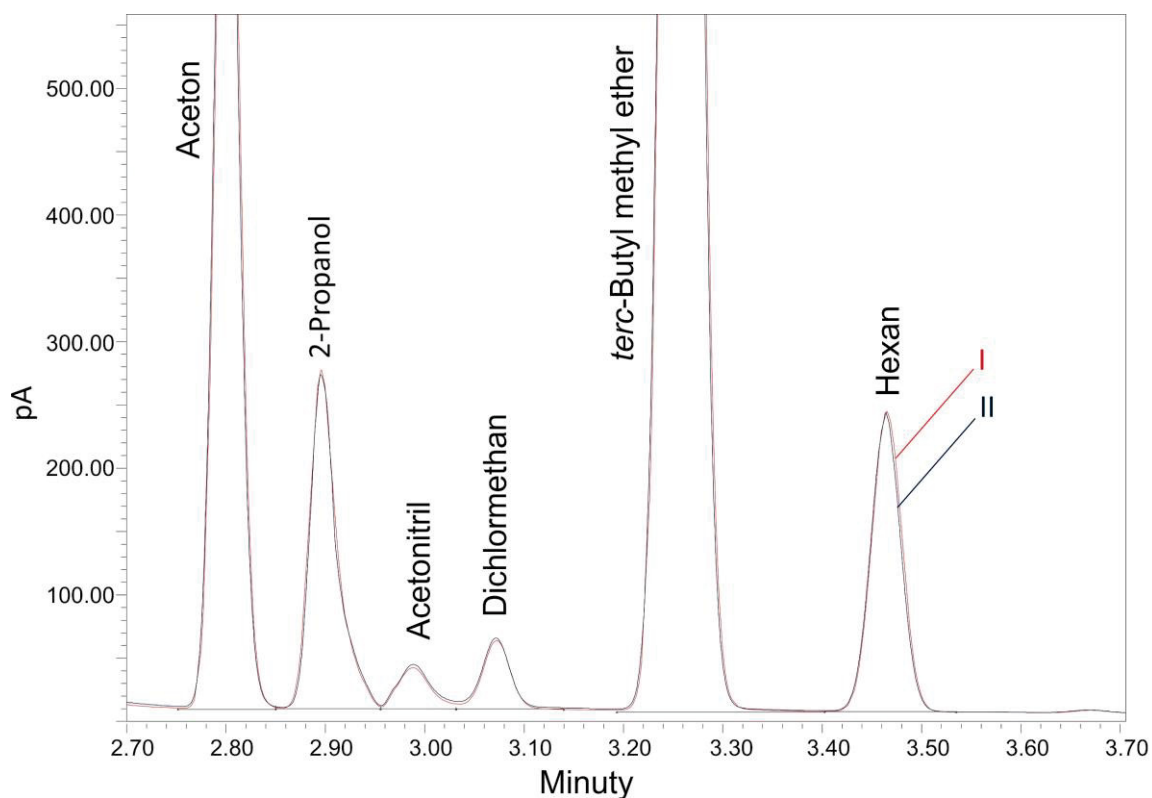
Chromatogramy odpovídající analýzám derivatizovaného vzorku IBBA na nové koloně, nederivatizovaného vzorku na nové koloně a nederivatizovaného vzorku na koloně se stacionární fází poškozenou dvaceti (třiceti, čtyřiceti) analýzami nederivatizované IBBA jsou znázorněny na Obr. 6. Pro srovnání chromatogramy získané z analýzy standardní směsi rozpouštědel na nové koloně a na téže koloně po 40 nástřicích derivatizované IBBA jsou uvedeny na Obr. 7. Z těchto výsledků je jasné patrná nízká výtěžnost polárních sloučenin po 20 analýzách nederivatizované IBBA (v případě 2-propanolu se jedná o výtěžnost 64 %) ve srovnání s prakticky neovlivněnými výsledky po 20 analýzách derivatizované IBBA (pro 2-propanol více než 99 %). Toto srovnání jednoznačně dokazuje pozitivní vliv maskovací derivatizace, která chrání analytickou kolonu, zlepšuje stabilitu systému a zajišťuje kvalitu dat při rutinních analýzách.

Tab. II: Souhrn výsledků získaných validací metody včetně jejich akceptačních kritérií.

Parametr	Akceptační kritérium	Výsledky z validace							
		MeOH	2-Propanol	<i>t</i> -BME	hexan	EtAc	THF	heptan	toluen
Koncentrační rozsah [ppm]	-	60 - 3600	100 - 6000	100 - 6000	5,8 - 348	50 - 3000	14,4 - 864	100 - 6000	17,8 - 1068
Linearita: - korelační koef. R^2 - úsek na ose y	$\geq 0,990$ $\leq 10,0\%$ na úrovni 100%	0,9998 0,38%	0,9999 0,13%	0,9999 < 0,01%	0,9996 0,08%	0,9996 0,06%	0,9996 0,18%	0,9996 0,10%	0,9999 0,36%
RL Preciznost: - opakovatelnost	RSD plochy, $\leq 10,0\%^*$ RSD ret. časů, $\leq 5,0\%$ průměrný S/N ≥ 10	1,2% < 0,1% 606	0,8% < 0,1% 909	0,7% < 0,1% 2020	0,7% < 0,1% 266	1,1% < 0,1% 279	1,4% < 0,1% 82	0,8% < 0,1% 3694	5,7% < 0,1% 307
Přesnost: - odchylka od linearity (max. hodnota) - průměrná výtěžnost (max. hodnota)	95,0 – 105,0%* 80,0 – 120,0%	102,7% 110,7%	102,3% 108,2%	101,7% 107,2%	102,8% 102,8%	101,5% 102,3%	102,5% 100,0%	103,1% 119,8%	103,7% 119,5%
LOD [ppm]	-	0,30	0,33	0,09	0,06	0,06	0,53	0,08	7,40
LOQ [ppm]	-	0,99	1,10	0,30	0,20	0,20	1,76	0,28	24,67



Obr. 6: Chromatogramy z analýzy derivatizovaného vzorku na nové koloně (I), nederivatizovaného vzorku na nové koloně (II) a nederivatizovaného vzorku na koloně poškozené 20 (30; 40) analýzami nederivatizované IBBA (III; IV; V).



Obr. 7: Chromatogramy z analýzy standardní směsi rozpouštědel na nové koloně (I) a na stejné koloně po 40 nástřicích derivatizovaného vzorku (II).

Z reálných vzorků byly analyzovány 4 různé šarže IBBA zakoupené od dvou různých dodavatelů. Naměřené výsledky týkající se obsahu zbytkových rozpouštědel v těchto šaržích jsou shrnuty v Tab. III.

Tab. III: Shrnutí výsledků z analýzy zbytkových rozpouštědel v různých šaržích IBBA.

Šarže č.	2-Propanol	t-BME	Hexan	Ethylacetát	THF
	(ppm)				
01	< RL	127	< RL	< RL	< RL
02	898	< RL	< RL	< RL	< RL
03	128	< RL	7,0	< RL	48
04	< RL	< RL	6,0	56	< RL

4.2.4. Závěr

Byla navržena, optimalizována a validována headspace GC-FID metoda pro stanovení zbytkových rozpouštědel v IBBA. Metoda využívá derivatizace IBBA činidlem DAN za vzniku stabilní a netěkavé sloučeniny, čímž je zabráněno přechodu IBBA do plynné headspace fáze. Díky tomu je chráněna stacionární fáze GC kolony před negativním působením IBBA. Tento koncept maskovací derivatizace otevírá nové možnosti při analýze stopových nečistot přítomných v přebytku vysoce reaktivních sloučenin.

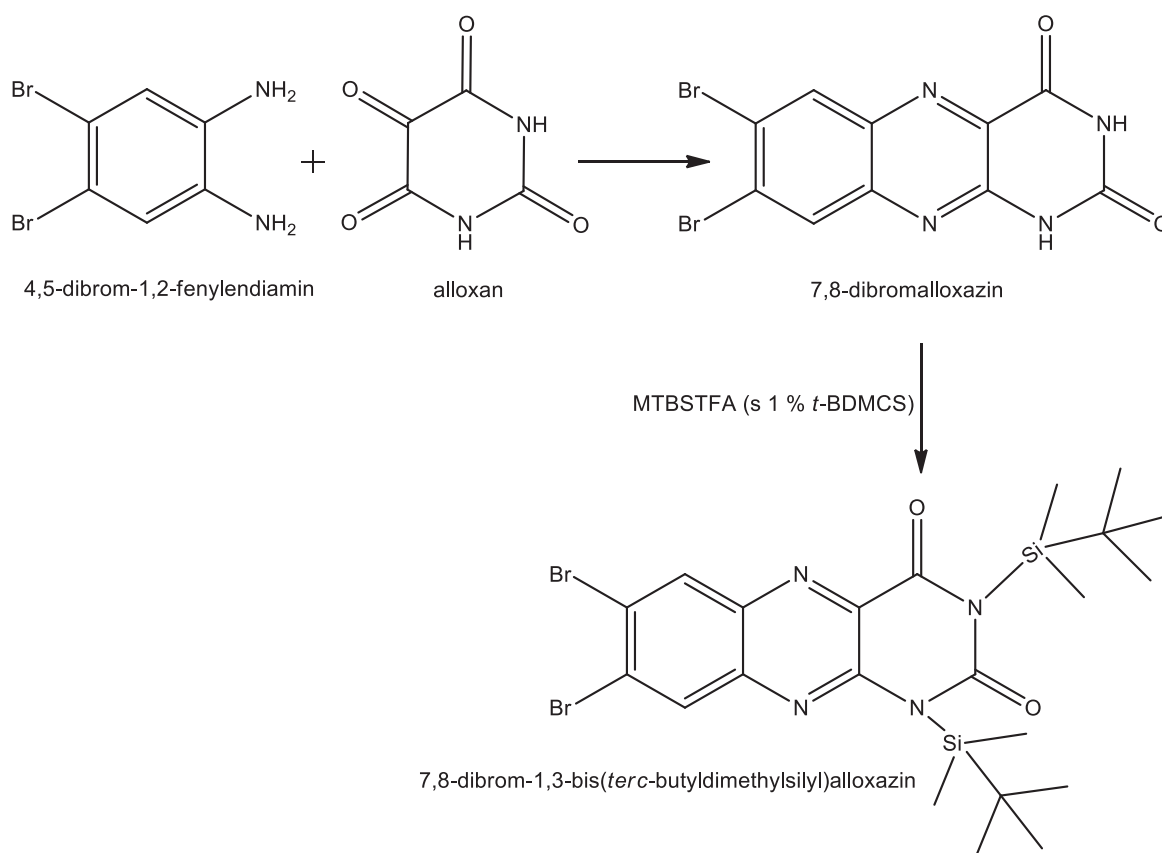
4.3. GC/MS metoda pro stanovení alloxanu a jeho rozkladných produktů v mouce

4.3.1. Vývoj derivatizační a chromatografické metody

Alloxan je analytem s nižší molekulovou hmotností, vykazující jak zvýšenou reaktivitu, tak také hydrofilitu. Aby bylo možné jej ze vzorku mouky/spikované mouky izolovat a následně pomocí GC/MS techniky stanovit, tak bylo nezbytné navrhnout vhodný derivatizační a prekoncentrační postup. Pro snížení polaritu a současně zvýšení stability alloxanu byla vyvinuta dvoukroková chemická derivatizace (Obr. 8). První derivatizační krok je založen na reakci alloxanu se 4,5-dibrom-1,2-fenylendiaminem. Kondenzační reakcí mezi aminoskupinami činidla a karbonylovými skupinami alloxanu vzniká 7,8-dibromalloxazin, derivát obsahující dvě vazby C=N. Tato reakce probíhá ve vodném prostředí za přítomnosti HCl jako katalyzátoru. Připravený derivát byl z reakční směsi izolován prostřednictvím extrakce tuhou fází za použití kolonek Oasis HLB, ze kterých byl následně eluován 2 ml směsí acetonitrilu a pyridinu. Po odpaření extraktu do sucha byl odparek rekonstituován v pyridinu. V rámci druhého derivatizačního kroku byl 7,8-dibromalloxazin silylován pomocí MTBSTFA s obsahem 1 % t-BDMCS za vzniku 7,8-dibrom-1,3-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)alloxazinu. Tato kombinace silylačních činidel ve srovnání s BSTFA prokázala vyšší účinnost silylace 7,8-dibromalloxazinu a rovněž i vyšší stabilitu a odolnost tohoto *tert*-butyldimethylsilyl derivátu proti vlhkosti [45].

V případě prvního derivatizačního kroku byl pro reakci s alloxanem testován 1,2-fenylendiamin a jeho halogenované formy 4-chlor-1,2-fenylendiamin, 4,5-dichlor-1,2-fenylendiamin, 4-brom-1,2-fenylendiamin a 4,5-dibrom-1,2-fenylendiamin. Všechna tato činidla prokázala schopnost reagovat s alloxanem za vzniku stabilního produktu extrahovatelného z reakční směsi. Hlavní nevýhodou reakce alloxanu se 4-chlor- respektive 4-brom- substituovaným 1,2-fenylendiaminem je tvorba dvou izomerů projevující se v chromatogramu přítomností dvou píků. Nejlepších výsledků bylo dosaženo se 4,5-dibrom-1,2-fenylendiaminem, který byl v souvislosti s derivatizací alloxanu použit vůbec poprvé. Toto činidlo efektivně reagovalo s alloxanem za vzniku jednotného produktu vykazujícího vyšší retenci na nepolární stacionární fázi, což umožnilo získat chromatogram s píkem jasně separovaným od matričních složek. Výhodnost této reakce je také dána symetrií molekul činidla i analytu. Tak jako v případě bromovaných derivátů akroleinu a akrylamidu, tak i zde

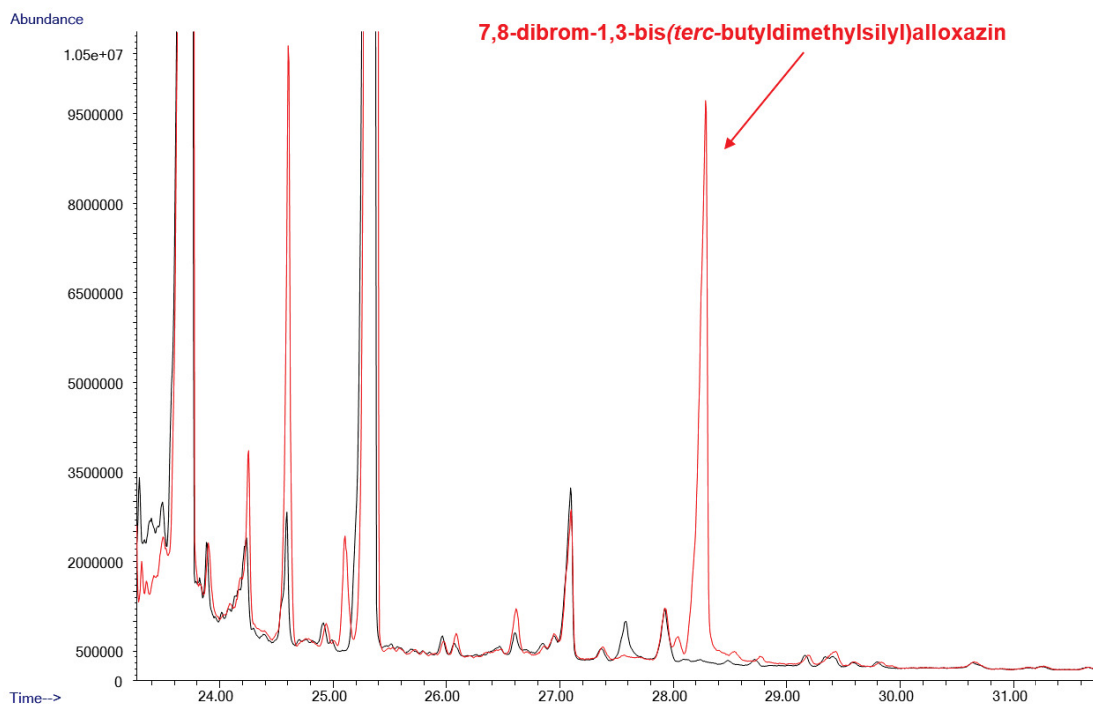
lze díky přítomnosti dvou atomů bromu v molekule derivátu pozorovat v naměřeném hmotnostním spektru charakteristický isotopický vzor (ionty 541, 543, 545 m/z).



Obr. 8: Schéma derivatizace alloxanu.

4.3.2. Analýza reálného vzorku mouky

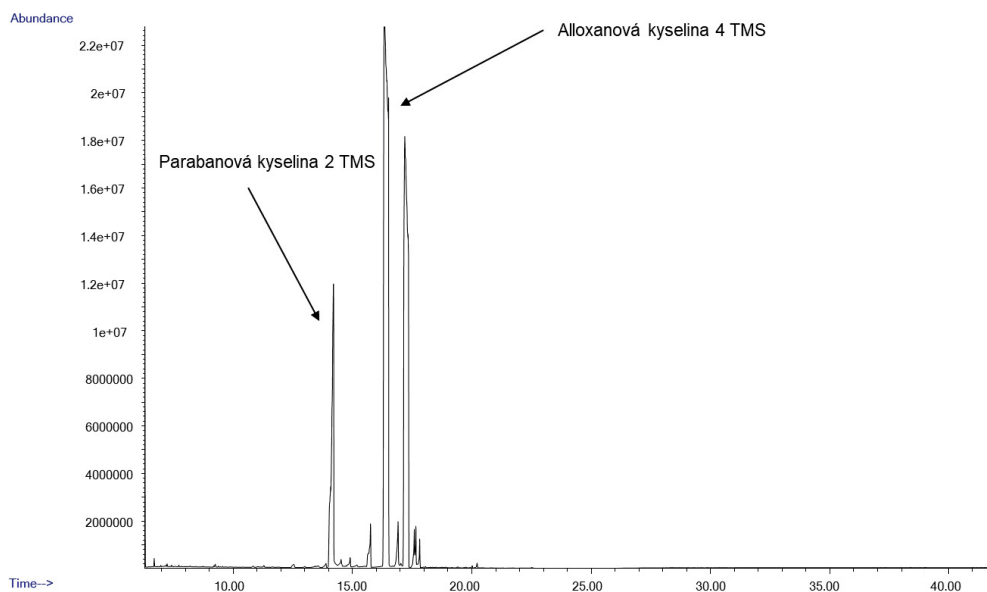
Výše popsaná metoda pro stanovení alloxanu byla aplikována na 3 reálné vzorky bělené mouky původem z USA a na 2 vzorky české nebělené mouky. Přítomnost alloxanu v žádném z testovaných vzorků nebyla prokázána, avšak funkčnost metody byla ověřena prostřednictvím vzorku mouky spikovaného alloxanem (Obr. 9) v koncentraci 10 µg/g. Podle dostupné literatury se předpokládá, že alloxan vzniká jako meziprodukt při bělení plynným chlorem [46]. U testovaných vzorků mouky nebyl znám způsob, jakým byly běleny, což může být jedním z důvodů, proč v nich nebyl alloxan detegován. Dalším důvodem může být zvýšená reaktivita alloxanu, čímž by se v mouce nemusel vyskytovat v nativní podobě, ale ve formě svých degradačních produktů.



Obr. 9: Překryv chromatogramů (TIC mód) z analýzy mouky nespikované (černá linie) a mouky spikované alloxanem (červená linie).

4.3.3. Identifikace degradačních produktů alloxanu a stanovení kyseliny parabanové a alloxanové v mouce

Na základě literární rešerše bylo zjištěno, že jedním z degradačních produktů alloxanu je kyselina alloxanová. Pro ověření tohoto tvrzení byl proveden experiment, kdy byl standard alloxanu, který má být z důvodu jeho nestability skladován v chladném a temném prostředí, ponechán po dobu 24 hodin při laboratorních podmínkách. Po silylaci a následné GC/MS analýze tohoto vzorku byla ze získaného chromatogramu (Obr. 10) a hmotnostních spekter kromě jiného potvrzena přítomnost kyseliny alloxanové a rovněž i kyseliny parabanové v podobě jejich TMS derivátů. Byly tedy provedeny experimenty zaměřené na přítomnost těchto dvou rozkladných produktů alloxanu v testovaných vzorcích mouky. Pro tento účel byl navržen jednoduchý postup zahrnující extrakci mouky methanolem, následovaný jeho odpařením a silylací odparku pomocí směsi pyridinu a BSTFA. Avšak ani prostřednictvím těchto experimentů nebyla v žádném z testovaných vzorků prokázána přítomnost rozkladných produktů alloxanu.



Obr. 10: Chromatogram z analýzy degradačních produktů alloxanu.

4.3.4. Závěr

Byla navržena a testována GC/MS metoda jak pro stanovení alloxanu, tak také metoda pro stanovení jeho degradačních produktů ve vzorcích bělené a nebělené mouky. Experimenty, které byly provedeny na standardu alloxanu, přispěly k identifikaci jeho dvou rozkladných produktů – kyseliny alloxanové a parabanové. Alloxan a jeho zmíněné rozkladné produkty však nebyly nalezeny v žádném z testovaných vzorků mouky.

5. ZÁVĚR

V souladu se stanovenými cíli byla v rámci této disertační práce studována problematika analýzy polárních látek prostřednictvím plynové chromatografie. Prvotní výzkum v této oblasti byl zaměřen na vývoj metody umožňující současné stanovení dvou nízkomolekulárních polárních analytů - akroleinu a akrylamidu v tabákovém kouři a kouři z elektronických cigaret. Navržená a optimalizovaná metoda zahrnuje chemickou derivatizaci obou analytů elementárním bromem, čímž bylo docíleno snížení jejich polarit, oba analyty byly snadněji izolovatelné od matrice a lépe detegovatelné díky charakteristickým fragmentům poskytovaným v hmotnostních spektrech. Metodou, jejíž spolehlivost byla ověřena validací, byl potvrzen relativně vysoký obsah obou analytů v tabákovém kouři. V případě elektronických cigaret, které jsou mnohými preferovány jako zdravější alternativa tabákových výrobků, byla detegována přítomnost akroleinu, jakožto degradačního produktu glycerolu, který je hlavní komponentou náplně používané v tomto zařízení.

V další fázi vědecko-výzkumné činnosti byla ve spolupráci s farmaceutickou společností Teva Czech Industries, s.r.o. vyvinuta GC-FID metoda se statickým headspace dávkováním vzorků určená ke stanovení zbytkových rozpouštědel v kyselině isobutylboronové. Jedná se o látku využívanou při syntéze protinádorového léčiva Bortezomibu, u které je nezbytné monitorovat obsah zbytkových rozpouštědel. Z důvodu zvýšené těkavosti a reaktivity IBBA docházelo při použití běžné headspace metody k poškození stacionární fáze již po několika analýzách. Takto poškozená GC kolona byla poté prakticky nepoužitelná pro další analýzy, především pak pro stanovení alkoholů. Navržená maskovací metoda využívá reakce IBBA s 1,8-diaminonafthalenem za vzniku stabilní a netěkavé sloučeniny, která zůstává v roztoku a nepřechází do plynné headspace fáze. Následné stanovení zbytkových rozpouštědel tak není ovlivněno interferencemi s reaktivní maticí. Metoda byla úspěšně validována podle směrnic ICH a mezinárodních lékopisů a je rutinně využívána.

Alloxan a jeho identifikované degradační produkty, kyseliny alloxanová a parabanová, jsou dalšími ze skupiny polárních látek, kterým byla v rámci této práce věnována pozornost. Alloxan, který pravděpodobně vzniká při procesu bělení mouky, je reaktivní látkou způsobující diabetes. Pro jeho stanovení v mouce byla navržena metoda zahrnující dvoustupňovou derivatizaci vedoucí k zisku stabilního a těkavého derivátu.

Z důvodu nízké stability alloxanu byla rovněž navržena metoda pro stanovení jeho degradačních produktů. Všechny zmíněné analyty se podařilo detegovat ve spikovaných vzorcích, avšak v reálných vzorcích bělené mouky nebyla jejich přítomnost potvrzena.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, *A new form of chromatogram employing two liquid phases. 1. A theory of chromatography, 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins*, Biochem. J., 35 (1941), 1358-1368.
- [2] A.T. James, A.J.P. Martin, *Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid*, Biochem. J., 50 (1952), 679-690.
- [3] H.M. McNair, J.M. Miller, *Basic Gas Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey 2009.
- [4] G.A. Eiceman, *Instrumentation of Gas Chromatography*, v knize Encyclopedia of Analytical Chemistry, Applications, Theory and Instrumentation, R. A. Meyers, John Wiley & Sons, Inc., Chichester 2007, str. 11340-11348.
- [5] R.L. Grob, E.F. Barry, *Modern Practice of Gas Chromatography 4th Ed.*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey 2004.
- [6] J. Drozd, J. Novák, *Chemical derivatization in gas chromatography*, Elsevier, Amsterdam 1981.
- [7] K. Blau, J.M. Halket, *Handbook of Derivatives for Chromatography*, 2nd Ed., John Wiley & Sons, Ltd., Chichester 1993.
- [8] Fluka Chemika, Silylating Agents.
https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Aldrich/General_Information/silylation_overview.pdf, staženo 10. prosince 2018.
- [9] S. Moldoveanu, V. David, *Modern Sample Preparation for Chromatography*, Elsevier, Amsterdam 2015.
- [10] N.D. Danielson, P.A. Gallagher, J.J. Bao, *Chemical Reagents and Derivatization Procedures in Drug Analysis*, v knize Encyclopedia of Analytical Chemistry, Applications, Theory and Instrumentation, R. A. Meyers, John Wiley & Sons, Inc., Chichester 2000, str. 7042-7076.

- [11] V. Zaikin, J.M. Halket, *A Handbook of Derivatives for Mass Spectrometry*, IM Publications LLP, Chichester 2009.
- [12] D.R. Knapp, *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*, John Wiley & Sons, Somerset, 1979.
- [13] P. Hušek, Derivatization, v knize *Encyclopedia of Separation Science*, I. Wilson, C. Poole, M. Cooke, Academic Press, 2000, str. 434-443.
- [14] Y. Zhang, Y. Ren, Y. Zhang, *New Research Developments on Acrylamide: Analytical Chemistry, Formation Mechanism, and Mitigation Recipes*, Chem. Rev. 109 (2009) 4375-4397.
- [15] L. Jiang, J. Cao, Y. An, C. Geng, S. Qu, L. Jiang, L. Zhong, *Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells*, Toxicol. In Vitro 21 (2007) 1486-1492.
- [16] D.S. Mottram, B.L. Wedzicha, A.T. Dodson, *Acrylamide is formed in the Maillard reaction*, Nature 419 (2002) 448-449.
- [17] E. Tareke, P. Rydberg, P. Karlsson, S. Eriksson, M. Tornqvist, *Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs*, J. Agr. Food Chem. 50 (2002) 4998-5006.
- [18] J. Diekmann, A. Wittig, R. Stabbert, *Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of Acrylamide and Acetamide in Cigarette Mainstream Smoke after On-Column Injection*, J. Chromatograph. Sci. 46 (2008) 659-663.
- [19] R. Papoušek, P. Nováková, E. Marková, P. Barták, *Analýza akrylamidu metodou GC-MS*, Chem. Listy 107 (2013) 255-260.
- [20] V.M. Osorio, Z.L. Cardeal, *Determination of acrolein in french fries by solid-phase microextraction gas chromatography and mass spectrometry*, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 3332-3336.
- [21] H.H. Lim, H.S. Shin, *Simple Determination of Acrolein in Surface and Drinking Water by Headspace SPME GC-MS*, Chromatographia 75 (2012) 943-948.
- [22] S.L. Macallister, N. Martin-Brisac, V. Lau, K. Yang, P.J. O'Brien, *Acrolein and chloroacetaldehyde: an examination of the cell and cell-free biomarkers of toxicity*, Chem Biol Interact. 202 (2013) 259-266.

- [23] Y. Endo, C. Hayashi, T. Yamanaka, K. Takayose, M. Yamaoka, T. Tsuno, S. Nakajima, *Linolenic acid as the main source of acrolein formed during heating of vegetable oils*, J. Am. Oil Chem. Soc. 90 (2013) 959-964.
- [24] S.A. Steinmetz, J.S. Herrington, C.K. Winterrowd, W.L. Roberts, J.O.L. Wendt, W.P. Linak, *Crude glycerol combustion: Particulate, acrolein, and other volatile organic emissions*, Proc. Combust. Inst. 34 (2013) 2749-2757.
- [25] W. Buhler, E. Dinjus, H.J. Ederer, A. Kruse, C. Mas, *Ionic reactions and pyrolysis of glycerol as competing reaction pathway in near- and supercritical water*, J. Supercrit. Fluids 22 (2002) 37-53.
- [26] M. Watanabe, T. Iida, Y. Aizawa, T.M. Aida, H. Inomata, *Acrolein synthesis from glycerol in hot-compressed water*, Bioresource Technol. 98 (2007) 1285-1290.
- [27] R. Papoušek, Z. Pataj, P. Nováková, K. Lemr, P. Barták, *Determination of Acrylamide and Acrolein in Smoke from Tobacco and E-Cigarettes*, Chromatographia 77 (2014) 1145–1151.
- [28] P. Kolář, J.W. Shen, A. Tsuboi, T. Ishikawa, *Solvent selection for pharmaceuticals*, Fluid Phase Equilib. 194-197 (2002) 771-782.
- [29] C. Camarasu, C. Madichie, R. Williams, *Recent progress in the determination of volatile impurities in pharmaceuticals*, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 768-777.
- [30] European Pharmacopoeia 7.0, 2.4.24 Identification and control of residual solvents. Strasbourg 2008.
- [31] XXXI USP, <467> General Chapter, Organic Volatile Impurities. Rockville 2007.
- [32] R. Papoušek, S. Žák, P. Štverka, A. Gavenda, L. Borovcová, P. Barták, *Determination of Residual Solvents in Isobutylboronic Acid: Masking Derivatization Improves Stability of GC Column*, J. Sep. Sci., (2019), DOI:10.1002/jssc.201800968.
- [33] T. Szkudelski, *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas*, Physiol. Res. 50 (2001) 536-546.
- [34] R.M. Archibald, *Methods for the determination of alloxan together with observations of certain properties of alloxan*, J. Biol. Chem. 158 (1945) 347-373.
- [35] R. Gortner, J. Am. Chem. Soc. 33 (1911) 85-85.

- [36] The Little-Known Secrets about Bleached Flour...
<http://articles.mercola.com/sites/articles/archive/2009/03/26/The-Little-Known-Secrets-about-Bleached-Flour.aspx>, staženo 26. března 2016.
- [37] A.C. Raghavamenon, C.L. Dupard-Julien, B. Kandlakunta, R.M. Uppu, *Determination of alloxan by fluorometric high-performance liquid chromatography*, Toxicol. Mech. Methods 19 (2009) 498-502.
- [38] O. Geiss, D. Kotzias, Tobacco, cigarettes and cigarette smoke: an overview. European Commission, Institute for Health and Consumer Protection, Ispra, 2007.
- [39] A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop, *Clarke's analysis of drugs and poisons*, 4th Edition. Pharmaceutical Press, London 2011.
- [40] F.A. Carey, R.J. Sundberg, *Advanced Organic Chemistry*, 5th Edition, Springer, New York 2008.
- [41] J.G. Smith, *Organic Chemistry*, 3rd Edition, McGraw-Hill, New York 2010.
- [42] J. McMurray, *Organic Chemistry*, 7th Edition, Thomson, Belmont 2008.
- [43] A. Hashimoto, *Improved method for the determination of acrylamide monomer in water by means of gas-liquid chromatography with an electron-capture detector*, Analyst 101 (1976) 932-938.
- [44] C. H. Zhou, H. Zhao, D. S. Tong, L. M. Wu and W. H. Yu, *Recent Advances in Catalytic Conversion of Glycerol*, Catal. Rev. Sci. Eng., 2013, 55, 369-453.
- [45] C. Schummer, O. Delhomme, B.M.R. Appenzeller, R. Wennig, M. Millet, *Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis*, Talanta 77 (2009) 1473-1482.
- [46] S. Cohen, *Diabetes without Drugs*, Rodale Inc., USA 2010.

ŽIVOTOPIS

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno: Roman Papoušek
Adresa: Opavská 13, 748 01 Hlučín
Email: roman.papousek@hotmail.com

VZDĚLÁNÍ

- **09/2012 – současnost**

Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, PhD studium oboru Analytická chemie

Disertační práce: Analýza polárních látek plynovou chromatografií

- **2010 – 06/2012**

Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, magisterský navazující obor Analytická chemie, obdržel titul Mgr.

Diplomová práce: Analýza akrylamidu metodou GC/MS

V rámci tohoto studijního oboru získáno osvědčení o absolvování rozšiřujícího studijního modulu „Analytická chemie ve forenzních vědách“.

- **2007 – 2010**

Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální chemie, bakalářský obor Ekochemie, obdržel titul Bc.

PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI

- **02/2018 – současnost**

HPST s.r.o., Praha

Servisní inženýr analytické instrumentace (GC, GC/MS) Agilent Technologies, Inc.

- **10/2016 – 01/2018**

Teva Czech Industries s.r.o., Opava

Výzkumný a vývojový analytik (laboratoř GC, oddělení R&D)

STÁŽE

- **10/2014 – 12/2014**

University of Vienna, Rakousko

Hmotnostně spektrometrická analýza *O*-glykanů (pod vedením prof. Andrease Rizziho).

- **07/2014**

University of Szeged, Maďarsko

HPLC enantioseparace beta3-aminokyselin na zwitterionických stacionárních fázích (pod vedením prof. Antala Pétera).

- **03/2014 – 06/2014**

University of Tasmania, Hobart, Austrálie

Vývoj analytické metody pro identifikaci složek esenciálních olejů pomocí 2-D GC-MS/NMR systému (pod vedením Assoc/Prof Roberta Shellieho).

PROJEKTY

- IGA_PrF_2015_020 Matricový efekt a jeho potlačení při analýze vzorků (člen týmu)
- CZ.1.07/2.2.00/28.0029 Modulární výuka jako nástroj odezvy vzdělávacího systému na potřeby praxe (člen týmu)
- IGA_PrF_2014_031 Matricový efekt a jeho vliv na výtěžnost analytického postupu (člen týmu)
- IGA PrF_2013_030 Úprava vzorku při analýze složitých matric (člen týmu)
- IGA PrF_2012_020 Selektivita a analýza složitých matric (člen týmu)

PEDAGOGICKÁ ČINNOST

- ZS 2015/2016 ACH/APACHC (Cvičení z aplikované analytické chemie - blokově)
- LS 2014/2015 ACH/PAC (Pokročilá analytická chemie – 2 x 7 hod./týden)
- ZS 2014/2015 ACH/APACHC (Cvičení z aplikované analytické chemie - blokově)
- ZS 2013/2014 ACH/APACHC (Cvičení z aplikované analytické chemie - blokově)
- LS 2012/2013 ACH/PAC (Pokročilá analytická chemie - 7 hod./týden)

- ZS 2012/2013 ACH/APACHC (Cvičení z aplikované analytické chemie - blokově)
- Oponent bakalářské práce Edity Zatloukalové na téma: „Vysokotlaké extrakce máty peprné“ – úspěšně obhájeno květen 2016.
- Konzultant diplomové práce Bc. Zuzany Ropkové na téma: „Analýza syntetických analogů pižma plynovou chromatografií“ – úspěšně obhájeno květen 2014.

PUBLIKACE

- **Papoušek R.**, Žák S., Štverka P., Gavenda A., Borovcová L., Barták P., *Determination of Residual Solvents in Isobutylboronic Acid: Masking Derivatization Improves Stability of GC Column*, J. Sep. Sci., (2019) – v tisku
DOI: 10.1002/jssc.201800968
- Skopalová J., Barták P., Bednář P., Tomková H., Ingr T., Lorencová I., Kučerová P., **Papoušek R.**, Borovcová L., Lemr K., *Carbon fiber brush electrode as a novel substrate for atmospheric solids analysis probe (ASAP) mass spectrometry: Electrochemical oxidation of brominated phenols*, Anal. Chim. Acta 999 (2018) 60-68.
- Kučera L., **Papoušek R.**, Kurka O., Barták P., Bednář P., *Study of composition of espresso coffee prepared from various roast degrees of Coffea arabica L. coffee beans*, Food Chem. 199 (2016) 727-735.
- Ilisz I., Grecsó N., **Papoušek R.**, Pataj Z., Barták P., Lázár L., Fülöp F., Lindner W., Péter A., *High-performance liquid chromatographic separation of unusual β 3-amino acid enantiomers in different chromatographic modes on Cinchona alkaloid-based zwitterionic chiral stationary phases*, Amino Acids 47 (2015) 2279-2291.
- **Papoušek R.**, Pataj Z., Nováková P., Lemr K., Barták P., *Determination of Acrylamide and Acrolein in Smoke from Tobacco and E-Cigarettes*, Chromatographia 77 (2014) 1145-1151.
- **Papoušek R.**, Nováková P., Marková E., Barták P. *Analýza akrylamidu metodou GC-MS*, Chem. Listy 107 (2013) 255-260.

KONFERENCE

- Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2016 (Olomouc).
Prezentovaný poster:

Papoušek R., Borovcová L., Táborský J., Skopalová J., Barták P.: *Determination of alloxan and products of its decomposition by GC/MS*. Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2016, Olomouc, June 6-9, 2016. Book of abstracts and program, p. 133-134. ISBN 978-80-244-4961-6.

- Analytical Methods and Human Health (Patince, Slovakia). Prezentovaný poster:
Papoušek R., Borovcová L., Petr J., Barták P.: *Analysis of Alloxan by GC/MS*. Analytical Methods and Human Health, Patince, Slovakia, June 15 - 18, 2015. Conference Proceedings p. 249. ISBN 978-80-971179-5-5.
- Konference projektu MOSYP (Branná, ČR). Přednesený příspěvek:
Papoušek R., Deans B., Shellie R.: *Heart-Cutting 2-D GC-MS/NMR System for Essential Oil Components Identification*. Conference of the project CZ.1.07/2.2.00/28.0029 „Modular education as a tool that enables the educational system to respond to needs of practice“ from the Education for Competitiveness Operational Programme, Branná, Czech Republic, September 24 - 26, 2014.
- Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2014 (Olomouc). Prezentovaný poster:
Papoušek R., Ropková Z., Pataj Z., Bednář P., Barták P.: *Analysis of Synthetic Musk Compounds by GC/MS using HS-SPME and SPE Techniques*. Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2014, Olomouc, February 10-14, 2014. Book of abstracts and program. Acta Univ. Palacki Olomuc., Fac. Rerum Natur., Chemica 51S, p. 171-172. Palacky University, Olomouc 2014. ISBN 978-80-244-3950-1, ISSN 0232-0061.
- XXXVI. Kémiai Előadói Napok (Szeged, Hungary). Přednesený příspěvek:
Papoušek R., Pataj Z., Nováková P., Barták P.: *Acrylamide and Acrolein Analysis – From Tobacco Smoke to E-smoke*. XXXVI. Kémiai Előadói Napok, Szeged, Hungary, October 28-30, 2013. Program and book of abstracts, p. 47, ISBN 978-963-315-145-7.

- 9th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods (Siófok, Hungary). Prezentovaný poster:
Papoušek, R., Pataj, Z., Nováková, P., Barták, P.: *Tobacco and E-smoke – GC/MS Approach II. Derivatization Techniques: Acrylamide Determination in Smoke*. 9th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok, Hungary, September 4-6, 2013. Book of Abstracts, p. 75, ISBN 978-963-89335-2-2.
- Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2012 (Olomouc). Prezentovaný poster:
R. Papoušek, P. Nováková, P. Bednář, P. Barták: *GC/MS analysis of acrylamide in foods*. Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2012, Olomouc, June 11th-14th, 2012. Book of abstracts and program. Acta Univ. Palacki Olomuc., Fac. Rerum Natur., Chemica 50S, p.134-135. Palacky University, Olomouc 2012. ISBN 978-80-244-3115-4, ISSN 0232-0061.

DALŠÍ AKTIVITY

- Asistenční činnost při organizaci exkurzí škol a popularizačních akcí.
- Diskuze ve vysílání Českého rozhlasu Olomouc na téma výroby ovocných destilátů a bezpečnosti lihovin (19. září 2014).
- Vývoj metody pro analýzu léčiv v odpadních a povrchových vodách pro firmu Litolab (výzkumná zpráva).
- Analýzy methanolu v lihovinách a destilátech – měření pro veřejnost v rámci methanolové aféry (2012-2013).