

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko–technologická

Katedra analytické chemie

HPLC a stanovení aminů

Bc. Ondřej Peterka

Diplomová práce

2017

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology  
Department of Analytical Chemistry

HPLC and Determination of Amines

Bc. Ondřej Peterka

Thesis

2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Ondřej Peterka**  
Osobní číslo: **C15586**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Název tématu: **HPLC a stanovení aminů**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. Provedte literární rešerši zaměřenou na stanovení aminů pomocí kapalinové chromatografie. Zaměřte se na využití derivatizace pro fluorescenční analýzu.
2. V experimentální části připravte metodu pro derivatizace aminů pro fluorescenční detekci ve spojení s kapalinovou chromatografií. Naleznete vhodné podmínky pro jejich stanovení pomocí HPLC. Vypracovanou metodu ověřte na reálných vzorcích.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Aleš Eisner, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce:

**doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Ostatní konzultanti:

**Ing. Silvie Surmová**

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

**20. února 2017**

Termín odevzdání diplomové práce:

**12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2017

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

Ondřej Peterka

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu své diplomové práce Ing. Alešovi Eisnerovi, Ph.D. a konzultantce doc. Ing. Petře Bajerové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky v průběhu celé práce. Zvláštní poděkování patří celé mé rodině, zejména rodičům, za trpělivost a podporu poskytovanou během celého studia.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce se zabývá stanovením aminů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí. Teoretická část se zabývá popisem aminů, kapalinové chromatografie, derivatizace a příklady stanovení aminů. Experimentální část popisuje výběr vhodných derivatizačních činidel pro stanovení vybraných aminů.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

aminosloučeniny, kapalinová chromatografie, fluorescence, derivatizace, extrakce, výbušniny

## **ANNOTATION**

This thesis deals with determination of amines by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. The theoretical part deals with the description of amines, liquid chromatography, derivatization and examples of the determination of amino compounds. The experimental part describes selection of suitable derivatizing agents for the determination of selected amines.

## **KEYWORDS**

amino compounds, liquid chromatography, fluorescence, derivatization, extraction, explosive

# OBSAH

ÚVOD .....	14
1 Aminy .....	15
1.1 Využití .....	16
1.2 Toxikologické účinky .....	17
2 Kapalinová chromatografie .....	19
2.1 Instrumentace .....	19
2.1.1 Mobilní fáze .....	20
2.1.2 Čerpadlo .....	20
2.1.3 Dávkovací ventil .....	21
2.1.4 Kolona .....	21
2.1.4.1 Monolitické kolony .....	21
2.1.4.2 Náplňové kolony .....	22
2.1.5 Detektory .....	22
2.1.5.1 Fluorescenční detektor .....	23
2.1.6 Vyhodnocení .....	24
2.2 Derivatizace .....	24
2.2.1 Předkolonová derivatizace .....	25
2.2.2 Postkolonová derivatizace .....	25
2.2.3 Derivatizační činidla .....	26
2.2.3.1 Činidlo dansyl chlorid .....	26
2.2.3.2 Činidlo <i>o</i> -ftaldialdehyd .....	27
2.2.3.3 Činidlo 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčan .....	28
2.2.3.4 Činidlo 4-chlor-7-nitrobenz-2,1,3-oxadiazol .....	29
2.2.3.5 Činidlo fluorescamin .....	30
2.2.3.6 Činidlo 6-aminochinolin- <i>N</i> -hydroxysukcinimidylkarbamát .....	30
3 Rešersní část .....	32
3.1 Využití dansyl chloridu .....	32



3.2	Využití 4–chlor–7–nitrobenz–2,1,3–oxadiazolu.....	34
3.3	Využití 4–fluor–7–nitrobenz–2,1,3–oxadiazolu .....	36
3.4	Využití 9–(fluorenyl)ethylchloromravenčanu .....	37
3.5	Využití 6–aminochinolin–N–hydroxysukcinimidylkarbamátu .....	39
4	Experimentální část .....	46
4.1	Použité chemikálie .....	46
4.2	Použité přístroje a zařízení .....	47
4.3	Příprava roztoků .....	47
4.4	Metoda pro 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčan.....	48
4.4.1	Optimalizace metody 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčan .....	48
4.4.2	Kalibrace metody .....	52
4.5	Metoda pro dansyl chlorid .....	53
4.5.1	Optimalizace metody .....	54
4.5.2	Kalibrace metody .....	57
4.6	Metoda pro 4–chlor–7–nitrobenz–2,1,3–oxadiazol .....	58
4.6.1	Optimalizace metody .....	58
4.6.2	Kalibrace metody .....	62
4.7	Shrnutí metod .....	63
4.8	Kvalitativní stanovení vybraných aminů .....	64
4.9	Extrakce .....	66
4.10	Reálné vzorky .....	69
5	ZÁVĚR.....	72
6	POUŽITÁ LITERATURA.....	73
7	PŘÍLOHY .....	84

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Obecné struktury aminů .....	15
Obrázek 2: Využití aminů v průmyslu .....	16
Obrázek 3: Schéma kapalinového chromatografu .....	19
Obrázek 4: Schéma fluorescenčního detektoru .....	23
Obrázek 5: Reakce DNS-Cl se sekundárním aminem .....	27
Obrázek 6: Reakce OPA s primárním aminem .....	28
Obrázek 7: Reakce FMOC-Cl se sekundárním aminem .....	28
Obrázek 8: Reakce NBD-Cl se sekundárním aminem .....	29
Obrázek 9 Reakce fluorescaminu s primárním aminem .....	30
Obrázek 10: Reakce AQC s primárním aminem .....	31
Obrázek 11: Chromatogram slepého pokusu FMOC-Cl .....	49
Obrázek 12: Chromatogram DMA-FMOC (koncentrace DMA $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) .....	49
Obrázek 13: Chromatogram slepého pokusu DNS-Cl.....	54
Obrázek 14: Chromatogram DMA-DNS (koncentrace DMA $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l).....	55
Obrázek 15: Chromatogram slepého pokusu NBD-Cl .....	59
Obrázek 16: Chromatogram DMA-NBD (koncentrace DMA $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) .....	59
Obrázek 17: Chromatogram směsi aminů stanovené metodou DNS-Cl .....	65
Obrázek 18: Chromatogram směsi aminů stanovené metodou NBD-Cl.....	65
Obrázek 19: Porovnání chromatogramů metody DNS-Cl s vodou jako extrakčním činidlem	67
Obrázek 20: Porovnání chromatogramů metody NBD-Cl s vodou jako extrakčním činidlem	68
Obrázek 21: Odpaliště .....	70
Obrázek 22: Nerezový plech po detonaci .....	71
Tabulka 1: Pufry pro RP-LC .....	20
Tabulka 2: Srovnání detektorů .....	23
Tabulka 3: Shrnutí řešeršní části.....	41
Tabulka 4: Vliv extrakčního činidla na plochu píku.....	50
Tabulka 5: Porovnání metod.....	64
Tabulka 6: Limity detekce jednotlivých aminů ve směsi .....	66
Tabulka 7: Výtěžnosti extrakcí u metody DNS-Cl.....	67
Tabulka 8: Výtěžnost extrakcí u metody NBD-Cl.....	68
Tabulka 9: Výtěžky extrakcí do vody jednotlivých aminů.....	69

Tabulka 10: Identifikace aminů po detonaci.....	70
Graf 1: Vliv množství FMOC-Cl na plochu píku DMA-FMOC .....	51
Graf 2: Vliv množství pentanu na plochu píku DMA-FMOC.....	52
Graf 3: Kalibrační závislost DMA-FMOC .....	53
Graf 4: Vliv množství DNS-Cl na plochu píku DMA-DNS.....	55
Graf 5: Vliv teploty na plochu píku DMA-DNS .....	56
Graf 6: Vliv reakční doby na plochu píku DMA-DNS.....	57
Graf 7: Kalibrační závislost DMA-DNS .....	58
Graf 8: Vliv množství NBD-Cl na plochu píku DMA-NBD.....	60
Graf 9: Vliv teploty na plochu píku DMA-NBD .....	61
Graf 10: Vliv reakčního času na plochu píku DMA-NBD .....	62
Graf 11: Kalibrační závislost DMA-NBD .....	63
Příloha 1: Excitační spektrum pro DMA-DNS .....	84
Příloha 2: Emisní spektrum DMA-DNS .....	84
Příloha 3: Excitační spektrum DMA-NBD.....	85
Příloha 4: Emisní spektrum DMA-NBD .....	85
Příloha 5: Výsledky statistického testu .....	86
Příloha 6: Eluční časy derivátů s DNS-Cl a NBD-Cl .....	86
Příloha 7: Deformace píku při extrakci metanolem.....	86

## SEZNAM ZKRATEK

<b>AQC</b>	6-aminochinolin- <i>N</i> -hydroxysukcinimidylkarbamát
<b>BUT</b>	Butylamin
<b>C18</b>	Oktadecylsilikagel
<b>CYK</b>	Cyklohexylamin
<b>DEA</b>	Diethylamin
<b>DETA</b>	Diethanolamin
<b>DMA</b>	Dimethylamin
<b>DMA-DNS</b>	Derivát dimethylaminu s dansyl chloridem
<b>DMA-FMOC</b>	Derivát dimethylaminu s 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčanem
<b>DMA-NBD</b>	Derivát dimethylaminu s 4-chlor-7-nitrobenz-2,1,3-oxadiazolem
<b>DNS-Cl</b>	Dansyl chlorid
<b>EDA</b>	Ethylendiamin
<b>FLD</b>	Fluorescenční detektor
<b>FMOC-Cl</b>	9-(fluorenyl)ethylchloromravenčan
<b>FMOC-OH</b>	Kyselina 9-(fluorenyl)ethylmravenčí
<b>GC</b>	Plynová chromatografie
<b>iBUT</b>	Isobutylamin
<b>iPROP</b>	Isopropylamin
<b>LC</b>	Kapalinová chromatografie
<b>NA</b>	Nedekovaný amin
<b>NBD-F</b>	4-fluor-7-nitrobenz-2,1,3-oxadiazol
<b>NBD-Cl</b>	4-chlor-7-nitrobenz-2,1,3-oxadiazol
<b>PROP</b>	Propylamin
<b>PYR</b>	Pyridin
<b>RP-LC</b>	Kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
<b>LC-IR</b>	Kapalinová chromatografie spojená s infračervenou spektrometrií
<b>LC-MS</b>	Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
<b>LC-NMR</b>	Kapalinová chromatografie spojená s nukleární magnetickou rezonancí
<b>LOD</b>	Limit detekce
<b>LOQ</b>	Limit kvantifikace
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>MORF</b>	Morfolin

<b>OPA</b>	<i>o</i> -ftaldialdehyd
<b>SAX</b>	saxagliptin
<b><i>sec</i>-BUT</b>	<i>sec</i> -butylamin
<b>TEA</b>	Triethylamin
<b>TETA</b>	Triethanolamin
<b><i>terc</i>-BUT</b>	<i>terc</i> -butylamin
<b>TLC</b>	Tenkovrstvá chromatografie
<b>VIL</b>	vildagliptin

## ÚVOD

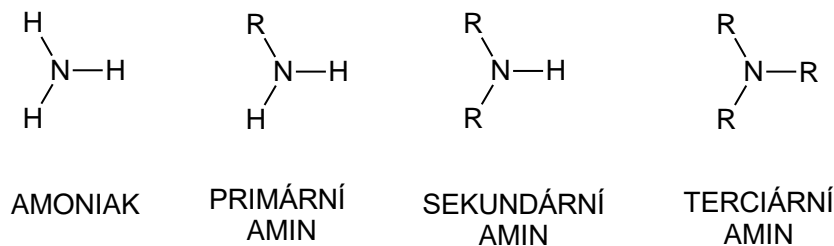
Aminosloučeniny jsou rozmanitou skupinou látek, které se hojně vyskytují v biologických materiálech a jsou také důležité pro průmysl. Ve vyšších koncentracích jsou však pro zdraví člověka nebezpečné, proto je nezbytné monitorovat jejich množství. Aminosloučeniny mohou být také součástí výbušnin, proto je důležitá jejich analýza po výbuchu pro popis použité výbušniny.

Pro citlivé a selektivní stanovení aminů byla zvolena kapalinová chromatografie s fluorescenčním detektorem. Jelikož většina aminů nevykazuje fluorescenční záření, bylo nutné nalézt vhodné derivatizační činidlo. Po výběru činidel byla provedena optimalizace metod. Vybranými metodami byly stanoveny aminy, které mohou být použité jako senzibilizátory výbušnin. Protože jsou stopy po výbuchu nejčastěji zajišťovány pomocí stěrů, bylo nutné vyvinout vyhovující extrakční metodu. Důležitá byla volba extrakčního činidla a druh extrakce. K zhodnocení vyvinuté metody sloužilo použití na reálné vzorky.

# 1 Aminy

Aminy jsou dusíkaté organické látky odvozené od amoniaku, které se vyskytují nejen v přírodě, ale jsou i hojně vyráběny synteticky. V přírodě jsou aminy součástí rostlin (alkaloidy, nikotin, kokain, apod.) i živých organismů (aminokyseliny, katecholaminy, neurotransmitery, aj). Z biologických materiálů jsou aminy uvolňovány zpět do přírody rozkladnými procesy. Aminy jsou pro existenci rostlin a živočichů nezbytné, ale u vysokých koncentracích jsou naopak pro organismy škodlivé. Průmyslové využití aminů je velmi významné, proto bude tomuto tématu věnována samostatná kapitola <sup>[1,2,3]</sup>.

Jelikož jsou aminy velmi rozmanitou skupinou látek, lze v publikacích nalézt dělení podle různých vlastností. Z důvodu velkého množství možností bude v této práci uveden pouze výčet nejvýznamnějšího dělení. Asi nejznámější rozdělení je podle vázané organické části na alifatické a aromatické aminy. Alifatické aminy obsahují na dusíku pouze uhlíkatý řetězec, zatímco aromatické mají vázanou jednu nebo více aromatických jader. Zvláštní skupinou jsou heterocyklické aminy, které mají jeden či více atomů dusíku uzavřený v kruhu. Tento kruh může být nasycený nebo nenasycený, přičemž konjugací dvojných vazeb a volných elektronových párů vzniká aromatický cyklus. Alifatické aminy lze dále dělit podle délky alkylové řetězce na nižší alifatické aminy a aminy s dlouhým řetězcem, obecně označované jako mastné aminy. Nižší aminy obsahují maximálně šest uhlíků v řetězci, oproti mastným aminům disponující více než osmi uhlíky. Asi nejvýznamnější dělení je podle počtu nahrazených vodíků na primární, sekundární a terciární aminy, jejichž obecné struktury jsou znázorněné na obrázku 1. Další způsob rozdělení je podle množství primárních aminových skupin na monoaminy (jedna aminová skupina), diaminy (dvě aminové skupiny) a polyaminy (tři a více aminových skupin) <sup>[1,2,3,4]</sup>.

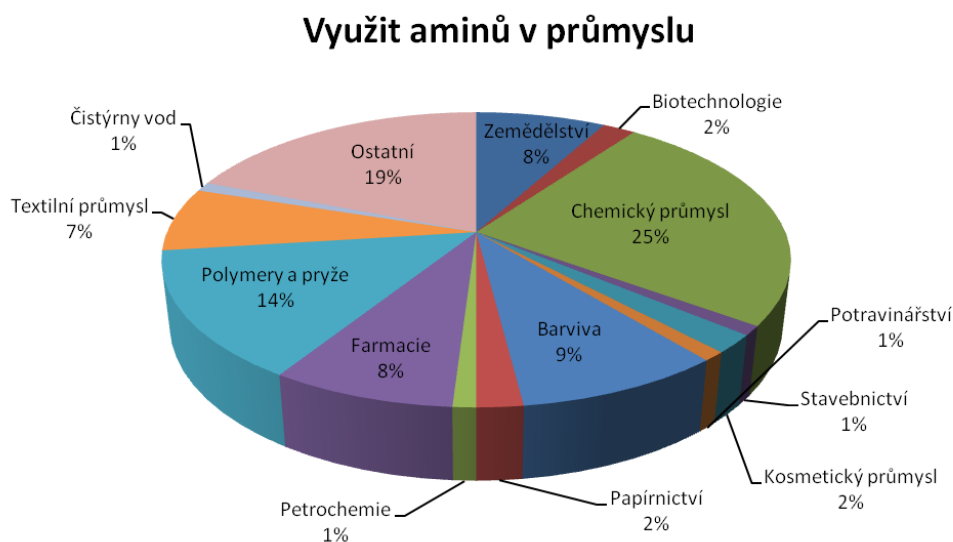


Obrázek 1: Obecné struktury aminů <sup>[2]</sup>

Aminy jsou látky bazického charakteru s typickým amoniakálním zápachem, který se s vzrůstající molární hmotností vytrácí. Molární hmotnost má také výrazný vliv na skupenství. Nízkomolekulární aminy jsou plynné, zatímco aminy s vyšší molekulovou hmotností jsou kapalné či tuhé. Hustota aminů se liší v závislosti na struktuře. Alifatické aminy disponují nižší hustotou než voda, oproti aromatickým nabývají mírně vyšších hodnot než  $1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Polární charakter umožňuje rozpustnost aminů ve vodě, alkoholu, etheru či jiných organických polárních rozpouštědlech. Z bezpečnostního hlediska jsou tyto látky řazeny do hořlavin vyznačující se nízkým bodem vzplanutí a ve směsi se vzduchem tvoří výbušnou směs. [4,5,6].

## 1.1 Využití

Aminy jsou v dnešní době využívány ve velkém měřítku a v průmyslu jsou téměř nepostradatelné. V každém oboru však mohou být vyžadovány aminy s jinými vlastnostmi. Využití aminů v jednotlivých odvětvích je znázorněno na obrázku 2, kdy největší spotřeba je v chemickém průmyslu a při výrobě polymerů a pryže. Velký význam také nacházejí v agrochemii, farmacii nebo při výrobě barev a pigmentů [7].



Obrázek 2: Využití aminů v průmyslu [7]

Alifatické a cyklické aminy jsou široce používány v agrochemii, zejména při výrobě pesticidů, fungicidů a insekticidů. V tomto odvětví nacházejí využití téměř všechny nižší



aminy. Avšak nejvýznamnější chemikálií pro tento obor je ethylamin, který reakcí s kyselinou kyanurovou tvoří základ pro výrobu triazinových herbicidů a pesticidů <sup>[1]</sup>. Značné uplatnění nachází tyto dusíkaté látky i při farmaceutické výrobě. Důležité jsou například triethylamin pro výrobu cefalosporinů, piperidin pro antibiotika, piperazin pro anthelmintika apod. Diethylamin, ethylamin a morfolin jsou zase jedny z nejčastějších intermediátů. Aminy jsou však nezbytné i při syntéze dalších skupin léčiv jako jsou neoplastika, chemoterapeutika, psychofarmaka, antivirotika, anestetika, aj <sup>[1,8]</sup>.

Nedílnou součástí jsou také aminy při výrobě polymerů a pryskyřic. Polymerace se účastní aminy se dvěma a více aminovými skupinami, jako je například piperazin, ethylendiamin, diethylentriamin aj. Látky s jednou aminovou skupinou se používají jako vytvrzovadla epoxidových pryskyřic. Často jsou alifatické aminy využívány rovněž jako urychlovače vulkanizace, emulgátory, detergenty, syntetická vlákna, flotační činidla či součást protikorozivních nátěrů <sup>[1,5,7,9]</sup>.

Vzhledem ke svým vlastnostem jsou aminy vhodné i pro použití jako výbušniny, senzibilizátory nebo jako jejich příměsi pro zvýšení brizance <sup>[10,11]</sup>. Již v minulém století byla patentována směs nitromethanu s anilinem, difenylethylendiaminem, diethylaminem, tetraethylenpentaminem nebo morfolinem. Již dvě objemová procenta aminu způsobí výrazný nárůst explozivní síly <sup>[12]</sup>. Novější patenty uvádějí využití vyšších ( $C > 8$ ) terciálních aminů spolu s gelačným činidlem a anorganickou oxidační solí jako výbušniny. Jako vhodné aminy byly například použity oktyldimethylamin, decyldimethylamin nebo octadecylamine <sup>[11,12]</sup>. Výbušnou směs lze vyrobit také smícháním polyaminů spolu s  $\alpha,\beta$ -nenasycenými karbonylovými sloučeninami. Výslednou směs je třeba zahustit a před aplikací smíchat s palivem <sup>[13]</sup>. Jako výbušniny se využívají cyklické aminy jako například 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (hexogen) nebo 1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazokanen (oktogen). Právě oktogen je v dnešní době považován za jednu z nejvýkonnějších a cenově dostupnou trhavinu <sup>[12]</sup>.

## 1.2 Toxikologické účinky

Aminy jsou nepříjemně zapáchající látky dráždící kůži, oči a sliznice. Do organismu aminy vstupují přes pokožku, dýchacím či trávicím ústrojím. Akutní otrava se projevuje nevolností, bolestí hlavy, slabostí či cyanózou (zmodrání rtů, nosu). Výjimečně některé aminy mohou způsobit i alergickou reakci či astmatické záchvaty kašle <sup>[14,15]</sup>. Při dlouhodobé

expozici mohou propuknout chronická onemocnění, protože aminy jsou považovány za látky s mutagenními, karcinogenními a teratogenními účinky. Nejčastěji jsou těmito látkami poškozeny dýchací cesty, játra a ledviny <sup>[14,16,17]</sup>.

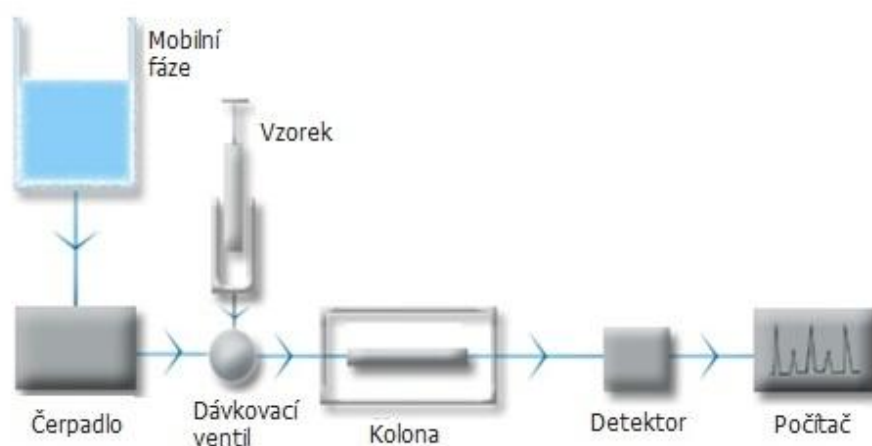
V organismu nedochází k akumulaci těchto látek a jsou rychle z organismu eliminovány. Aminy mohou z organismu odcházet v nezměněném stavu nebo mohou být odbourávány metabolickými cestami. Metabolické odbourávání může představovat největší problém, neboť aminy jsou prekurzory pro vznik karcinogenních nitrosaminů. Při porovnání toxikologických rizik jsou významnější aromatické aminy <sup>[14,18]</sup>.

## 2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) je separační technika vhodná pro netěkavé nepolární až iontové organické látky. K rozdělení směsi látek dochází v závislosti rozdílné afinity mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází <sup>[19]</sup>. Kapalinová chromatografie je velmi rozšířená technika, která nachází použití v mnoha oborech jako je analýza potravin, léčiv, drog, klinických materiálů, životního prostředí aj. Kapalinovou chromatografii lze dělit podle mnoha kritérií. Asi nejznámější dělení je podle principu distribuce mezi fázemi na adsorpční, rozdělovací, iontově–výměnnou, afinitní, ion párovou, gelovou permeační a iontově výměnná. Podle typu použité stacionární a mobilní fáze lze adsorpční chromatografii dále dělit na systém s normálními a obrácenými fázemi (RP–LC). U systému s normálními fázemi je stacionární fáze polárnější než mobilní fáze. U systému s obrácenými fázemi je tomu přesně naopak a tato metoda v dnešní době převládá. Právě LC s obrácenými fázemi se bude tato diplomová práce zabývat <sup>[20]</sup>.

### 2.1 Instrumentace

Kapalinová chromatografie se skládá z několika částí, kdy každá část má nepostradatelnou funkci. Základní schéma LC je zobrazeno na obrázku 3. Do přístroje mohou být však zařazeny další části jako derivatizační reaktory, prekoncentrační kolony, popřípadě více detektorů <sup>[21]</sup>. Jednotlivé části a jejich vliv na separaci či detekci budou popsány níže.



Obrázek 3: Schéma kapalinového chromatografu <sup>[22]</sup>.

### 2.1.1 Mobilní fáze

Složení mobilní fáze má výrazný vliv na eluční charakteristiky jako účinnost kolony, rozlišení, retenční poměr, dobu analýzy a citlivost. Vhodné složení mobilní fáze je optimalizováno při vývoji metody, aby byla dosažena separace a nedocházelo k rozmývání píků<sup>[23]</sup>. U kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi bývá mobilní fáze tvořena směsí vody a organických rozpouštědel. Jako organická fáze se u RP–LC nejčastěji používá acetonitril, methanol nebo tetrahydrofuran<sup>[20]</sup>. Délka zadržení analyzované látky je možné ovlivnit pH mobilní fáze, jelikož retence je závislá na hydrofobních vlastnostech analyzované látky. U ionizované formy hydrofobicita klesá a s tím i retence látky. Z tohoto důvodu jsou do mobilní fáze přidávány tlumivé roztoky. Výčet nejběžnějších pufrů a rozmezí jejich použití jsou shrnuty v tabulce 1. Při volbě mobilní fáze se také musí brát v úvahu kompatibilita s detektorem, cenová dostupnost, bod varu, toxikologické, bezpečnostní a korozivní vlastnosti<sup>[24]</sup>.

Tabulka 1: Pufrы pro RP–LC<sup>[24]</sup>

Pufr	pKa	Optimální pH
Fosfátový pufr	2,1	1,1 – 3,1
	7,2	6,2 – 8,2
	12,3	11,3 – 13,3
Kys. mravenčí	3,8	2,8 – 4,8
Kys. octová	4,8	3,8 – 5,8
Citrátový pufr	3,1	2,1 – 4,1
	4,7	3,7 – 5,7
	5,4	4,4 – 6,4
Triethylamin	11,0	10,0 – 12,0
Pyrolidin	11,3	10,3 – 12,3

### 2.1.2 Čerpadlo

Čerpadlo zajišťuje stabilní průtok mobilní fáze, přičemž pracuje za vysokých tlaků většinou v rozmezí 5 – 60 MPa. Použité tlaky se mohou lišit výkonem čerpadla a vlastnostmi kolony. Pro analytické účely bývá průtok mobilní fáze volen v rozmezí 0,1 – 10 ml/min. Podle složení dávkované mobilní fáze se eluce dělí na isokratickou a gradientovou. Pro jednodušší analýzy je vhodná isokratická eluce, při které je složení mobilní fáze konstantní. Oproti tomu při gradientové eluci se složení s časem mění. Tato metoda je vhodná

při velkých rozdílech eluce jednotlivých látek. Nejdůležitější výhody gradientové eluce jsou zrychlení analýzy, zlepšení citlivosti a možnost ovlivnění tvaru píků <sup>[20,25]</sup>.

### **2.1.3 Dávkovací ventil**

Dávkovací ventil slouží k zavedení přesně definovaného množství vzorku do chromatografu. Vzorek se dávkuje pomocí stříkačky do smyčky o známém objemu, odkud je mobilní fáze unášen na kolonu. Dávkovací ventily jsou dodávány s vnější nebo vnitřní smyčkou o různém objemu. Je však důležité dávkovat vzorek do smyčky bez bublinek. Kvůli zrychlení produktivity a minimalizování chyb operátora byly zavedeny automatické dávkovače tzv. autosamplery <sup>[25]</sup>.

### **2.1.4 Kolona**

Kolona je vysoce odolná trubice, nejčastěji z nerezové oceli, která musí odolávat vysokým tlakům. Důležitý je vhodný sorbent, neboť právě zde dochází k rozdělení analyzované látky. Kolon existuje celá řada a dají se dělit podle různých kritérií do mnoha skupin. Nejběžnější je dělení podle náplně kolony na monolitické a náplňové kolony <sup>[25]</sup>.

#### **2.1.4.1 Monolitické kolony**

Monolitické kolony jsou vyplněny celistvým porézním materiálem a právě podle velikosti pórů jsou charakterizovány. V dnešní době byla vytvořena již celá řada těchto kolon, kdy sorbent v koloně je nejčastěji na bázi organických polymerů (akrylamidy, metakryláty, styreny aj.) nebo silikagelu. Velkou výhodou těchto kolon je snadná příprava a možnost modifikování monolitu. Monolitické kolony jsou připravovány radikálovou reakcí, která je iniciována zvýšenou teplotou nebo UV zářením. Monolitické kolony s makropory umožňují rychlé analýzy z důvodu vyššího průtoku mobilní fáze bez ztráty účinnosti a překročení tlakového limitu. Z důvodu nízkého zpětného tlaku a vysoké rozlišovací síly jsou tyto kolony používány pro separaci a čištění větších molekul jako jsou proteiny, polynukleotidy, segmenty DNA a dokonce i živých mikroorganismů. V porovnání s klasickými kolonami mají monolitické výhodu v možnosti volby vnitřní struktury, hydrodynamických vlastnostech a absenci frit. Značnou nevýhodou je možnost bobtnání monolitu vlivem organických

rozpouštědel a rozpustnost anorganických monolitů v alkalickém prostředí, což ovlivňuje porozitu a účinnost <sup>[26,27]</sup>.

#### 2.1.4.2 Náplňové kolony

Náplňové kolony jsou trubice o délce 100 – 300 mm plněné částicemi o velikosti 3–10 μm. Právě tyto dva parametry mají velký vliv na účinnost separace <sup>[28]</sup>. Účinnost s klesající velikostí částic stoupá, ale pokud by byly použity částice menší než 1,5 μm, dochází vlivem tření k uvolnění tepla, které účinnost snižuje. Závislost délky kolony je zřejmý z rovnice 1, což je vztah pro počet teoretických pater. Počet teoretických pater je dán podílem délky kolony a výškovým ekvivalentem teoretického patra. Čím je počet teoretických pater větší, tím je i lepší účinnost kolony. Nevýhodou je ale růst spotřeby mobilní fáze a délky analýzy s délkou kolony. Při porovnávání jednotlivých kolon je nutné, brát v úvahu podmínky měření <sup>[28,29]</sup>.

$$n = \frac{L}{H} \quad (1)$$

U kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi se využívají nepolární stacionární fáze. Tím mohou být nepolární sorbenty jako uhlík nebo organické polymery. Mnohem běžnější je nicméně použití modifikovaného nosiče. Nosiče se liší v teplotních stabilitách a hydrolytických vlastnostech. Podle těchto kritérií jsou pro analýzu vybírány kolony z vhodného materiálu. Nejrozšířenějším nosičem je silikagel, poté následuje oxid hlinitý, zirkoničitý či titaničitý. Na nosič je následně chemicky navázána nepolární část, která se volí podle stanovované látky. Využívají se látky s dlouhým alkylovým řetězcem, jako je oktadecylsilikagel (označován jako C18 nebo ODS), C8, C4, alkylfenyl aj <sup>[30]</sup>.

#### 2.1.5 Detektory

Funkcí detektoru je zaznamenat látky, které byly na koloně rozseparovány. Stejně jako předchozí části, tak i detektory lze dělit do několika skupin. Běžné je dělení na selektivní a univerzální. Selektivní detektory zaznamenávají koncentraci v závislosti na specifické vlastnosti analytu, na rozdíl od univerzálních, kdy je odezva úměrná celkové vlastnosti eluátu. Univerzálních detektorů je méně a jsou i méně využívány kvůli nižší citlivosti. Selektivní detektory se vyznačují vyšší citlivostí, ale také vyšší pořizovací cenou. Vlastnosti a omezení

detektorů byly shrnuty v tabulce 2. Kromě zmíněných detektorů nastal v poslední době rozmach párových technik jako LC–MS, LC–NMR, LC–IR aj. Zejména LC–MS je velmi oblíbená a je součástí téměř každé laboratoře. Tyto párové techniky jsou však nad rámec této diplomové práce. Detektory měří různé veličiny, a proto se liší použitím. V některých případech lze provést derivatizaci umožňující měřit vlastnost, kterou původní látka nedisponovala. O derivatizaci bude více pojednáno níže <sup>[31]</sup>.

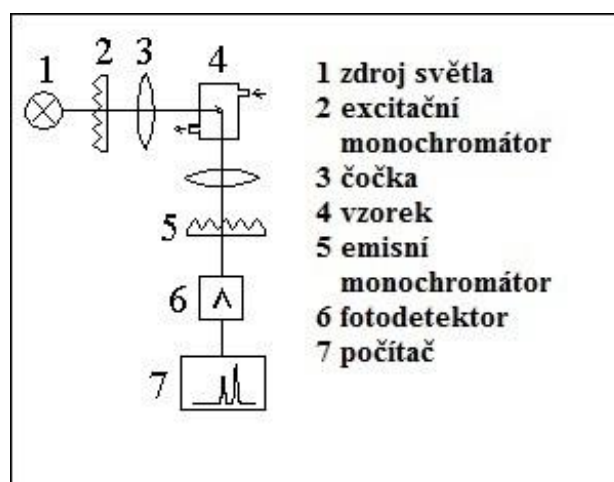
Tabulka 2: Srovnání detektorů <sup>[25,31]</sup>

Detektor	Typ detektoru	Měřená veličina	Lineární rozsah	Teplotní závislost	Gedientová eluce	Citlivost
Spektrofotometrický	selektivní	absorbance	$10^5$	ne	ano	ng
Elektrochemický	selektivní	elektrický proud	$10^5$	ano	ne	pg – fg
Fluorimetrický	selektivní	intenzita fluorescence	$10^3 - 10^4$	ne	ano	pg
Refraktometrický	univerzální	index lomu	$10^3$	ano	ne	$\mu\text{g}$
Vodivostní	univerzální	vodivost	$10^4$	ano	ano	ng

### 2.1.5.1 Fluorescenční detektor

Fluorescenční detektor (FLD) je velmi citlivý a selektivní detektor, který měří intenzitu emitovaného záření. Vysoká selektivita umožňuje využití ve stopové analýze, analýze léčiv, potravin, životního prostředí aj. Fluorescenci nevykazují všechny látky, často jí ale disponují aromatické sloučeniny <sup>[31,32]</sup>.

Princip detektoru je znázorněn na obrázku 4. Elektrony analytu jsou nejprve vybuzeny pomocí excitačního záření, poté následuje návrat na základní energetickou hladinu a vyzáření emisního záření. Emitované záření je detekováno pomocí fotodetektoru a záznam je znázorněn jako chromatogram. Jako zdroj záření se nejčastěji využívá rtuťová výbojka,



Obrázek 4: Schéma fluorescenčního detektoru <sup>[33]</sup>

deuteriová výbojka, xenonová lampa nebo nově laser. Další částí jsou monochromátory, kterých existuje několik konstrukcí. Jejich funkce je propouštět záření o zvolených vlnových délkách. Emitované záření má vždy nižší energii (větší vlnovou délku) a je měřeno v kolmém směru z důvodu eliminace procházejícího záření. K detekci emitovaného záření se využívají fotodiody. Při srovnání s nejběžnějším UV/VIS detektorem může být fluorimetrický detektor až 100 krát citlivější. Proto je důležité dbát na pečlivý výběr mobilní fáze a činidel, aby nedocházelo ke zkreslení výsledků. Nevýhodou je však malý lineární rozsah <sup>[31]</sup>.

### 2.1.6 Vyhodnocení

Výsledný záznam se nazývá chromatogram. Chromatogram většinou znázorňuje závislost intenzity měřené veličiny na čase nebo objemu mobilní fáze. Poloha píku (tzv. eluční čas nebo objem) je kvalitativní parametr a pomocí něj dochází k identifikaci látky. Množství látky ze vzorku je určeno z výšky píku nebo častěji z plochy píku <sup>[25]</sup>.

Důležité parametry pro hodnocení metody jsou limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ). Limit detekce je nejnižší možná koncentrace, kdy lze spolehlivě prokázat přítomnost analytu ve vzorku. Často je tato koncentrace udávána jako trojnásobek šumu. Limit detekce je nejnižší možná koncentrace, kterou lze metodou stanovit s přijatelnou přesností. Hodnota LOQ je udávána jako desetinásobek šumu <sup>[25,34]</sup>.

## 2.2 Derivatizace

Derivatizace je proces, kdy dochází změně struktury látky, která získává požadované fyzikálně–chemické vlastnosti. Derivatizace se může provádět kvůli zlepšení chromatografických vlastností (eluční čas, účinnost, tvar a symetrie píku) nebo zlepšení citlivosti a selektivity detekce. Derivatizaci lze provést pomocí izotopového značení (vhodné pro hmotnostní spektrometrii) nebo reakcí s derivatizačním činidlem. Deriváty lze připravit pro většinu detektorů, v této práci však bude věnována pozornost pouze derivatizacím pro fluorescenční detektor. Pro FLD je nezbytná přítomnost fluoroforu, který je při absenci zaváděn. Vznik derivátu je však závislý na reakčních podmínkách. Důležité je vhodné pH, teplota a délka reakce. Kromě ceny a stability derivátů jsou právě reakční podmínky častým kritériem pro volbu činidla. Větší oblibě se těší činidla s kratší reakční dobou za mírných podmínek <sup>[35]</sup>.



Samotnou derivatizaci je možno dělit podle místa, kde k ní dochází. Reakce může probíhat před kolonou (předkolonová) nebo po separaci (postkolonová). Každá z možností má své výhody i nevýhody, které budou popsány níže <sup>[35]</sup>.

### 2.2.1 Předkolonová derivatizace

Předkolonová derivatizace probíhá před vstupem analytu na kolonu, a proto je možné ovlivnit separaci. Reakce může probíhat v chromatografickém systému nebo mimo něj. Pokud reakce probíhá mimo chromatografický systém, deriváty jsou připravovány v zatavených ampulkách, reakčních zkumavkách se septovými uzávěry, Eppendorfových nádobky nebo derivatizačních nádobkách <sup>[25]</sup>. Reakce však může probíhat i na pevných nosičích jako je silikagel, styren–divinylbenzen, C18 aj. Tento způsob se využívá pro odstranění nadbytku fluoreskujících činidel a možnosti vzorek současně zakoncentrovat <sup>[36]</sup>. V druhém případě probíhá derivatizace na předkoloně nebo v reakční smyčce. Celý proces bývá automatizován, aby se zvýšila kapacita a eliminovala chyba operátora <sup>[28]</sup>. U předkolonové derivatizace je kladen důraz na několik podmínek, ze kterých plynou výhody a nevýhody procesu:

- dostatečná stabilita derivátu
- reakce musí probíhat kvantitativně
- reakce nemusí probíhat rychle
- reakce by měla být selektivní (bez vedlejších produktů)
- reakce za mírných podmínek
- odstranění nadbytku fluoreskujících činidel <sup>[20,35]</sup>.

### 2.2.2 Postkolonová derivatizace

Postkolonová derivatizace je vhodná pro látky, které se dobře dělí, ale detektor je nezaznamená. Reakce probíhá za kolonou v chromatografickém systému, z čehož vyplývá větší instrumentální náročnost. Za separační kolonu je zařazen reaktor, kam jsou pomocí přídatného čerpadla přiváděny derivatizační činidla. Reakce je nicméně plně automatizována, což minimalizuje chybu způsobenou obsluhou. Náročnější instrumentace je také spojena s vyšší pořizovací cenou přístroje <sup>[25,35]</sup>.

Jelikož je derivatizace prováděna až za kolonou, nedochází ke zlepšení separace. Reakce je většinou naopak způsobuje rozmývání, tedy zhoršuje výsledek separace. Výhodou

je však možnost využít více detektorů. Častá je kombinace UV a FLD detektoru, kdy nejprve látka prochází UV detektorem, následuje derivatizace a vstup do FLD detektoru. Další možností je využití děliče toku <sup>[35]</sup>.

Podobně jako u předkolonové derivatizace jsou požadované podmínky i pro postkolonovou derivatizaci:

- reakce nemusí probíhat kvantitativně
- reakce musí probíhat rychle
- možnost extrémnějších podmínek (pH, teplota)
- reakce může být neselektivní
- reakce musí probíhat v prostředí mobilní fáze
- samotné činidlo by nemělo fluoreskovat <sup>[20,35]</sup>.

### 2.2.3 Derivatizační činidla

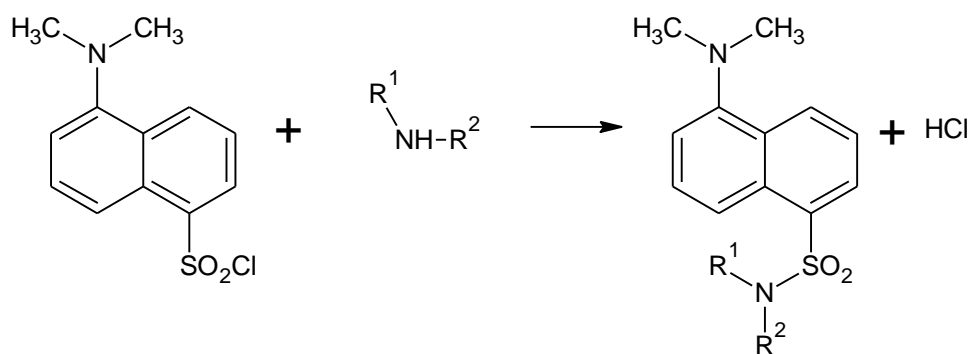
Do dnešní doby bylo popsáno využití mnoha činidel téměř pro všechny skupiny látek a různé detektory. Kvůli této velké rozmanitosti se tato práce bude zabývat pouze derivatizací aminů pro fluorescenční detekci. Právě stanovení aminů a aminokyselin fluorescenční detekcí je považována za nejvhodnější z důvodu vysoké selektivity a citlivosti <sup>[37]</sup>.

Jak již bylo zmíněno, činidla se liší v reakčních podmínkách, rychlosti reakce, možnostech využití a dalších aspektech. V následujících částech budou popsány nejpoužívanějších činidla.

#### 2.2.3.1 Činidlo dansyl chlorid

Dansyl chlorid (5-*N,N'*-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid, DNS-Cl) patří do skupiny sulfonchlchloridů s je jedním z nejstarších činidel, které se stále hojně využívá pro předkolonovou derivatizaci. Z důvodu přítomnosti aromatického jádra je možné zařadit kromě fluorescenčního i spektrofotometrický detektor <sup>[38]</sup>.

Z hlediska derivatizace aminů se jedná téměř o univerzální činidlo, kdy reakce probíhá dle reakce zobrazené na obrázku 5 za vzniku stabilního produktu <sup>[20]</sup>. DNS-Cl lze použít pro derivatizaci primárních, sekundárních i terciálních aminů, polyaminů, peptidů, alkaloidů, aminokyselin nebo biogenních aminů. Vysoká reaktivita však zapříčiňuje také reakci s alkoholy, fenoly a imidazoly <sup>[39,40]</sup>.



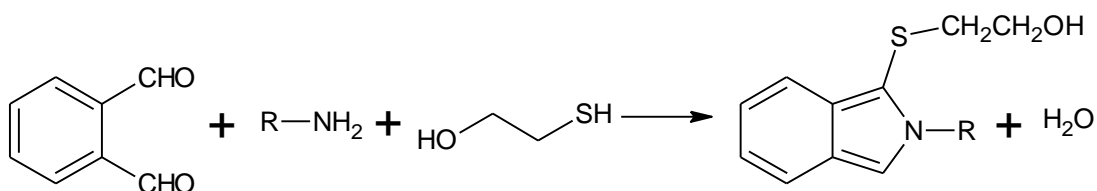
Obrázek 5: Reakce DNS-Cl se sekundárním aminem <sup>[20]</sup>.

Reakční podmínky se mohou s typem aminu částečně lišit. Vhodné pH reakčního prostředí je mírně alkalické. Příliš bazické prostředí vede k hydrolyze činidla, přičemž produkty hydrolyzy poskytují fluorescenci. Při laboratorní teplotě by reakce probíhala příliš dlouho, proto dochází k urychlení reakce zvýšením teploty. Směs se zahřívá podle potřeby na teplotu 50 – 100°C po dobu 5 – 120 minut. Excitační vlnové délky se pohybují rozmezí 350 – 370 nm a emisní 490 až 540 nm <sup>[35,39]</sup>.

Do dnešní doby již byla syntetizována celá řada strukturně obdobných látek jako bansyl chlorid <sup>[20]</sup>, mansyl chlorid <sup>[41]</sup>, disyl chlorid <sup>[42]</sup>, dabsyl chlorid <sup>[43]</sup> aj. Tyto látky reagují podobným mechanismem, přičemž se zvyšuje selektivita, snižuje reakční teplota a čas reakce <sup>[42]</sup>.

### 2.2.3.2 Činidlo *o*-ftaldialdehyd

Derivatizační činidlo *o*-ftaldialdehyd (OPA) je jedním z prvních činidel využitých pro stanovení aminů vůbec <sup>[43]</sup>. Díky rychlé reakci je OPA vhodný pro předkolonovou i postkolonovou derivatizaci, kdy druhá zmíněná možnost je častější. Činidlo je vhodné pouze pro reakci s primárními aminy v alkalickém prostředí, kdy je nutná přítomnost sirič sloučeniny jako redukčního činidla <sup>[43,44]</sup>. Nejběžněji se využívá 2-merkapt ethanol, kyselina 3-merkaptopropanová nebo jako alternativa *N*-acetyl-cystein či 2-thioglycerol <sup>[44]</sup>. Reakce je znázorněna na obrázku 6, kdy vzniká vysoce fluoreskující derivát o malé stabilitě. Na stabilitu derivátu má také vliv zvolené redukční činidlo. Právě nízká stabilita je velká nevýhoda a snižuje použití v předkolonové derivatizaci <sup>[43]</sup>.

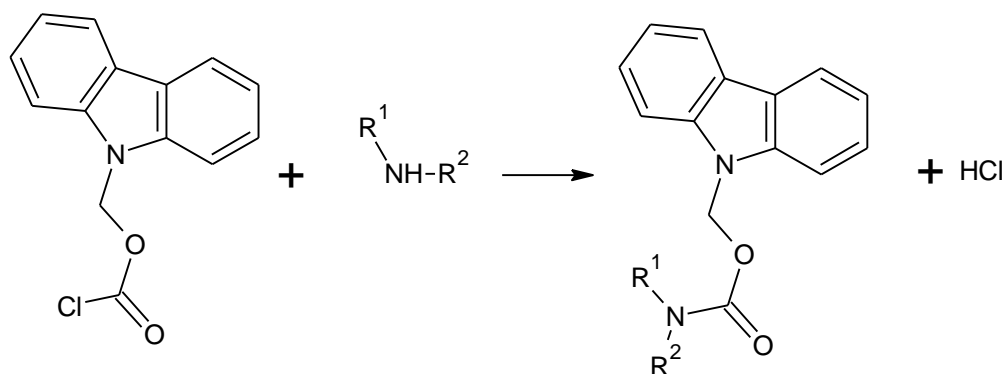


Obrázek 6: Reakce OPA s primárním aminem <sup>[43]</sup>

Jak již bylo zmíněno, reakce aminu s OPA probíhá velmi rychle, obvykle do 2 minut při laboratorní teplotě. Vhodné vlnové délky pro detekci jsou 340 nm pro excitační záření a 455 nm pro emisní záření. Další výhodou OPA je, že samotné činidlo nefluoreskuje, proto není nutné odstraňovat jeho nadbytek. Využití nachází hlavně při stanovení nízkomolekulárních primárních aminů, drog, alkaloidů, aminokyselin a biogenních aminů <sup>[43]</sup>.

### 2.2.3.3 Činidlo 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčan

Činidlo 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčan, označován zkratkou FMOC-Cl, patří k novějším derivatizačním činidlům. FMOC-Cl byl dříve používán při syntézách k ochraně amino skupiny, ale díky svým vlastnostem našel uplatnění i při analýze látek <sup>[37]</sup>. Činidlo je vhodné pro derivatizaci primárních i sekundárních aminů, čehož se využívá při stanovení aminokyselin, biogenních aminů, polyaminů nebo nízkomolekulárních aminů <sup>[45]</sup>. Produkty jsou stabilní karbamáty, které vznikají dle rovnice uvedené na obrázku 7.



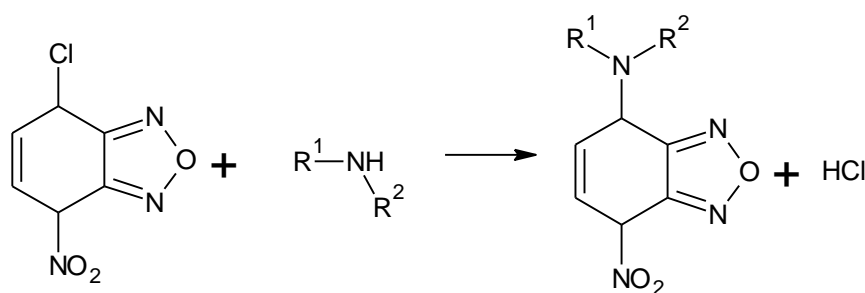
Obrázek 7: Reakce FMOC-Cl se sekundárním aminem <sup>[46]</sup>

Samotná reakce je velmi rychlá a probíhá za mírných podmínek. Derivát vzniká do několika minut už při laboratorní teplotě a jsou detekovány při excitační vlnové délce 260 nm a emisní vlnové délce 310 nm <sup>[37]</sup>. Vhodné pH je mírně alkalické, nejlépe v rozmezí 8–10,

kteře se zajišťuje obvykle borátovým puřrem. Při vyšším pH než 10 dochází k hydrolyze a produkci FMOC–OH. Tento hydrolytický produkt vysoce fluoreskuje a poskytuje široký pík <sup>[48]</sup>. Další nevýhodou je samotného činidla, které je nutné odstranit. Nejčastěji se eliminace provádí extrakcí do pentanu, hexanu, dichlormethanu nebo chloroformu <sup>[49]</sup>.

#### 2.2.3.4 Činidlo 4–chlor–7–nitrobenz–2,1,3–oxadiazol

Činidlo NBD-Cl bylo poprvé využito k derivatizaci v roce 1968 a dnes je široce rozšířeným činidlem vhodným pro primární a sekundární alifatické aminy <sup>[20,44]</sup>. Reakcí s fenoly, thioly a aromatickými aminy vznikají produkty s malými výtěžky nebo vznikají nefluoreskující deriváty. Samotné činidlo nefluoreskuje, což ale neplatí o produktech hydrolyzy, produkující záření o malé intenzitě. Vzniklé deriváty lze z vodných roztoku vyextrahovat do benzenu či ethyl acetátu. Průběh reakce se sekundárním aminem je znárodněn na obrázku 8 <sup>[20,48]</sup>.



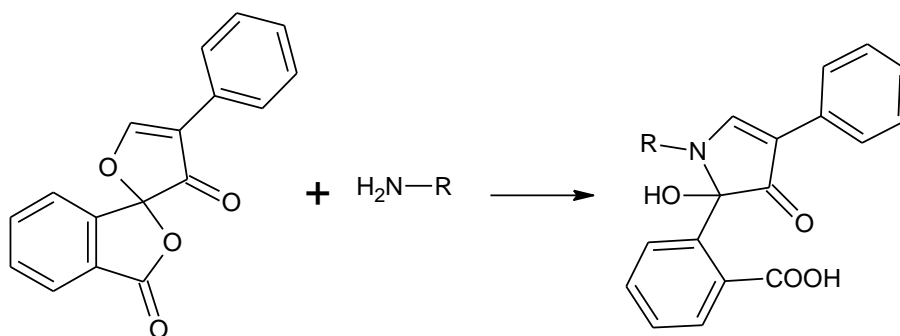
Obrázek 8: Reakce NBD-Cl se sekundárním aminem <sup>[20]</sup>

Reakční podmínky se mohou mírně lišit podle stanovovaného aminu. S reakčními podmínkami také souvisí délka reakce. Rychlost reakce je nejvíce ovlivněna teplotou, pH a organickými rozpouštědly, kdy s rostoucím pH a teplotou dochází ke snížení reakční doby. Optimální pH bývá mírně alkalické (8–10) a teplota obvykle v rozmezí 40 – 100°C. Detekce je poté prováděna při excitační vlnové délce 480 nm a emisní 530 nm <sup>[48]</sup>. Derivatizace pomocí NBD-Cl se používá při stanovení aminokyselin, drog, insekticidů, biogenních aminů, lipidů, apod <sup>[20]</sup>.

Často využívaný je také analog 4–fluor–7–nitrobenz–2,1,3–oxadiazol (NBD-F), který je výrazně reaktivnější, reakce probíhá za mírnějších podmínek a rychleji než u NBD-Cl. Při zvýšené teplotě (60°C) reakce probíhá do 5 minut, což umožňuje využití NBD-F i pro post–kolonovou derivatizaci. Nevýhodou je však vysoká cena, která je několikanásobně vyšší než u NBD-Cl <sup>[48]</sup>.

### 2.2.3.5 Činidlo fluorescamin

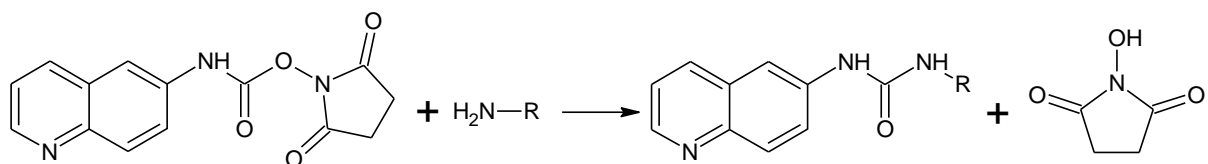
Fluorescamin (4-fenylspiro[furan-2-(3*H*)-1'-naftalan]-3,3'-dion) je selektivní derivatizační činidlo vhodné pouze pro primární aminy. Reakce probíhá podle obrázku 9, kdy vznikají deriváty stabilní několik hodin <sup>[38,51]</sup>. Derivatizace probíhá za laboratorní teploty v mírně alkalickém prostředí do pár minut. Rychlý průběh reakce a malá stabilita derivátů předurčuje fluorescamin spíše pro postkolonovou derivatizaci <sup>[51]</sup>. Samotné činidlo a produkty hydrolyzy nevyzařují fluorescenční záření, což je další výhodou. Vhodné vlnové délky pro detekci jsou 390 nm pro excitační záření a 475 nm pro emisní záření. Značnou nevýhodou je však příliš vysoká cena, proto bývá fluorescamin nahrazován DNS-Cl nebo NBD-Cl. U předkolonové derivatizace je fluorescamin vhodný pro stanovení polyaminů, katecholaminů, aminokyselin, peptidů, proteinů apod <sup>[20,49,50]</sup>.



Obrázek 9: Reakce fluorescaminu s primárním aminem <sup>[20]</sup>

### 2.2.3.6 Činidlo 6-aminochinolin-*N*-hydroxysukcinimidylkarbamát

Činidlo AQC patří k nejnovějším derivatizačním činidlům, které je vhodné pro primární i sekundární aminy. Původně bylo navrženo speciálně pro stanovení aminokyselin z důvodu zvýšení výtěžku, selektivity a zjednodušení reakce <sup>[38,51]</sup>. Při reakci, viz obrázek 10, vznikají vysoce fluoreskující substituované močoviny, které jsou stabilní asi jeden týden při laboratorní teplotě. Pro vznik derivátu je vhodné mírně alkalické prostředí, které je nejčastěji zajištěno pomocí borátového pufru <sup>[52]</sup>. Činidlo je velmi reaktivní a reakce probíhá velmi rychle za zvýšené teploty. Samotný AQC je nestabilní ve vodných roztocích a do 1 – 2 minut dochází k jeho hydrolyze. Tato vlastnost je výhodou, neboť vzniklé produkty neposkytují fluorescenční záření. Detekce je prováděna při excitační vlnové délce 250 nm a emisní vlnové délce 395 nm <sup>[38,51]</sup>.



Obrázek 10: Reakce AQC s primárním aminem <sup>[38]</sup>.

Činidlo bylo použité jako alternativa OPA ke stanovení aminokyselin ve víně, kdy při porovnání byla zlepšena citlivost stanovení <sup>[53]</sup>. Další využití AQC bylo například při stanovení neurotransmiterů <sup>[52]</sup>, peptidů <sup>[51,52]</sup>, glykoproteinů <sup>[53]</sup> nebo separaci enantiomerů ornitinu <sup>[54]</sup>.

### 3 Rešeršní část

Následující část se bude věnovat přehledu prací, které se zabývaly analýzou aminů pomocí HPLC–FLD. Literární rešerše byla provedena pouze u derivatizačních činidel vhodných pro předkolonovou derivatizaci primárních i sekundárních aminů. Důraz byl kladen hlavně na limit detekce, chromatografické a derivatizační podmínky. Velké procento prací se zabývá stanovení aminokyselin, avšak tyto práce nebudou zmíněny z důvodu jejich nevelkého významu pro zadané stanovení aminů. Obecné využití činidel bylo již prezentováno v kapitole 2.2, proto v této části bude popsáno pouze praktické využití jednotlivých činidel. Pro větší přehlednost bylo stanovení aminů shrnuto v tabulce 3.

#### 3.1 Využití dansyl chloridu

Jelikož je dansyl chlorid jedním z nejstarších činidel, existuje velké množství publikací. První zmínky o využití dansyl chloridu pro stanovení aminů kapalinovou chromatografií jsou z 80. let minulého století. Tímto tématem se velmi zabývala dvojice Lawrence a Frei, kteří vydali řadu publikací. Jednou z nejstarších publikací bylo využití činidla pro stanovení pesticidů. Novou metodu autoři porovnávali s TLC, přičemž dosáhli přibližně desetkrát nižší LOD. K separaci byla využita kapalinová chromatografie s normálními fázemi s kolonou  $400 \times 2,4$  mm a částicemi silikagelu  $10 \mu\text{m}$ . Mobilní fáze byla tvořena chloroformem a hexanem. Deriváty byly připraveny smícháním  $200 \mu\text{l}$   $0,1\%$  DNS-Cl,  $200 \mu\text{l}$   $0,5$  mol/l NaOH a  $1$  ml pesticidu. Reakce trvala  $90$  min při teplotě  $80^\circ\text{C}$ . Limity detekce byly stanoveny pro jednotlivé pesticidy v rozmezí  $5 - 10$  ng<sup>[55]</sup>.

Průběhem času se činidlo stávalo více a více populárním, proto se rychle rozšiřovalo jeho využití. Italští vědci zkoumali separaci a identifikaci alifatických monoaminů, diaminů a polyaminů. Metoda vyzdvihuje dobré fluorescenční vlastnosti a eliminaci extrakce. V této práci byly testovány kolony C18 ( $250 \times 4$  mm,  $10 \mu\text{m}$ ), C18 ( $250 \times 4$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ) a C8 ( $250 \times 4$  mm,  $10 \mu\text{m}$ ). Mobilní fáze byla složená z methanolu a vody. Deriváty byly připraveny reakcí  $5,0$  ml  $0,25$  mol/l  $\text{NaHCO}_3$ ,  $1,0$  ml  $0,02$  mol/l DNS-Cl a  $0,5$  ml aminu. Reakce probíhala  $20$  minut v termostatu vyhřátém na  $60^\circ\text{C}$ . Limity detekce byly stanoveny na  $0,5$  ng pro monoaminy a  $0,3$  ng pro diaminy a polyaminy<sup>[56]</sup>.

Čínští autoři se zabývali stanovením nitrosaminů po převedení na aminy. Redukce byla prováděna pomocí kyseliny octové a bromovodíkové. Výsledný roztok byl pomocí



NaOH zalkalizován na pH 9. Směs byla dále smíchána s 0,5 ml 0,2 mol/l uhličitanovým pufrem (pH 9) a 0,5 ml 0,2 mol/l DNS-Cl. Optimální reakční podmínky byly 30 minut při 40°C. K separaci byla zvolena kolona C18 (125 × 4,6 mm, 10 μm) a mobilní fáze voda – acetonitril. Limit detekce byl určen pro nitrosolátky v rozmezí 0,06 – 0,16 ng<sup>[57]</sup>.

O stanovení polyaminů v rostlinách a zvířecích tkáních se pokoušeli španělští autoři, kteří deriváty připravili s drobnými modifikacemi dle Seiler–Wiechmanna. K 200 μl extraktu bylo přidáno 40 μl diaminoheptanu jako vnitřního standardu, 200 μl nasyceného roztoku NaHCO<sub>3</sub> a 400 μl DNS-Cl (5 mg/ml v acetonu). Směs reagovala 10 minut při teplotě 70°C. Po ochlazení byl derivát extrahován do 500 μl toluenu. Kolona byla zvolena C18 (220 × 4,6 mm, 5 μm) a mobilní fáze acetonitril – voda. Limit kvantifikace byl v rozmezí 0,5 – 1 pmol a výtěžnost se pohybovala v rozmezí 90 – 97 %<sup>[58]</sup>.

Polyaminy byly také stanovovány v moči, přičemž derivatizace byla v tomto případě provedena dle Marcé a kolektiv. Amin o objemu 100 μl byl smíchán s 1 ml 10 mmol/l uhličitanového pufru (pH 9) a 900 μl 1 mmol/l DNS-Cl v acetonu. Směs byla zamíchána a ponechána reagovat 10 minut při 70°C. Součástí práce bylo také testování derivatizace na pevné fázi. K tomu byla využita kolona se sorbentem ODS–C18. Kolonka byla nejprve promyta 1 ml methanolu a 1 ml uhličitanového pufru o pH 12. Následovalo prosání 1 ml roztoku aminů a poté 0,5 ml 5 mmol/l roztoku DNS-Cl. Derivatizační činidlo bylo rozpuštěno ve směsi aceton – 20 mmol/l uhličitanový pufr (pH 9,5) v poměru 2:3 (v/v). Jako ideální reakční čas byl při pokojové teplotě stanoven na 30 minut. Potom byla provedena desorpce 1 ml acetonitrilu. Látky byly separovány na koloně C18 (125 × 4 mm, 5 μm) pomocí mobilní fáze acetonitril – 1 mmol/l imidazol o pH 7. Limit detekce byl stanoven na 10 ng/ml a pomocí derivatizace na pevné fázi 2 ng/ml<sup>[59]</sup>.

Metoda prekoncentrace na kolonce C18 byla také testována na vzorcích vody pro stanovení nízkomolekulárních aminů. Kolektiv autorů byl téměř totožný jako v předchozím případě a podobná byla i příprava derivátů. Lišily se pouze reakční podmínky u derivatizace na pevné fázi. Reakce probíhala 15 minut při 85°C a poté byla kolonka promyta 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu pro eliminaci zbytku činidla. Extrakce byla provedena 0,5 ml acetonu. Stacionární i mobilní fáze byly stejné jako v předchozím případě. Limity detekce byly stanoveny v rozmezí 2 – 4 ng/ml u prekoncentrační techniky, přičemž vykazovala výrazně vyšší výtěžnost než klasická metoda<sup>[60]</sup>.

Stanovení *N*-nitrosodimethylaminu v odpadních vodách se zabývali američtí autoři, kteří hledali alternativu ke stanovení plynovou chromatografií s LOD 1 ng/l. Před samotnou

derivatizací byla provedena denitrosazace kyselinou octovou a bromovodíkovou s výtěžností 97 %. Produkt denitrosace byl nejprve neutralizován pomocí 1 mol/l NaOH a poté bylo přidáno 200 µl 0,5 mol/l NaHCO<sub>3</sub> a 150 µl DNS-Cl (500 mg/l v acetonu). Ideální reakční podmínky byly stanoveny na 30 minut při 40°C. Kolona byla zvolena C18 (150 × 3,9 mm, 4 µm) a mobilní fáze acetonitril – voda. Limit detekce byl stanoven na 6 ng/l, což bylo vyhodnoceno jako adekvátní alternativa místo GC<sup>[61]</sup>.

V moderní době je kladen velký důraz na analýzu léčiv. Stanovením aliskirenu pomocí předkolonové derivatizace s činidlem DNS-Cl byl zkoumán autory Sari, Aydoğmuş a Ulu. Standardní roztok aliskirenu byl zderivatizován reakcí s 300 µl 25 mmol/l uhličitanového pufru (pH 10,5) a 300 µl DNS-Cl (2 mg/ml v acetonitrilu). Reakce probíhala ve tmě 20 minut při teplotě 30°C. Výsledný derivát byl extrahován do 5 ml dichlormethanu. Organická fáze byla odseparována a vysušena síranem sodným. Lineární rozsah pro stanovení léčiva v tabletách byl 700 – 100 ng/ml s LOD 27,53 ng/ml a v plasmě 150 – 50 ng/ml s LOD 4,91 ng/ml<sup>[62]</sup>.

Další možné využití našel dansyl chlorid při stanovení antidepresiv. Deriváty byly připraveny reakcí 1 ml roztoku léčiva, 4 ml 0,5 mol/l uhličitanový pufr (pH 10) a 0,7 ml DNS-Cl ( $3,71 \cdot 10^{-5}$  mol/l v acetonu). Derivatizace probíhala 20 minut při laboratorní teplotě. Lineární rozsah metody byl v rozmezí 0,02 – 0,14 µg/ml. Limity detekce byly velmi podobné v rozmezí 1 – 2 ng/ml. Metoda byla také úspěšně využita při stanovení lékové formy v lidské plasmě<sup>[63]</sup>.

### 3.2 Využití 4-chlor-7-nitrobenz-2,1,3-oxadiazolu

Jednou z prvních publikací byla práce autorů Wolfram, Feinberg, Doerr a Fiddler na stanovení *N*-nitrosoprolinu. Nejprve byla provedena denitrosace podle Eisenbrand-Preussmanna pomocí ledové kyseliny octové a kyseliny bromovodíkové. K produktu denitrosace bylo přidáno 100 µl nasyceného roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 900 µl acetonitrilu obsahující 3 mg NBD-Cl. Směs byla zahřívána na 50°C ve vodní lázni po dobu 30 minut. Separace byla provedena na koloně 250 × 2 mm s částicemi silikagelu 10 µm. Mobilní fáze byla složena z ethylacetatu – *n*-hexanu – kyseliny octové v poměru 50:50:0,5 (v/v/v). Limit detekce byl stanoven na 7 ng *N*-nitrosoprolinu<sup>[64]</sup>.

Největší využití toto derivatizační činidlo získalo v posledních dvaceti letech při analýze farmaceutických přípravků a klinických materiálů. Lisinopril je léčivo využívané pro

snížení krevního tlaku. Deriváty byly připraveny reakcí 5 – 100  $\mu$ l zásobního roztoku lisinoprilu (50 mg/ml), 100  $\mu$ l 25 mmol/l fosfátového pufru (pH 9) a 100  $\mu$ l NBD-Cl (4,2 mg/ml v methanolu). Reakce probíhala 70 minut při teplotě 60°C. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl vzniklý derivát extrahován do 2 ml ethylacetátu. Limit detekce byl stanoven 50 ng/ml. Vyvinutá metoda vykazuje sice vyšší limit detekce než u metody s OPA (LOD 20 ng/ml), ale deriváty jsou výrazně stabilnější a nedochází k interakci s pomocnými látkami [65].

Další využití našlo činidlo při stanovení aminoglykosidu gentamycinu. Derivatizace proběhla reakcí 5 ml roztoku gentamycinu, 1 ml NBD-Cl (1 mg/ml v methanolu) a 4 ml 50% methanolického fosfátového pufru (pH 7,2). Podmínky reakce byly optimalizovány na 70°C a 60 minut a limit detekce byl stanoven na 0,11  $\mu$ g/ml [66].

Stanovení inzulínu je velmi zajímavá práce čínských autorů, kteří připravili fluoreskující derivát reakcí vzorku se 100  $\mu$ l 3 mmol/l NBD-Cl a 25  $\mu$ l 0,1 mol/l fosfátového pufru (pH 9). Reakce probíhala za nepřístupu světla dvě hodiny při teplotě 50°C. Separace byla provedena na koloně C18 a mobilní fáze byla složena ze směsi acetonitril – voda s 0,1% přídavkem trifluoroctové kyseliny. Limit detekce byl 2 ng/ml a výtěžnost 95%. Výsledky ukazují na potencionální využití metody pro stanovení inzulínu v biologických materiálech [67].

Riboxetin je léčivo působící na CNS a využívá se hlavně v psychiatrii. Jeho stanovením v tabletách a později v lidské plasmě se zabývali autoři Önal a kolektiv. Derivát byl připraven smícháním 1 ml vzorku, 200  $\mu$ l 0,5 mol/l borátového pufru (pH 8,5) a 200  $\mu$ l NBD-Cl (3,5 mg/ml v methanolu). Směs byla míchaná 10 sekund a poté zahřívána 5 minut při 70°C. Při stanovení riboxetinu v krevní plasmě předcházela extrakce do směsi hexan – isoamylalkohol a úprava extraktu pomocí NaOH. Jako stacionární fáze byla kolona C18 (250  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m) a mobilní fáze acetonitril – voda (pH 3 upraveno kyselinou dusičnou). Limit kvantifikace byl stanovený na 2 ng/ml a limit detekce 0,5 ng/ml s výtěžností 93 % [68].

Léčiva saxagliptin (SAX) a vildagliptin (VIL) jsou určeny pro diabetiky druhého typu. Tvorba jednotlivých derivátů se mírně liší reakčními podmínkami. K 1 ml standardního roztoku byl přidán 1 ml 0,2 mol/l borátového pufru (pH 9 pro SAX a 8,5 pro VIL) a 1 ml 0,2% NBD-Cl v methanolu. Jako optimální reakční podmínky byly vyhodnoceny 15 minut pro SAX a 20 minut pro VIL při 70°C. V metodě byla použita duální detekce, kdy výrazně

citlivější byla fluorimetrická s LOD 3 ng/ml pro SAX a 7 ng/ml pro VIL oproti spektrofotometrické s LOD 270 ng/ml pro SAX a 320 ng/ml pro VIL <sup>[69]</sup>.

Další stanovené léčiva byla gabapentin, pregabalin, vigabatrin a topiramate patřící do skupiny antiepileptik. Vzorek byl smíchán s 25  $\mu$ l 0,25 mol/l borátového pufru (pH 10) a 100  $\mu$ l NBD-Cl (10 mg/ml ve směsi methanol – acetonitril 1:1). Směs byla míchaná 30 sekund a poté inkubována 15 minut při 60°C. Separace proběhla na koloně C18 (150  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m) s ochranou předkolonkou C18 (4 mm  $\times$  3 mm). Mobilní fáze byla složena ze směsi methanol – 0,05 mol/l fosfátový pufr (pH 4,9). Limity detekce byly určeny v rozmezí 0,4 – 0,5  $\mu$ g/ml <sup>[70]</sup>.

Činidlo NBD-Cl bylo také testováno na analýzu antibiotik, konkrétně na léčivo polymyxin B. K alikvotnímu podílu vzorku byly pipetovány 2 ml borátového pufru (pH 7) a 0,5 ml NBD-Cl (1 mg/ml v methanolu). Roztok byl zahříván ve vodní lázni 45 min na 60°C. Lineární rozsah metody byl stanoven na 0,1– 1,2  $\mu$ g/ml a LOD 10 ng/ml. Vyvinutá metoda byla využita pro stanovení polymyxin B v lidské plasmě s uspokojivými výsledky <sup>[71]</sup>.

V nejnovější publikaci se autoři zabývali separací chirálních alifatických aminů, včetně aminoalkoholů. Deriváty byly připraveny reakcí aminu s 2 – 4 molárním nadbytkem NBD-Cl a desetinásobným přebytkem nasyceného roztoku uhličitanu. Reakce probíhala 12 hodin při laboratorní teplotě a výsledný derivát byl filtrován kvůli odstranění nadbytku uhličitanu. Separace byla provedena v systému s normálními fázemi, přičemž byly testovány čtyři druhy kolon. Jako nejvhodnější byla vyhodnocena kolona Chiralpak IE (250  $\times$  4,6, 5  $\mu$ m). Mobilní fáze byla složena ze směsi n-hexan – 2-propanol. Limit detekce byl stanovený na 0,5 ng/ml pro FLD, oproti UV detekci s LOD 7,5 ng/ml <sup>[72]</sup>.

### 3.3 Využití 4-fluor-7-nitrobenz-2,1,3-oxadiazolu

Iwaki a kolektiv využili reaktivnosti sekundární aminoskupiny na  $\beta$ -laktámovém kruhu ke stanovení penicilinů pomocí NBD-F. Deriváty byly připraveny reakcí 45  $\mu$ l vzorku, 30  $\mu$ l 80 mmol/l NBD-F v acetonitrilu a 15  $\mu$ l 0,2 mol/l fosfátového pufru (pH 6). Reakce probíhala ve vodní lázni 10 minut při teplotě 60°C. Po ochlazení bylo přidáno 30  $\mu$ l 1 mol/l HCl a objem 10  $\mu$ l byl dávkován do přístroje. K separaci byla použita kolona ODS – 80TM (150  $\times$  4,6 mm) a mobilní fáze acetonitril – voda. Limit detekce byl stanoven pro benzylpenicilin 30 ng/ml, kloxacilin 30 ng/ml, dikloxacilin 45 ng/ml, piperakilin 50 ng/ml a methycilin 85 ng/ml <sup>[73]</sup>.

Stanovení léčiva ramipril v tabletách a lidské plasmě bylo provedeno autory Al-Majed a Al-Zehouri. Derivatizace proběhla reakcí 1 ml zásobního roztoku, 0,2 ml 1 mmol/l NBD-F v ethanolu a 2,6 ml 66 mmol/l fosfátového pufru (pH 7). Optimální reakční teplota byla 70°C a čas 10 minut. Po ochlazení byl roztok okyselen 0,2 ml 2 mol/l HCl. Lineární část byla vyhodnocena v rozmezí 100 – 20 ng/ml s výtěžností větší než 98%. Metoda byla dostatečně citlivá a reprodukovatelná pro zavedení postupu na stanovení léčiva v kontrolní laboratoři [74].

Další publikace popisuje stanovení katecholaminů, přičemž NBD-F kvůli své reaktivnosti nereaguje pouze se sekundární aminoskupinou, ale i s hydroxylovými skupinami. Deriváty vznikly reakcí 2 ml 500 µmol/l katecholaminu, 2 ml 50 mmol/l borátového pufru (pH 8) a 2 ml 50 mmol/l NBD-F v acetonitrilu. Reakce trvala 5 minut při 50°C. Stacionární fáze byla kolona C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm) s ochranou předkolonkou (4 × 3 mm). Mobilní fáze byla zvolena směs acetonitrilu a 10 mmol/l fosfátového pufru (pH 8). Limit detekce byl stanovený na hodnotu 0,5 nmol/l pro všechny katecholaminy [75].

Vypracováním postupu na analýzu antidepresiv fluoxetinu a norfluoxetinu se zabývala skupina japonských vědců. Deriváty byly připraveny reakcí 10 µl standardního roztoku, 50 µl acetonitrilu, 20 µl 0,1 mol/l borátového pufru (pH 8) a 30 µl 50 mmol/l NBD-F v acetonitrilu. Reakční doba byla 1 minuta při 60°C. Po proběhnutí reakce byla směs okyselena 400 µl acetonitril – 0,1 % trifluoroctové kyseliny ve vodě (90:10 v/v). Separace proběhla na koloně C18 s mobilní fází acetonitril – 0,1 % trifluoroctová kyselina ve vodě (90:10 v/v). Limity detekce byly určeny na 23 fmol a 7 fmol [76].

### 3.4 Využití 9–(fluorenyl)ethylchloromravenčanu

Kolektiv autorů López a kolektiv se zabývali stanovením dimethylaminu v podzemních vodách a vlivem interferujících aminů na výsledek stanovení. Vzorky podzemní vody byly nejprve filtrovány přes 0,22 µm membránový filtr a poté bylo odebráno 400 µl vzorku ke stanovení. K alikvotnímu podílu bylo přidáno 500 µl 15 mmol/l FMOC-Cl a 100 µl 1 mol/l borátového pufru (pH 8). Směs byla míchaná při laboratorní teplotě 120 sekund a poté byly přidány 2 ml hexanu. Po 40 sekundovém míchání byla vodná fáze dávkována do chromatografu. Separace proběhla na koloně C18 (250 mm × 4 mm, 10 µm) a mobilní fáze byla složena ze směsi acetonitril – acetátový pufr (pH 4). Limit detekce byl stanoven na 0,16 ng DMA. Přítomnost dalších aminů jako methylamin, dimethylamin,

butylamin, anilin a pentan-1,5-diamin nevykazovaly vliv na stanovení, přičemž u všech došlo ke vzniku derivátů <sup>[77]</sup>.

Podobnou tematikou se zabývali i autoři Falcó a kolektiv, kteří využili derivatizaci na pevné fázi pro stanovení diethylaminu a propylaminu. Derivatizační kolonka byla nejprve promyta 1 ml methanolu a 1 ml 1 % uhličitanového pufru (pH 10). Poté bylo prosáno 250 µl vzorku a 25 µl FMOC-Cl ( $8,3 \cdot 10^{-4}$  mol/l v acetonitrilu). Extrakce byla provedena 1 ml acetonitrilu a z extraktu bylo dávkováno 5 µl. Byla zvolena kolona se stacionární fází C18 (125 mm × 4 mm, 5 µm) a mobilní fáze směs acetonitril – voda. Limity detekce byly stanoveny na 10 ng/ml pro diethylamin a 5 ng/ml pro propylamin <sup>[78]</sup>.

Stanovením dalších alifatických aminů se opět zabýval Falcó a kolektiv. Derivatizace opět proběhla na pevné fázi, ovšem tentokrát s malými úpravami. Kolonka byla promyta 2 ml methanolu a 1 ml 1 % uhličitanového pufru (pH 10). Následovalo prosání 125 µl vzorku, 1 ml 1 % uhličitanového pufru (pH 10) a 250 µl 25 mmol/l FMOC-Cl. Reakce probíhala 2 minuty a poté byl derivát extrahován 0,5 ml acetonitrilu. Chromatografické podmínky byly shodné jako v předchozím případě. Limity detekce však byly sníženy na hodnoty 0,5 – 2,5 ng/ml <sup>[79]</sup>.

Autoři Nedelkoska a Low publikovali práci na stanovení herbicidu glyfosátu ve vodě a rostlinných materiálech. Glyfosát byl zderivatizován 2 ml 0,5 mol/l FMOC-Cl a prostředí upraveno 300 µl 0,125 mol/l borátového pufru (pH 9). Reakce probíhala 30 minut při laboratorní teplotě a nadbytek činidla byl odstraněn extrakcí do ethylacetátu. Separace proběhla nejlépe na polyamidické koloně (250 × 4 mm) s mobilní fází acetonitril – 50 mmol/l fosfátový pufr (pH 10). Limit detekce byl stanoven na 0,16 ng/ml s 94 % výtěžností <sup>[80]</sup>.

Podobně jako u předchozích dvou činidel i FMOC-Cl s postupem času našlo hlavní využití při analýze léčiv a klinických materiálů. Stanovení methylaminu a aminoacetonu v krvi a tkáních bylo provedeno reakcí 100 µl vzorku, 600 µl 0,2 mol/l borátového pufru (pH 10,4) a 100 µl FMOC-Cl (0,2 mg/ml v acetonitrilu). Nadbytek činidla byl extrahován do 3,5 ml hexanu. K separaci byla zvolena kolona C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm) a mobilní fáze acetonitril – 5 µmol/l fosfátový pufr (pH 4,4). Limit detekce metody byl 0,19 ng <sup>[81]</sup>.

Stanovení reboxetinu bylo popsáno i metodou FMOC-Cl. Derivatizace proběhla reakcí 50 µl vzorku, 25 µl 0,2 mol/l borátového pufru (pH 9) a 25 µl 0,36 mmol/l FMOC. Reakce probíhala 15 minut při laboratorní teplotě a poté byl nadbytek činidla odstraněn přidávkem 300 µl hexanu. Separace proběhla na koloně C18 (150 × 2,1 mm, 5 µm) s mobilní fází voda – acetonitril – tetrahydrofuran 45:50:5 (v/v/v) a voda – acetonitril –

tetrahydrofuran 20:75:5 (v/v/v). Limit detekce byl stanoven na 0,6 ng/ml, což je téměř totožná hodnota jako při metodě NBD-Cl<sup>[82]</sup>.

Kolistin je antibiotikum produkované bakteriemi, které bylo derivatizováno na pevné fázi. Kolonka C18 byla nejprve promyta 1 ml methanolu a 1 ml 1 % uhličitanového pufru (pH 10). Potom bylo prosáto 250  $\mu$ l vzorku a 50  $\mu$ l 100 mmol/l Fmoc-Cl. Derivatizace probíhala 10 minut a poté byla kolonka promyta 1 ml 95% methanolu. Extrakce byla provedena 1,3 ml acetonu a k extraktu bylo přidáno 600  $\mu$ l 6 mol/l kyseliny borité. Směs byla filtrována přes 0,2  $\mu$ m membránový filtr a poté dávkována do chromatografu s kolonou C18 (100  $\times$  2,1 mm, 2,7  $\mu$ m). Mobilní fáze byla složena ze směsi voda – acetonitril – tetrahydrofuran v poměru 16:82:2 (v/v/v). Lineární rozsah byl stanoven v rozmezí 6 – 0,3  $\mu$ g/ml s LOD 0,1  $\mu$ g/ml<sup>[83]</sup>.

Nejnovější publikace se zabývá stanovení hydroxylaminu ve farmaceutických složkách. Deriváty byly připraveny reakcí 100  $\mu$ l 2 mol/l borátového pufru (pH 8), 400  $\mu$ l Fmoc-Cl (6 mg/ml v acetonitrilu) a 100  $\mu$ l vzorku. Směs byla umístěna do Eppendorfovy zkumavky a ponechána 20 minut při 0°C. Poté byl roztok okyselen 30  $\mu$ l 2 mol/l kyseliny citronové a 20  $\mu$ l roztoku bylo dávkováno do chromatografu. Jako stacionární fáze byla zvolena kolona PFP (250  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m) a mobilní fáze byla složena ze směsi methanol – 0,5% kyselina mravenčí (pH 3). Limit detekce pro stanovení hydroxylaminu výše popsanou metodou byl 10 ng/ml<sup>[84]</sup>.

### 3.5 Využití 6-aminochinolin-N-hydroxysukcinimidylkarbamátu

Busto, Guasch a Borrull vypracovali metodu pro automatické stanovení šestnácti biogenních aminů jako alternativu pro činidlo OPA. Automatická derivatizace byla provedena reakcí 10  $\mu$ l vzorku, 6  $\mu$ l borátového pufru (pH 8,8) a 0,5  $\mu$ l 10 mmol/l AQC v acetonitrilu. Směs se nechala reagovat 5 minut při 65°C. Kolona byla zvolena C18 (250  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m) a mobilní fáze methanol – 0,05 mol/l octan sodný. Limity detekce byly stanoveny v rozmezí 5 – 50  $\mu$ g/l<sup>[85]</sup>.

Další publikace popisuje opět stanovení biogenních aminů, avšak tentokrát byly aminy extrahovány na pevné fázi. Kolonka byla nejprve promyta 2 ml methanolu a 2 ml destilované vody. Následovalo prosátí 600  $\mu$ l vzorku a tři promývací kroky: 2 ml 10 mmol/l H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/MeOH (90:10 v/v), 2 ml 10 mmol/l NaOH/MeOH (70:30 v/v) a 2 ml 10 mmol/l CaCl<sub>2</sub>/MeOH (70:30 v/v). Eluce byla provedena 1,2 ml 100 mmol/l roztoku

NaOH/MeOH (65:35 v/v). Dvacet mikrolitrů extraktu bylo derivatizováno 30  $\mu$ l AQC v prostředí 50  $\mu$ l 0,2 mol/l borátového pufru (pH 8,8). Separace proběhla na koloně C18 (250  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m) s mobilní fází směs 140 mmol/l octan sodný a 17 mmol/l trifluoroctová kyselina (pH 5,05) a methanol. Limity detekce byly stanoveny v rozmezí 15 – 50  $\mu$ g/l. Metoda byla použita pro stanovení čtyř aminů v devíti druzích vína a výsledky prokazují účinnou izolaci aminů a snížení vlivu pozadí <sup>[86]</sup>.

Stanovení alifatických aminů a diaminů bylo popsáno v publikaci autorů Huang a kolektiv. Deriváty byly připraveny reakcí 100  $\mu$ l vzorku, 600  $\mu$ l 2 mmol/l derivatizačního činidla v prostředí 200  $\mu$ l 0,2 mol/l borátového pufru (pH 7,5). Optimální reakční podmínky byly 50°C a 40 minut. K rozdělení látek byla využita kolona C18 (150  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m) a mobilní fáze methanol – voda. Limit detekce byl stanoven na 0,02 – 0,5 nmol/l <sup>[87]</sup>.

Skupina španělských vědců publikovala práci na stanovení polyaminů využívaných při výrobě polyuretanů a jako vytvrzovadla epoxidových pryskyřic. Derivatizační směs byla připravena dle Cohena a skládala se z 12  $\mu$ l aminu, 60  $\mu$ l 0,2 mol/l borátového pufru (pH 8,8) a 20  $\mu$ l AQC 10 mmol/l v acetonitrilu. Reakce probíhala 30 min při laboratorní teplotě bez přístupu světla. Separace proběhla na koloně C18 (150  $\times$  3 mm, 3,5  $\mu$ m). Složení mobilní fáze bylo inspirováno prací Hernández–Orte a kolektivu <sup>[86]</sup>. Limity detekce polyaminů byly v rozmezí 30 – 90  $\mu$ g/l <sup>[88]</sup>.



Tabulka 3: Shmutí rešeršní části

Derivatizační činidlo	Typ aminu	Derivatizační směs	Reakční podmínky	Stanovené množství	Reference
DNS-Cl	primární	1,0 ml 0,02 mol/l DNS-Cl, 5,0 ml 0,25 mol/l NaHCO <sub>3</sub> , 0,5 ml vzorku	20 minut při 60°C	LOD 0,3 – 0,5 ng	[56]
DNS-Cl	primární	400 µl DNS-Cl (5 mg/ml), 200 µl nasyceného roztoku NaHCO <sub>3</sub> , 0,2 ml vzorku	10 minut při 70°C	LOD 0,1 – 1 pmol	[58]
DNS-Cl	primární	900 µl 1 mmol/l DNS-Cl, 1 ml 10 mmol/l uhličitanového pufru (pH 9), 0,1 ml vzorku	10 minut při 70°C	LOD 10 ng/ml	[59]
DNS-Cl	primární	300 µl DNS-Cl (2 mg/ml), 300 µl 25 mmol/l uhličitanového pufru (pH 10,5), 35 – 50 µl vzorku	20 minut při 30°C	LOD 27,53 a 4,91 ng/ml	[62]
NBD-Cl	primární	100 µl NBD-Cl (4,2 mg/ml), 100 µl 25 mmol/l fosfátového pufru (pH 9), 5 – 100 µl vzorku	70 minut při 60°C	LOD 50 ng/ml	[65]
NBD-Cl	primární	100 µl NBD-Cl (10 mg/ml), 25 µl 0,25 mol/l borátového pufru (pH 10), 0,5 ml vzorku	15 minut při 60°C	LOD 0,4 – 0,5 µg/ml	[70]
NBD-Cl	primární	0,5 ml NBD-Cl (1 mg/ml), 2 ml borátového pufru (pH 7), vzorek	45 minut při 60°C	LOD 10 ng/ml	[71]

Derivatizační činidlo	Typ aminu	Derivatizační směs	Reakční podmínky	Stanovené množství	Reference
NBD-Cl	primární	2 – 4 molárním nadbytkem NBD-Cl, 10 molárním nadbytkem nasyceného Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , vzorek	12 hodin při 25°C	0,5 ng/ml	[72]
FMOC-Cl	primární	100 µl FMOC-Cl (0,2 mg/ml), 600 µl 0,2 mol/l borátového pufru (pH 10,4), 0,1 ml vzorku	1 minuta při 25°C	LOD 0,19 ng	[81]
FMOC-Cl	primární	50 µl 100 mmol/l FMOC-Cl, 1 ml 1 % uhličitanového pufru (pH 10), 250 µl vzorku	10 minut při 25°C	LOD 0,1 µg/ml	[83]
FMOC-Cl	primární	400 µl FMOC-Cl (6 mg/ml), 100 µl 2 mol/l borátového pufru (pH 8), 100 µl vzorku	20 minut při 0°C	LOD 10 ng/ml	[84]
AQC	primární	0,5 µl 10 mmol/l AQC, 6 µl borátového pufru (pH 8,8), 10 µl vzorku	5 minut při 65°C	LOD 5 – 50 µg/l	[85]
AQC	primární	600 µl 2 mmol/l derivatizačního činidla, 200 µl 0,2 mol/l borátového pufru (pH 7,5), 0,6 ml vzorku	40 minut při 50°C	LOD 0,02 – 0,5 nmol/l	[87]
AQC	primární	20 µl AQC 10 mmol/l, 60 µl 0,2 mol/l borátového pufru (pH 8,8), 12 µl vzorku	30 minut při 25°C	LOD 30 – 90 µg/l	[88]

Derivatizační činidlo	Typ aminu	Derivatizační směs	Reakční podmínky	Stanovené množství	Reference
DNS-Cl	sekundární	200 µl 0,1% DNS-Cl, 200 µl 0,5 mol/l NaOH, 1 ml vzorek	90 minut při 80°C	5 – 10 ng	[55]
DNS-Cl	sekundární	0.5 ml 0,2 mol/l DNS-Cl, 0,5 ml 0,2 mol/l uhličitanového pufru (pH 9), 0,1 ml vzorku	30 minut při 40°C	LOD 0,06 – 0,16 ng	[57]
DNS-Cl	sekundární	150 µl DNS-Cl (500 mg/l), 200 µl 0,5 mol/l NaHCO <sub>3</sub> , 0,1 ml vzorku	30 minut při 40°C	LOD 6 ng/l	[61]
DNS-Cl	sekundární	0,7 ml DNS-Cl ( $3,71 \cdot 10^{-5}$ mol/l), 4 ml 0,5 mol/l uhličitanového pufru (pH 10), vzorek	20 minut při 25°C	LOD 1 – 2 ng/ml	[63]
NBD-Cl	sekundární	900 µl acetonitrilu obsahující 3 mg NBD-Cl, 100 µl nasyceného roztoku Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , vzorek	30 minut při 50°C	LOD 7 ng	[64]
NBD-Cl	sekundární	1 ml NBD-Cl (1 mg/ml), 4 ml 50% methanolickeho fosfátového pufru (pH 7,2), 5 ml vzorku	60 minut při 70°C	LOD 0,11 µg/ml	[66]
NBD-Cl	sekundární	100 µl 3 mmol/l NBD-Cl, 25 µl 0,1 mol/l fosfátového pufru (pH 9), vzorek	120 minut při 50°C	LOD 2 ng/ml	[67]
NBD-Cl	sekundární	200 µl NBD-Cl (3,5 mg/ml), 200 µl 0,5 mol/l borátového pufru (pH 8,5), 1 ml vzorku	5 minut při 70°C	LOD 0,5 ng/ml	[68]

Derivatizační činidlo	Typ aminu	Derivatizační směs	Reakční podmínky	Stanovené množství	Reference
NBD-F	sekundární	30 µl 80 mmol/l NBD-F, 15 µl 0,2 mol/l fosfátového pufru (pH 6), 45 µl vzorku	10 minut při 60°C	LOD 30 – 85 ng/ml	[73]
NBD-F	sekundární	0,2 ml 1 mmol/l NBD-F, 2,6 ml 66 mmol/l fosfátového pufru (pH 7), 1 ml vzorku	10 minut při 70°C	LOQ 20 ng/ml	[74]
NBD-F	sekundární	2 ml 50 mmol/l NBD-F, 2 ml 50 mmol/l borátového pufru (pH 8), 2 ml vzorku	5 minut při 50°C	LOD 0,5 nmol/l	[75]
FMOC-Cl	sekundární	500 µl 15 mmol/l FMOC-Cl, 100 µl 1 mol/l borátového pufru (pH 8), 0,4 ml vzorku	40 sekund při 25°C	LOD 0,16 ng	[77]
FMOC-Cl	sekundární	2 ml 0,5 mol/l FMOC-Cl, 300 µl 0,125 mol/l borátového pufru (pH 9), vzorek	30 minut při 25°C	LOD 0,16 ng/ml	[80]
FMOC-Cl	sekundární	25 µl 0,36 mmol/l FMOC, 25 µl 0,2 mol/l borátového pufru (pH 9), 50 µl vzorku	15 minut při 25°C	LOD 0,6 ng/ml	[82]
DNS-Cl	primární, sekundární	900 µl 1 mmol/l DNS-Cl, 1 ml 10 mmol/l uhličitanového pufru (pH 9), 0,1 ml vzorku	15 minut při 85°C	LOD 2 – 15 µ/l	[60]
NBD-Cl	primární, sekundární	1 ml 0,2% NBD-Cl, 1 ml 0,2 mol/l borátového pufru (pH 9 a 8,5), 1 ml vzorku	15 a 20 minut při 70°C	LOD 3 a 7 ng/ml	[69]

Derivatizační činidlo	Typ aminu	Derivatizační směs	Reakční podmínky	Stanovené množství	Reference
NBD-F	primární, sekundární	30 µl 50 mmol/l NBD-F, 50 µl acetonitrilu, 20 µl 0,1 mol/l borátového pufru (pH 8), 10 µl vzorku	1 minuta při 60°C	LOD 23 fmol a 7 fmol	[76]
FMOC-Cl	primární, sekundární	25 µl FMOC-Cl ( $8,3 \cdot 10^{-4}$ mol/l), 1 ml 1 % uhličitanového pufru (pH 10), 250 µl vzorku	2 minuty při 25°C	LOD 5 a 10 ng/ml	[78]
FMOC-Cl	primární, sekundární	250 µl 25 mmol/l FMOC-Cl, 1 ml 1 % uhličitanového pufru (pH 10), 125 µl vzorku	2 minuty při 25°C	LOD 0,5 – 2,5 ng/ml	[79]
AQC	primární, sekundární	30 µl AQC, 50 µl 0,2 mol/l borátového pufru (pH 8,8), 20 µl vzorku	neuvedeno	LOD 15 – 50 µg/l	[86]

## 4 Experimentální část

Po provedení literární rešerše byly vybrány tři derivatizační činidla jako vhodné pro stanovení požadovaných aminů. Vzhledem k použití ostatních autorů se zdálo nejlepší činidlo FMOC-Cl. Jako další vhodné činidlo se jevílo NBD-F kvůli vysoké reaktivitě, které je však velmi finančně nákladné, proto byla jako alternativa zvoleno činidlo NBD-Cl. Třetí činidlo bylo vybráno DNS-Cl jako nejlépe popsané, cenově dostupné a nejčastěji používané. Podmínkou pro výběr činidla byla také reaktivnost s primárními i sekundárními aminy.

### 4.1 Použité chemikálie

Acetonitril – grade,  $\geq 99,9\%$ , Sigma–Aldrich (St. Louis, USA)

Butylamin (BUT), 99%, Alfa Aesar (Kandel, Německo)

Cyklohexylamin (CYK), 98%, Alfa Aesar (Kandel, Německo)

Dansyl chlorid,  $\geq 98\%$ , TCI (Tokyo, Japonsko)

Diethanolamin (DETA), p.a., Lach–Ner (Neratovice, ČR)

Diethylamin (DEA),  $\geq 99\%$ , Fluka (Steinheim, Švýcarsko)

Dimethylamin (DMA), 40% vodný roztok, Merk (Darmstadt, Německo)

Ethylendiamin (EDA),  $\geq 99\%$ , Fluka (Steinheim, Švýcarsko)

4–chlor–7–nitrobenzofurazan,  $\geq 99\%$ , Alfa Aesar (Karlsruhe, Německo)

9–(fluorenyl)ethylchloromravenčan,  $\geq 98\%$ , Fluka (Steinheim, Švýcarsko)

Hydrogenuhlíčan sodný,  $\geq 99,7\%$ , Merk (Darmstadt, Německo)

Hydroxid sodný, p.a., PENTA (Chrudim, ČR)

Isobutylamin (iBUT), 99%, ACROS ORGANICS (New Jersey, USA)

Isopropylamin (iPROP),  $\geq 99\%$ , Alfa Aesar (Kandel, Německo)

Kyselina boritá, p.a., Lach–Ner (Neratovice, ČR)

Morfolin (MORF), technický, VWR CHEMICALS (Rue Carnot, Francie)

n – hexan,  $\geq 97\%$ , Sigma–Aldrich (Steinheim, Německo)

n – pentan,  $\geq 99\%$ , LAB–SCAN (Dublin, Irsko)

Propylamin (PROP),  $\geq 99\%$ , ACROS ORGANICS (New Jersey, USA)

Pyridin (PYR), p.a., Lach–Ner (Neratovice, ČR)

*sec*–butylamin (*sec*-BUT), 99%, ACROS ORGANICS (New Jersey, USA)

*terc*–butylamin (*terc*-BUT), 99%, ACROS ORGANICS (New Jersey, USA)

Triethanolamin (TETA), p.a., VEB LABORCHEMIE APOLDA (Apolda ,Německo)

Triethylamin (TEA), p.a., Lach–Ner (Neratovice, ČR)

## 4.2 Použité přístroje a zařízení

Kapalinový chromatograf od firmy Shimadzu (Japonsko) byl složen z řídicí jednotky SCL – 10A, fluorescenčního detektoru RF – 20A xs, termostatu CTO – 10 ASVP vyhřívající prostředí kolony na 25°C, kolony KINETEX EVO – C18 (150 mm × 4,6 mm, 2,6 μm) s ochranou předkolonkou C18 (4 × 3 mm), autosampleru SIL – 10AD dávkujícího 20 μl vzorku, odplyňovače DGU – 14A a dvou pump LC – 10AD. U fluorescenčního detektoru bylo možné nastavit dva parametry a to citlivost na low, medium nebo high a gain na 1x, 4x nebo 16x.

Filtrační aparatura s nylonovou membránou 0,45 μm sloužila pro filtraci redestilované vody používané jako mobilní fáze. Před použitím byly složky mobilní fáze vloženy do ultrazvuku PS 3000A (Slovensko) na 10 minut pro vypuzení rozpuštěného vzduchu. Redestilovaná voda byla odebírána z demistanice Milli–Q (Merck, Německo).

Pro kontrolu pH borátového a uhličitanového pufru stabilizující vzniklý derivát byl použit pH metr Thermo Orion model 310 (Thermo Electron Corp, USA). Ten byl před použitím kalibrován pomocí dvou kalibračních roztoků o pH 4,01 a 7,00. K promíchání jednotlivých složek nutných k derivatizaci byla využita elektrická míchačka YELLOW LINE s intenzitou 2 200 otáček/min. Pokud bylo třeba docílit vyšší reakční teploty, byla použita sušárna Memmert UM400 (Mettler GmbH, Německo) na předem vytemperovanou teplotu. K odstředění vzorků byla využita centrifuga Spectrafuge 16M (Labnet, USA) s nastavenou rychlostí 3 rpm.

## 4.3 Příprava roztoků

Teoretické množství na přípravu 25 ml zásobního roztoku 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčanu o koncentraci 0,15 mol/l bylo 0,9701 g Fmoc-Cl. Navážené množství bylo rozpuštěno v acetonitrilu a byla výpočtena skutečné koncentrace. Následovalo naředění do 50 ml obměrné baňky na koncentraci roztoku 15 mmol/l. Borátový pufr o koncentraci 1 mol/l byl připraven rozpuštěním 6,2 g kyseliny borité ve 100 ml redestilované vody. Po rozpuštění byl přidáván roztok NaOH do pH 8.

Teoretické množství na přípravu 25 ml zásobního roztoku dansyl chloridu o koncentraci 0,02 mol/l bylo 0,1349 g DNS-Cl. Navážené množství bylo rozpuštěno v acetonitrilu a byla výpočtena skutečné koncentrace. Následovalo naředění do 50 ml obměrné baňky na koncentraci roztoku 2 mmol/l. Uhličitanový pufr o koncentraci 0,5 mol/l byl připraven rozpuštěním 4,2 g hydrogenuhličitanu sodného ve 100 ml redestilované vody. Po rozpuštění byl přidáván roztok NaOH do pH 9.

Teoretické množství na přípravu 25 ml zásobního roztoku 4-chlor-7-nitrobenz-2,1,3-oxadiazolu o koncentraci 0,1 mol/l bylo 0,4988 g NBD-Cl. Navážené množství bylo rozpuštěno v acetonitrilu a byla výpočtena skutečné koncentrace. Následovalo naředění do 50 ml obměrné baňky na koncentraci roztoku 10 mmol/l. Borátový pufr o koncentraci 0,5 mol/l byl připraven rozpuštěním 3,1 g kyseliny borité ve 100 ml redestilované vody. Po rozpuštění byl přidáván roztok NaOH do pH 8,5.

Roztoky aminů byly připraveny rozředěním zásobních roztoků do 10 ml a 25 ml obměrných baněk, které byly doplněny redestilovanou vodou (u extrakcí byly doplněny acetonitrilem).

#### **4.4 Metoda pro 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčan**

Základní prvky metody byly inspirovány prací Margarity Rodriguez López a kolektivu<sup>[77]</sup>. V této diplomové práci bylo optimalizováno složení mobilní fáze, množství derivatizačního a extrakčního činidla. Jako modelový amin byl využíván dimethylamin. Emisní vlnová délka byla nastavena na hodnotu 265 nm a excitační vlnová délka na hodnotu 310 nm. Citlivost fluorescenčního detektoru byla pro optimalizaci nastavena na hodnotu medium 4x, neboť při vyšší citlivosti píky přesahovaly mez detektoru. Pro zjištění LOD byly na detektoru nastaveny parametry medium 16x.

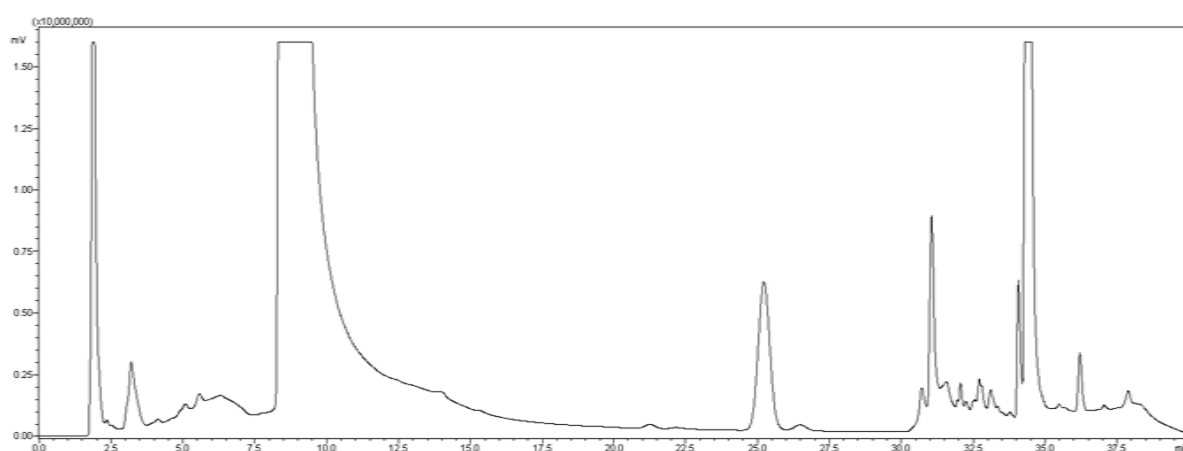
##### **4.4.1 Optimalizace metody 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčan**

Deriváty byly připraveny v 5 ml nádobce smícháním 400  $\mu$ l DMA (u slepého pokusu 400  $\mu$ l redestilované vody), 500  $\mu$ l 15 mmol/l Fmoc-Cl (v acetonitrilu) a 100  $\mu$ l 1 mol/l borátového pufru (pH 8). Tato směs byla míchána po dobu 2 minut, poté byly přidány 2 ml hexanu jako extrakčního činidla a směs se míchala 40 sekund. Do kapalinového chromatografu bylo dávkováno 20  $\mu$ l vodné fáze. Jelikož se v chromatogramu nacházelo

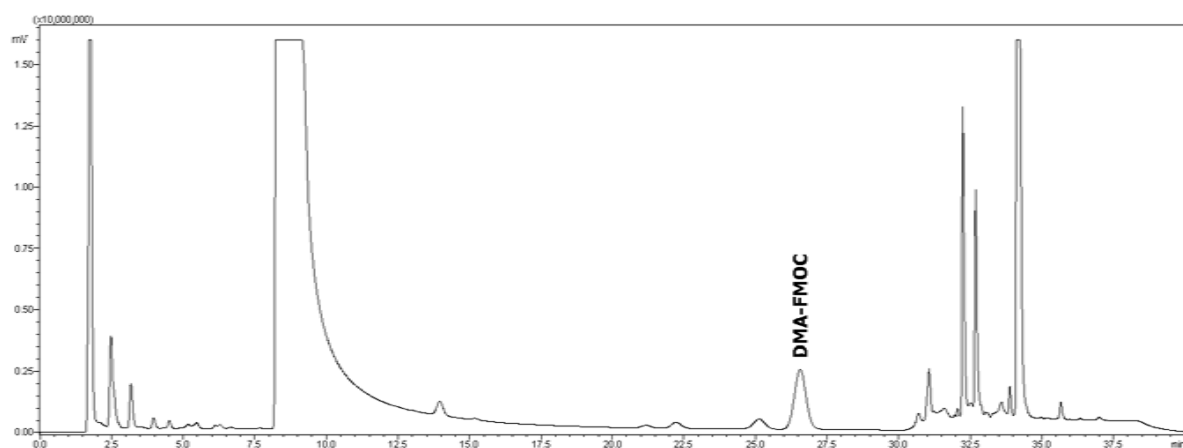


velké množství píků, bylo nutné nejprve identifikovat pík derivátu DMA-FMOC. K tomu sloužilo porovnání s chromatogramem slepého pokusu (obrázek 11) s koncentracemi DMA  $1 \cdot 10^{-2}$  mol/l a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l (obrázek 12). Nepříjemností však byl velký vliv pozadí, což vedlo ke snížení citlivosti metody.

Mobilní fáze byla složena z vody (pumpa A) a acetonitrilu (pumpa B) v poměru 60:40 (v/v). Po identifikaci píku DMA-FMOC v 26,5 minutě bylo pro zkrácení doby analýzy upraveno složení mobilní fáze. Gradientová eluce byla nastavena 0 – 31 min 40% (v/v) B, 32 min 85% (v/v) B, 39 min 85% (v/v) B, 40 min 40% (v/v) B, 42 min 40% (v/v) B s celkovým průtokem 0,7 ml/min.



Obrázek 11: Chromatogram slepého pokusu FMOC-Cl



Obrázek 12: Chromatogram DMA-FMOC (koncentrace DMA  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l)

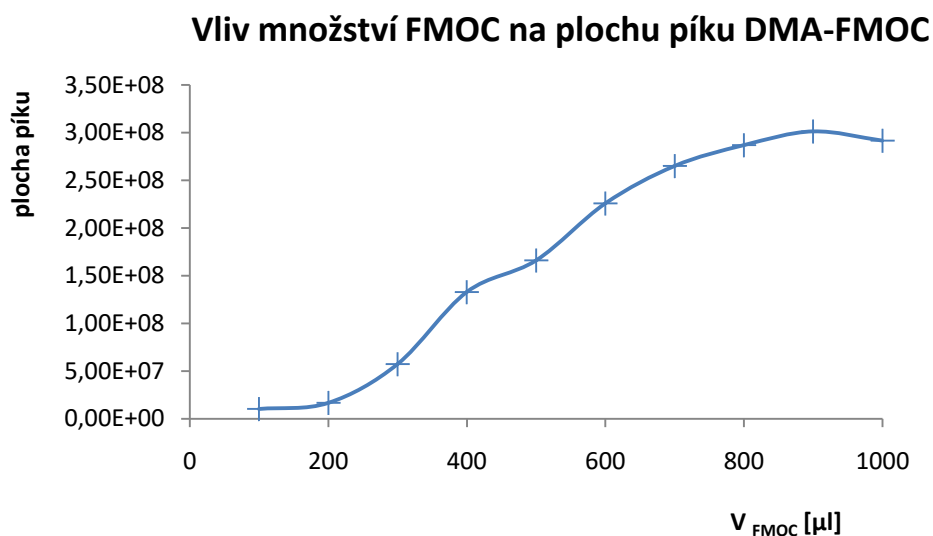
Jelikož literatura uvádí možnost použití více extrakčních činidel, byl zkoumán vliv zvoleného činidla <sup>[49]</sup>. Z ekologického a bezpečnostního důvodu byly opomenuty chlorované látky. Jako vhodné látky byly k testování vybrány n-pentan a n-hexan. Vliv zvoleného extrakčního činidla byl pozorován v závislosti na změně plochy píku zderivatizovaného aminu. Aby bylo zamezeno zkreslení výsledků vlivem pozadí, byly výsledky porovnány se slepými pokusy. Derivát byl připraven stejně jako v předchozím případě, kdy byl DMA použit v koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l. V obou případech byla derivatizace provedena 3krát a poté každý derivát 3krát změřen. Výsledné průměry ploch z jednotlivých měření jsou uvedeny v tabulce 4. Průměry ploch byly porovnány a výsledky vykazují rozdíl při použití pentanu a hexanu. Rozdíl byl téměř 20%. Toto zjištění vedlo ke zvolení pentanu jako extrakčního činidla.

Tabulka 4: Vliv extrakčního činidla na plochu píku

Extrakční činidlo	pentan	hexan
Průměr ploch	234644157 ± 4639038	184134899 ± 3181078
	225689230 ± 4052384	182539527 ± 3048515
	223901737 ± 1182575	181225456 ± 2168327

Jako další možný faktor ovlivňující výtěžek derivatizace bylo zkoumáno množství derivatizačního činidla. Deriváty byly tentokrát připraveny smícháním 400 µl 0,1 mmol/l DMA, 100 µl 1 mol/l borátového pufru (pH 8) a příslušného množství 15 mmol/l FMOC-Cl. Tato směs byla míchána po dobu 2 minut, poté byly přidány 2 ml pentanu a směs byla opět míchána 40 sekund. Testováno bylo množství od 100 µl do 1 000 µl. Deriváty byly opět připraveny vždy 3x a každý byl 3krát změřen. Z naměřených hodnot znázorněných v grafu 1 vyplývá, že plocha píku je výrazně závislá na množství derivatizačního činidla. Významnější nárůst začíná od 300 µl FMOC-Cl a pokračuje do hodnoty 900 µl FMOC-Cl. Právě při množství 900 µl FMOC-Cl byla zaznamenána největší plocha píku. Velmi blízké jsou i hodnoty při použití 800 µl a 1 000 µl FMOC-Cl, neboť v obou případech je úbytek menší než 5 %. Při zvyšujícím se množství FMOC-Cl

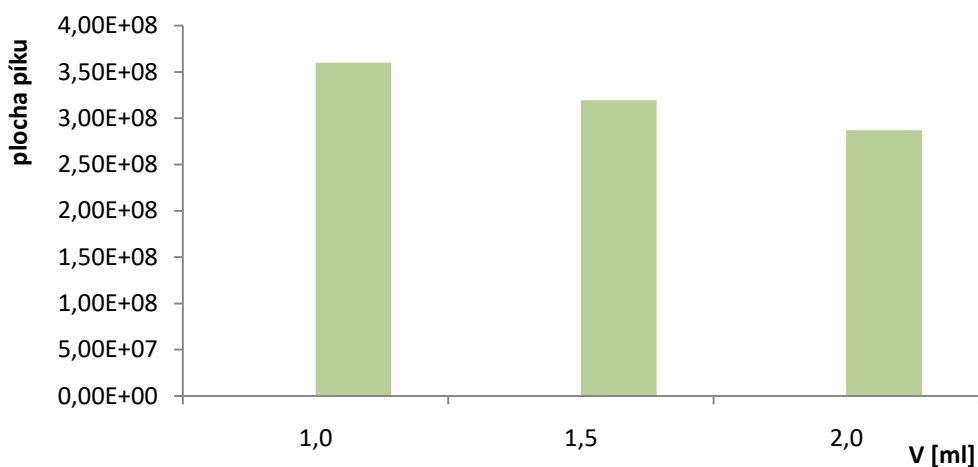
nedocházelo k výraznějšímu vlivu na pozadí, proto bylo vyhodnoceno jako nejvhodnější množství 900  $\mu\text{l}$  FMOC-Cl.



Graf 1: Vliv množství FMOC-Cl na plochu píku DMA-FMOC

Jelikož se do pentanu extrahuje i vzniklý derivát, byl tento nežádoucí úbytek zmírněn snížením množství extrakčního činidla. Derivatizace byla provedena smícháním 100  $\mu\text{l}$  1 mol/l borátového pufru, 400  $\mu\text{l}$  0,1 mmol/l DMA a 900  $\mu\text{l}$  15 mmol/l FMOC-Cl. Směs byla míchána 120 sekund a poté 40 sekund po přidání extrakčního činidla. Testováno bylo 2 000, 1 500, 1 000 a 500  $\mu\text{l}$  pentanu. Vliv množství pentanu byl opět sledován v závislosti na ploše píku derivátu a výsledky jsou znázorněny v grafu 2. Při snížení množství pentanu došlo k růstu plochy derivátu, aniž by došlo k výraznějšímu zvýšení pozadí. Snížení je však možné pouze na množství 1 ml, neboť při nižším množství dochází k překrytí chromatogramu píkem derivatizačního činidla. Při porovnání použití 1 a 2 ml pentanu je nárůst plochy píku přibližně o 21 %. Z tohoto důvodu bylo původní množství sníženo na 1 ml pentanu.

### Vliv množství pentanu na plochu píku DMA-FMOC

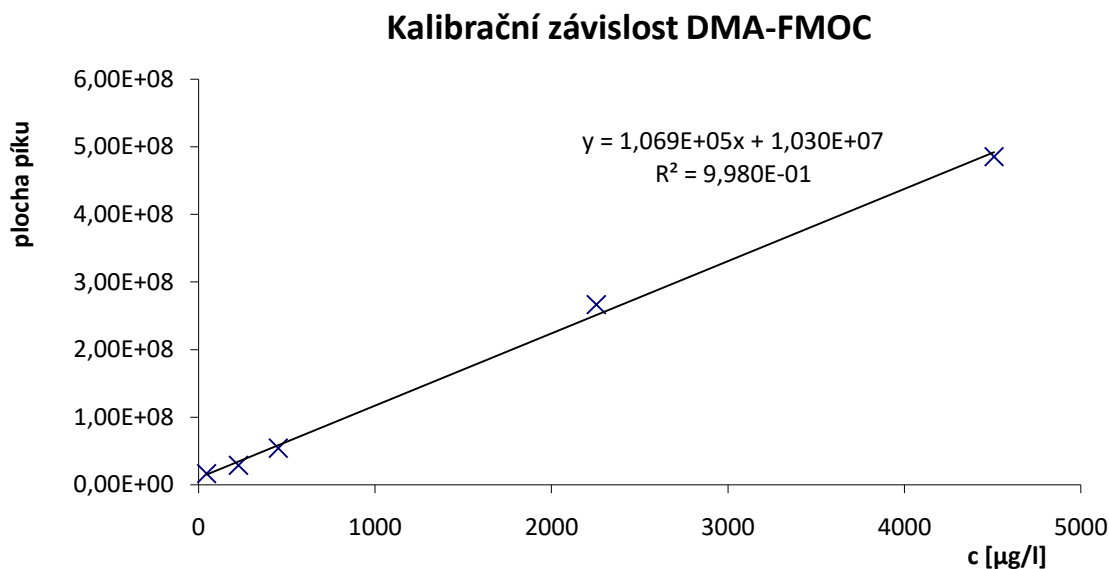


Graf 2: Vliv množství pentanu na plochu píku DMA-FMOC

#### 4.4.2 Kalibrace metody

Po zjištění optimálních podmínek pro vznik derivátu, byla proměřena kalibrační závislost. V této závislosti byla vyhodnocena její lineární část a zjištěn limit detekce. Derivát byl vždy připraven smícháním 100  $\mu\text{l}$  1 mol/l borátového pufru, 400  $\mu\text{l}$  DMA o příslušné koncentraci a 900  $\mu\text{l}$  15 mmol/l FMOC-Cl. Směs byla míchána 120 sekund a poté 40 sekund po přidání 1 ml extrakčního činidla. Pro správnost metody byla provedena validace kalibrační závislosti. Podmínkou úspěšné validace je maximální odchylka nejnižšího bodu do 20 % a ostatních bodů do 15 %.

Kvůli dosažení co nejnižšího LOD, byly nižší koncentrace proměřeny s vyšší citlivostí detektoru. Nejprve byly na detektoru nastaveny parametry medium 4x a poté byly proměřeny koncentrace od  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l do  $5 \cdot 10^{-7}$  mol/l DMA. Z naměřených dat byla vyhodnocena lineární část, která byla od  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l do  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l DMA. Hodnoty byly vyneseny do grafu 3 a jejich linearita byla zhodnocena pomocí koeficientu determinace  $R^2$ , který měl hodnotu 0,9980.



Graf 3: Kalibrační závislost DMA-FMOC

Pro dosažení nižšího LOD byly nastaveny parametry detektoru na citlivější hodnotu medium 16x. Při tomto nastavení byly proměřeny koncentrace  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l do  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l DMA. Vyšší koncentrace nebylo možné proměřit, neboť přesahovaly kapacitu detektoru. Jako limit detekce byla v tomto případě zvolena koncentrace, jejíž plocha byla prokazatelně větší než plocha pozadí ve slepém pokusu. Při tomto nastavení detektoru je limit detekce  $22,5 \mu\text{g/l}$  (tj.  $5 \cdot 10^{-7}$  mol/l).

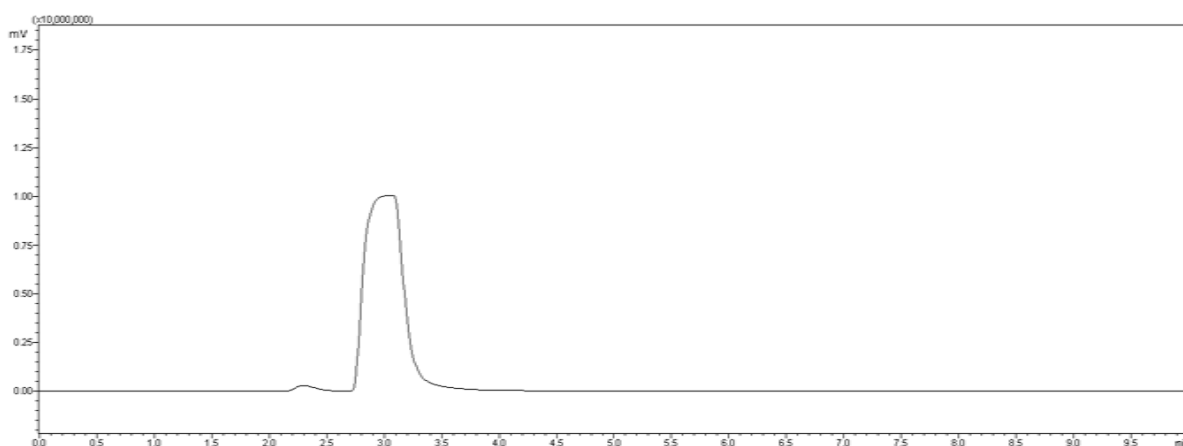
#### 4.5 Metoda pro dansyl chlorid

Metoda vychází z prací pro stanovení *N*-nitrosodimethylaminu <sup>[61]</sup> a polyaminů v moči <sup>[59]</sup>. Opět bylo optimalizováno složení mobilní fáze, množství derivatizačního, reakční čas a teplota. Jako modelový amin byl použit dimethylamin stejně jako v předchozím případě, aby bylo možné metody porovnat. Emisní a excitační vlnové délky byly nastaveny na hodnotu 340 nm a 530 nm. Jelikož dansyl chlorid nevykazoval fluorescenci pozadí, bylo možné ihned nastavit citlivost detektoru na vyšší hodnotu. Pro optimalizaci byly nastaveny parametry na hodnoty high 4x. Pro zjištění LOD byl detektor přenastaven na citlivější high 16x.

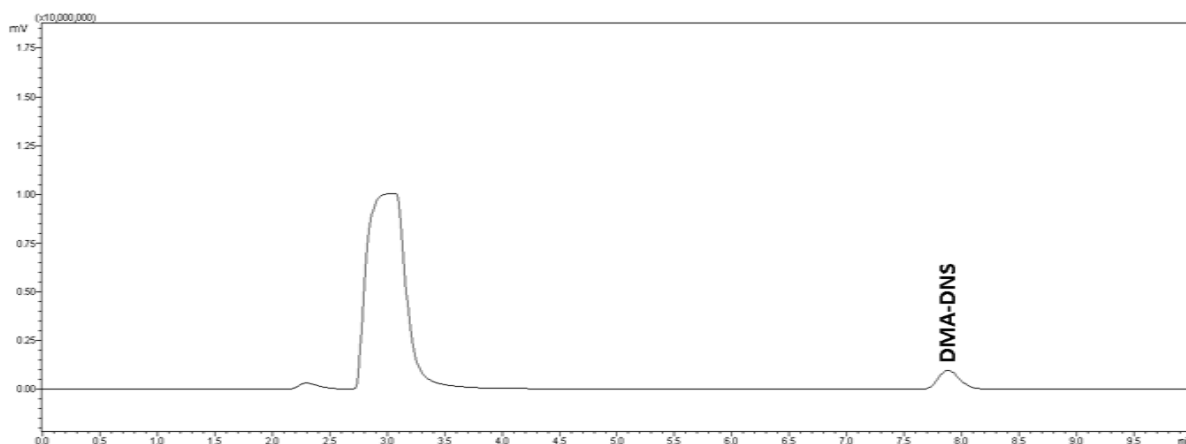
### 4.5.1 Optimalizace metody

Derivatizace byla opět prováděna v 5 ml nádobkách, ve kterých bylo smícháno 400  $\mu\text{l}$  DMA (u slepého pokusu 400  $\mu\text{l}$  redestilované vody), 400  $\mu\text{l}$  0,5 mol/l  $\text{NaHCO}_3$  (pH 9) a 300  $\mu\text{l}$  2 mmol/l DNS-Cl (v acetonitrilu). Tato směs byla 20 sekund míchána a poté vložena do sušárny, která byla předem vyhřátá na 70°C. Reakce probíhala 10 minut a poté byly deriváty ochlazeny ve vodní lázni na pokojovou teplotu. Zvýšená teplota způsobuje rozklad derivatizačního činidla, což zapříčiňuje odstranění jeho nadbytku a není třeba používat extrakci. Tento proces dokazuje odbarvení původně žlutého roztoku. Po ochlazení bylo do chromatografu dávkováno 20  $\mu\text{l}$  pomocí autosampleru. K identifikaci píku DMA-DNS sloužilo porovnání blanku (obrázek 13) s koncentracemi aminu  $1 \cdot 10^{-2}$  mol/l a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l (obrázek 14). Po nalezení píku DMA-DNS byla proměřena excitační (příloha 1) a emisní (příloha 2) spektra. Po vyhodnocení byla nalezena maxima  $\lambda_{\text{EX}}$  v 344 nm a  $\lambda_{\text{EM}}$  526 nm a tyto hodnoty byly nastaveny pro další měření.

Mobilní fáze byla složena z vody (pumpa A) a acetonitrilu (pumpa B) v poměru 60:40 (v/v). Po identifikaci píku DMA-DNS v 30,1 minutě bylo pro zkrácení doby analýzy upraveno složení mobilní. Jako ideální poměr byl zjištěn 40:60 % (v/v) s celkovým průtokem 0,5 ml/min. Touto změnou byla doba analýzy zkrácená na 10 min a derivát DMA-DNS eluoval v 7,8 minutě. Jelikož nedocházelo k eluci dalších píku, nebylo nutné využívat gradientovou eluci.



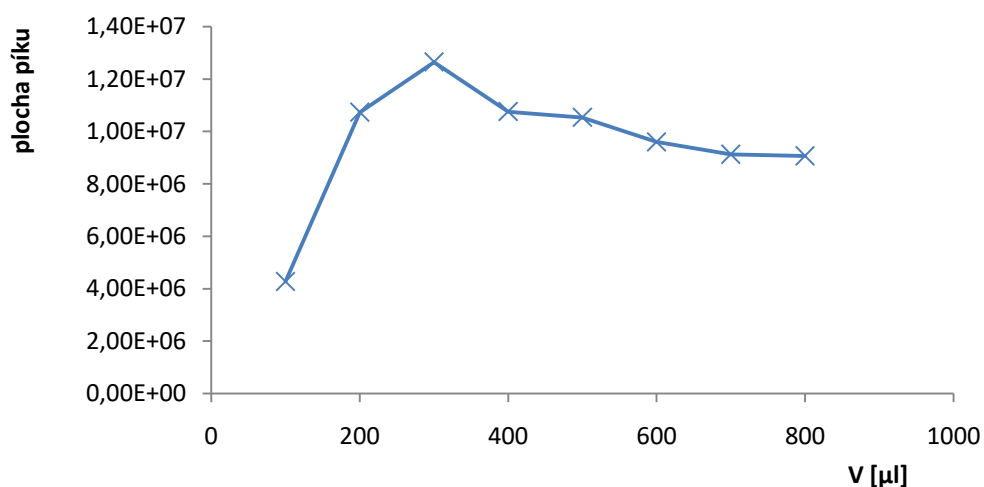
Obrázek 13: Chromatogram slepého pokusu DNS-Cl



Obrázek 14: Chromatogram DMA-DNS (koncentrace DMA  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l)

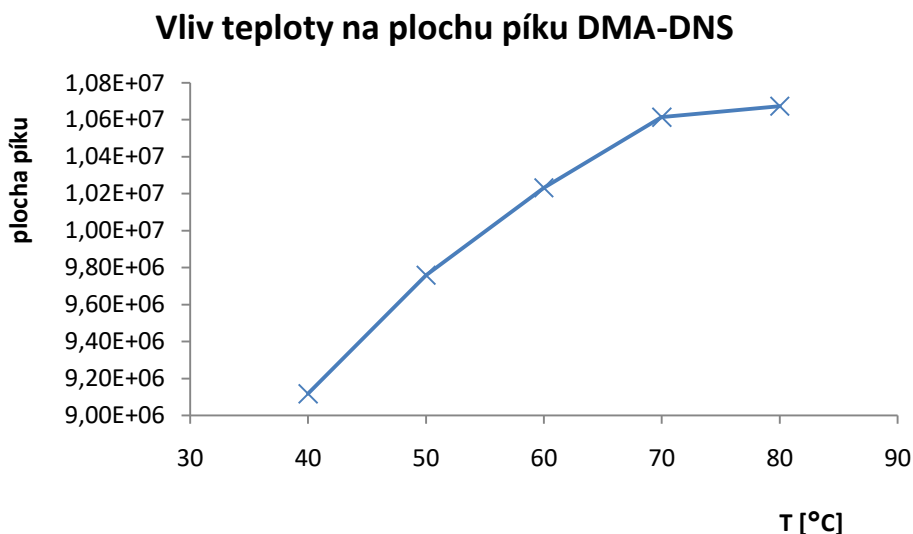
Podobně jako v předchozím případě byl zkoumán vliv množství činidla na výtěžek derivátu. Derivát byl připraven smícháním 400  $\mu$ l 0,1 mmol/l DMA, 400  $\mu$ l 0,5 mol/l  $\text{NaHCO}_3$  (pH 9) a příslušného množství 2 mmol/l DNS-Cl. Směs byla míchána 20 sekund a poté reagovala 10 minut při 70°C. Testováno bylo množství od 100  $\mu$ l do 800  $\mu$ l DNS-Cl. Deriváty byly připraveny vždy 3krát a každý byl 3krát změřen. Naměřené hodnoty byly vyneseny do grafu 4 a vyhodnoceny. Plocha píku roste do hodnoty 300  $\mu$ l DNS-Cl a následně při větším množství derivatizačního činidla plocha píku mírně klesá. Z toho vyplývá, že nejvhodnější množství je právě 300  $\mu$ l DNS-Cl. Aby nedocházelo ke zkreslení výsledků vlivem pozadí či jiným způsobem, byla data při optimalizaci porovnávána se slepými pokusy. V žádném z uvedených případů ke zkreslení nedocházelo.

#### Vliv množství DNS-Cl na plochu píku DMA-DNS



Graf 4: Vliv množství DNS-Cl na plochu píku DMA-DNS

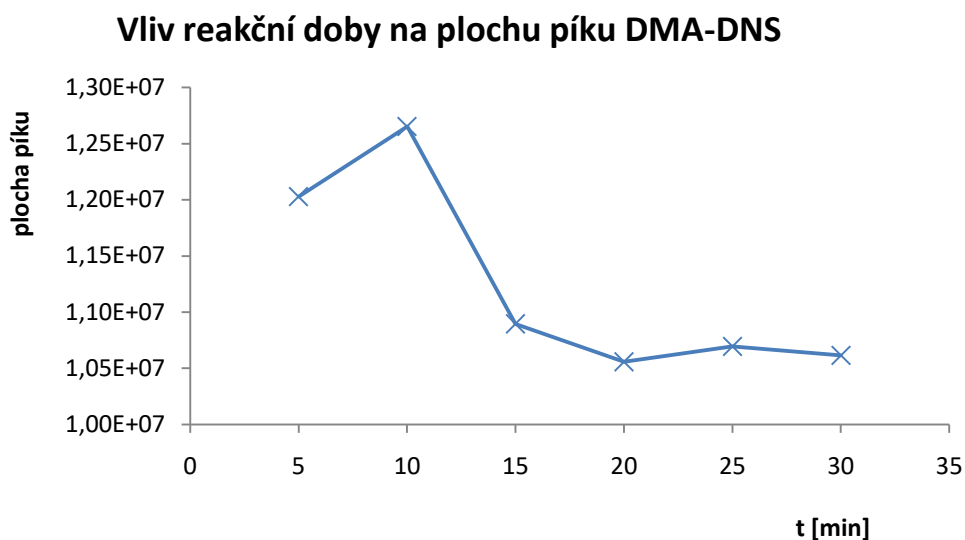
Možné zvýšení výtěžnosti derivatizace bylo testováno změnou reakční teploty. Vliv reakční teploty byl zkoumán pomocí plochy píku DMA-DNS. Deriváty byly připraveny stejným způsobem jako v předchozím případě. Reakční teploty byly zkoumány v rozmezí 40–80°C. Reakční doba byla pozměněna na 30 minut, aby reakce proběhla i u nižších teplot. Výsledky jsou znázorněny na grafu 5, ze kterých byla vyhodnocena teplota 70°C jako nejvhodnější, protože u teploty 80°C je nárůst plochy píku již nepatrný.



Graf 5: Vliv teploty na plochu píku DMA-DNS

Jako další vliv na výtěžnost derivatizace byla testována reakční doba. Deriváty byly připraveny opět stejným způsobem jako v předchozích případech. Směs se nechala reagovat zvolenou dobu při 70°C. Reakční doba byla testována od 5 do 30 minut. Výsledky měření jsou shrnuty v grafu 6. Největší výtěžnost byla zaznamenána při reakční době 10 minut. Těmito testy bylo ověřeno, že nejvhodnější jsou původní reakční podmínky.



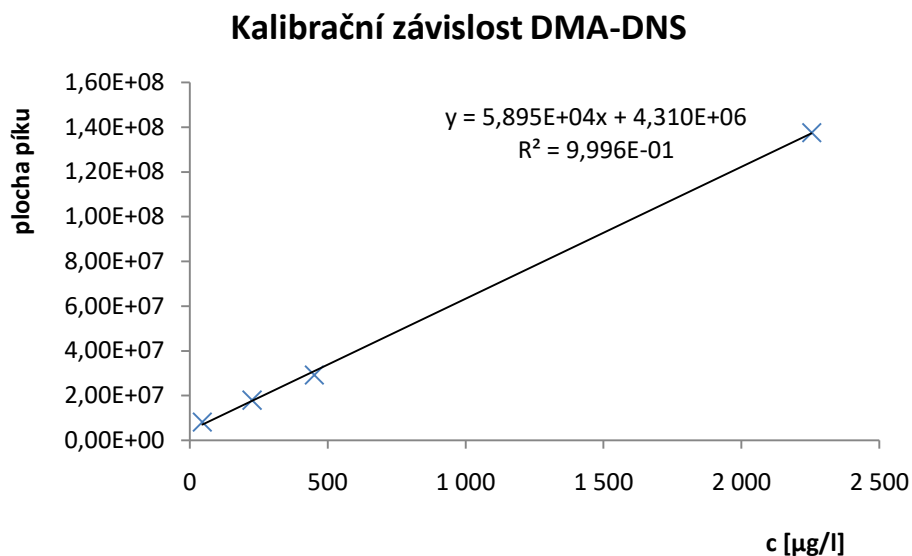


Graf 6: Vliv reakční doby na plochu píku DMA-DNS

#### 4.5.2 Kalibrace metody

Po provedení optimalizace byla proměřena kalibrační závislost a zjištěný LOD. Deriváty byly připraveny smícháním 400  $\mu\text{l}$  0,5 mol/l uhličitanového pufru, 400  $\mu\text{l}$  DMA o příslušné koncentraci a 300  $\mu\text{l}$  2 mmol/l DNS-Cl. Směs byla míchaná 20 sekund a poté umístěna na 10 minut do předem vyhřáté sušárny na 70°C. Derivatizace byla pro každou koncentraci provedena 3krát a vzorek poté 3krát změřen při citlivosti detektoru high 4x. Naměřená data poté byla validována, kdy podmínkou úspěšné validace byla maximální odchylka nejnížší koncentrace do 20 % a ostatních do 15 %.

Koncentrace pro kalibrační závislost byly zvoleny od  $10^{-4}$  mol/l do  $5 \cdot 10^{-7}$  mol/l DMA. Lineární část byla vyhodnocena v koncentračním rozmezí  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l až  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Hodnoty byly vyneseny do grafu 7 a linearita zhodnocena pomocí koeficientu determinace  $R^2$ , který měl hodnotu 0,9996.



Graf 7: Kalibrační závislost DMA-DNS

Jelikož DMA-DNS nevykazoval vysokou fluorescenci, je možné zvýšit citlivost detektoru na maximální hodnotu high 16x, a tím snížit LOD. Při tomto nastavení byly proměřeny koncentrace  $5 \cdot 10^{-7}$  mol/l,  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l a  $5 \cdot 10^{-8}$  mol/l. Současně byly proměřeny i slepé pokusy, které sloužily k porovnání vlivu pozadí. Při porovnání naměřených hodnot byl limit detekce stanovený na 4,51  $\mu\text{g/l}$  (tj.  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l DMA), protože při koncentraci DMA  $5 \cdot 10^{-8}$  mol/l nebylo možné s naprostou jistotou určit, zda se nejedná již o vliv pozadí.

## 4.6 Metoda pro 4-chlor-7-nitrobenz-2,1,3-oxadiazol

Vzorovou metodou pro vytvoření postupu na stanovení aminů sloužila práce zabývající se stanovením léčiv saxagliptinu a vildagliptinu <sup>[69]</sup>. Optimalizace podmínek probíhala stejně jako u metody DNS-Cl a modelový amin byl opět zvolen dimethylaminem. Emisní a excitační vlnové délky byly nastaveny dle původní metody na hodnotu 470 nm a 540 nm. Citlivost detektoru pro optimalizaci byla nastavena opět na hodnotu high 4x.

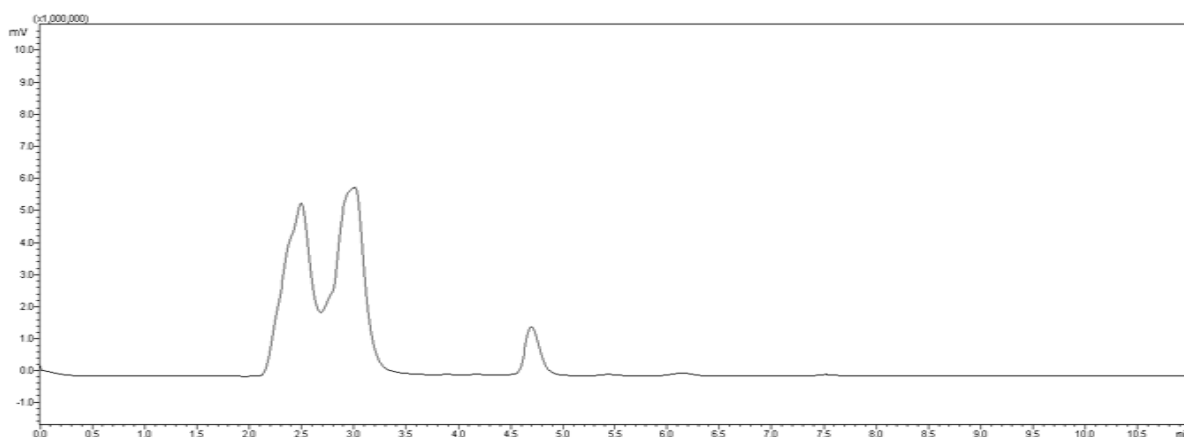
### 4.6.1 Optimalizace metody

Deriváty byly připraveny v 5 ml nádobkách smísením 400  $\mu\text{l}$  DMA (u slepého pokusu 400  $\mu\text{l}$  redestilované vody), 400  $\mu\text{l}$  0,5 mol/l borátového pufru (pH 8,5) a 400  $\mu\text{l}$  10 mmol/l NBD-Cl (v acetonitrilu). Tato směs byla míchána 20 sekund a poté vložena na 20 minut do

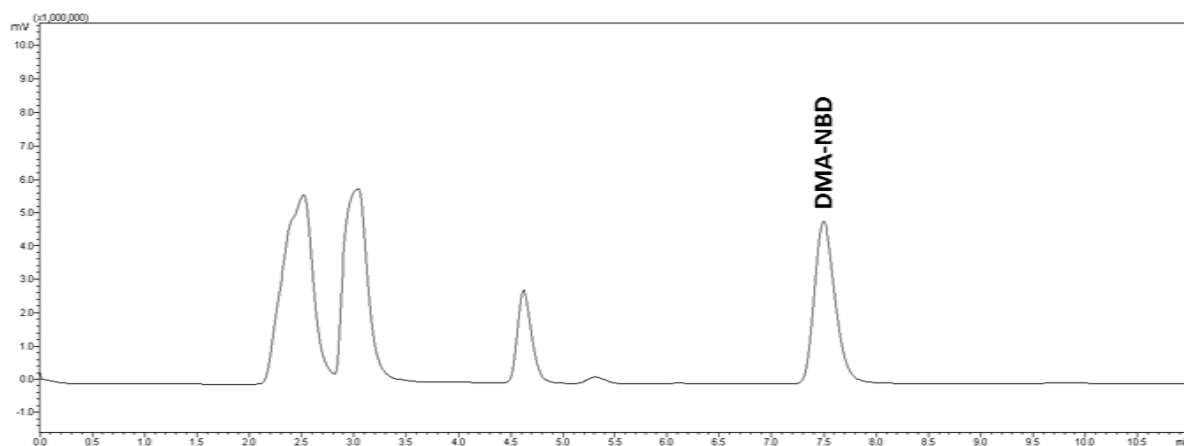
sušárny vytemperované na 70°C. Po proběhnutí reakce byla směs ochlazená na laboratorní teplotu a dávkována do kapalinového chromatografu.

K určení píku DMA-NBD bylo použito opět porovnání slepého pokusu (obrázek 15) a koncentrací DMA  $1 \cdot 10^{-2}$  mol/l a  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l (obrázek 16). Po identifikaci DMA-NBD byla proměřena excitační (příloha 3) a emisní (příloha 4) spektra. Nejvyšší intenzity byly zaznamenány v excitačním spektru při 477 nm a v emisním spektru při 544 nm. Tyto hodnoty byly nastaveny u všech dalších měření.

Pro identifikaci píku DMA-NBD bylo složení mobilní fáze nastaveno izokraticky v poměru 60:40 (v/v) voda – acetonitril s celkovým průtokem 0,5 ml/min. Derivát byl při tomto složení eluován v 7,7 minutě. Jelikož v chromatogramu nebyly žádné další píky a doba analýzy byla vyhovující, bylo toto složení mobilní fáze zvoleno za ideální.

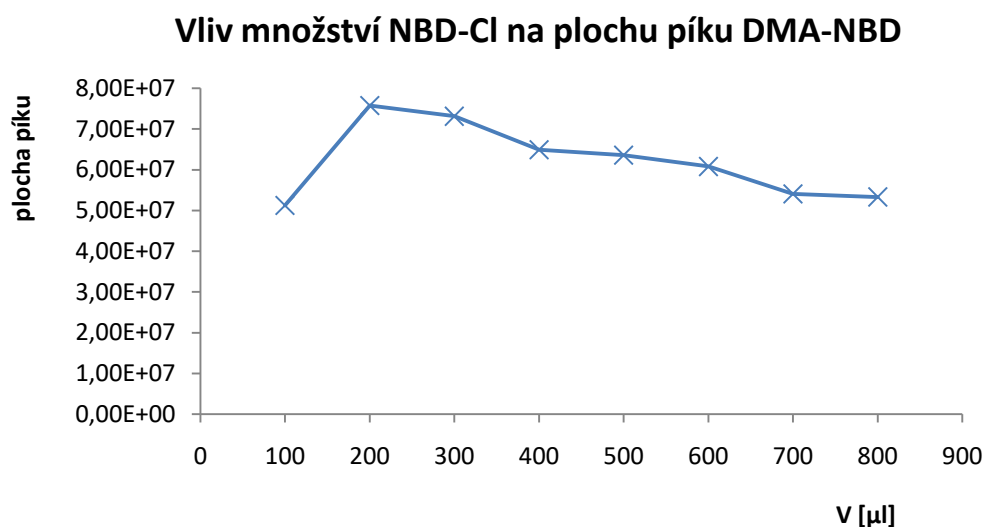


Obrázek 15: Chromatogram slepého pokusu NBD-Cl



Obrázek 16: Chromatogram DMA-NBD (koncentrace DMA  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l)

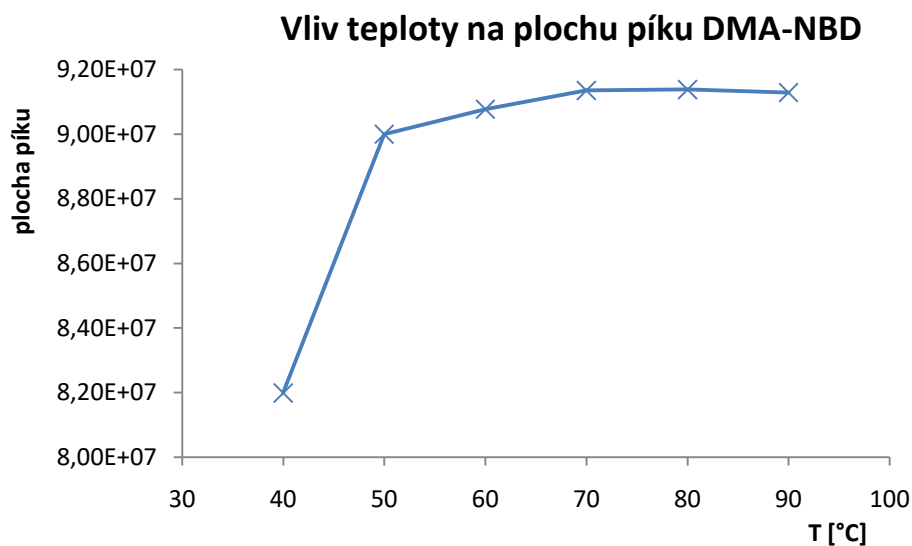
Stejně jako v předchozích dvou případech byl jako první testován význam množství derivatizačního činidla na výtěžek derivatizace. Vliv byl hodnocen pomocí plochy píku DMA-NBD. Deriváty byly připraveny stejným způsobem jako v předchozím případě, pouze se měnilo množství činidla. K derivatizaci byly použity objemy od 100  $\mu\text{l}$  do 800  $\mu\text{l}$  NBD-Cl a naměřené hodnoty byly znázorněny na grafu 8. Jako vhodné množství bylo vyhodnoceno 200  $\mu\text{l}$  NBD-Cl, neboť při tomto objemu byla plocha píku největší. Vliv pozadí či jiného zkreslení výsledků bylo kontrolováno opět srovnáváním se slepými pokusy. Ani s rostoucími objemy NBD-Cl nedocházelo k ovlivnění pozadí.



Graf 8: Vliv množství NBD-Cl na plochu píku DMA-NBD

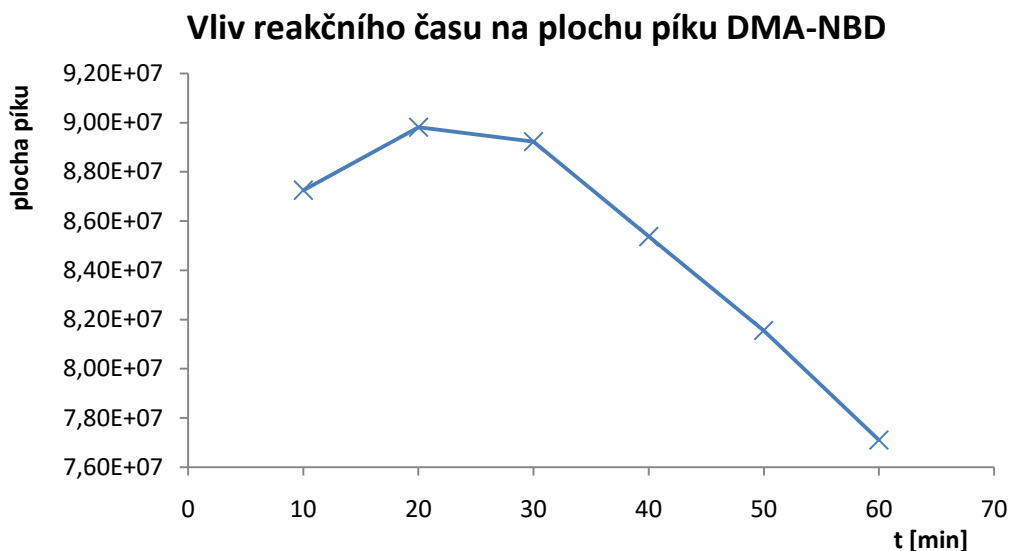
Jelikož se v literatuře uvádí široké rozmezí teplot pro derivatizaci, byl zkoumán vliv teploty na výtěžek derivatizace. Deriváty byly připraveny stejným způsobem jako v předchozích případech. Doba reakce byla zachována na 20 minut. Změněna byla pouze reakční teplota, která byla testována v rozmezí 40 – 90°C a výsledky jsou znázorněny na grafu 9. Z naměřených hodnot vyplývá, že při reakční době 20 min je teplota 40°C nedostačující. Naopak u teplot 50 – 90°C se průměry ploch píků neliší více než o 2 %. Nejvyšší průměrná plocha píku DMA-NBD byla zaznamenána při 70°C. Z důvodu velmi blízkých výsledků bylo zvoleno jako výběrové kritérium rozptyl dat jednotlivých měření. Toto vyhodnocení bylo realizováno pomocí funkce MS Excel Analýza dat metoda Anova: Jeden faktor. Výsledkem testu (příloha 5) byl nejnižší rozptyl dat u teploty 80°C, která byla vybrána jako nejvhodnější.

Vliv reakční teploty měl výrazný vliv na zbarvení roztoků, neboť původní čiré roztoky se zbarvily do žluto–oranžova až tmavě hněda. Zbarvení roztoku se rostoucí teplotou posouvalo k tmavším odstínům.



Graf 9: Vliv teploty na plochu píku DMA-NBD

Poslední testovaný faktor, který by mohl mít výraznější vliv na výtěžek derivatizace, byl reakční čas. Deriváty byly připraveny stejným postupem popsaným výše, přičemž reakční teplota byla 80°C a čas derivatizace byl optimalizován. Testováno bylo rozmezí mezi 10 až 60 minutami a naměřené hodnoty byly znázorněny do grafu 10. Maximální hodnoty průměru ploch byly dosaženy při 20 a 30 minutách. Vyšší reakční časy vykazovaly pokles ploch DMA-NBD. Z výsledků vyplývá, že při 80°C je dostačující doba reakce 20 min. Podobně jako v předchozím případě měla reakční doba vliv na zbarvení vzorku. Čiré roztoky vykazovaly tmavší zbarvení se vzrůstající dobou reakce.



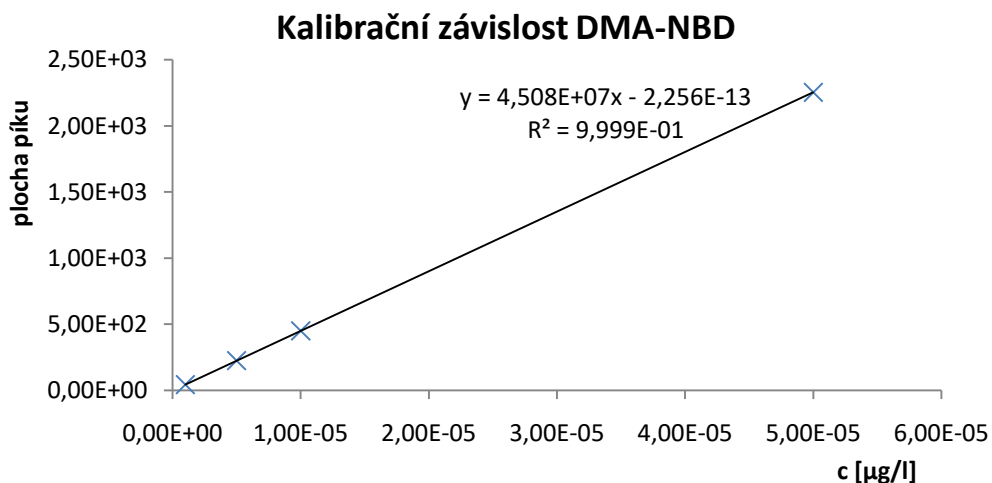
Graf 10: Vliv reakčního času na plochu píku DMA-NBD

#### 4.6.2 Kalibrace metody

Deriváty dimethylaminu byly připraveny smícháním 400  $\mu\text{l}$  aminu, 400  $\mu\text{l}$  0,5 mol/l borátového pufru (pH 8,5) a 200  $\mu\text{l}$  10 mmol/l NBD-Cl. Směs byla míchána 20 sekund a poté vložena na 20 minut do předem vyhřáté sušárny na 80°C. Citlivost detektoru byla zvolena high 4x. Naměřená data byla poté opět validována kritérii uvedených v předchozích metodách.

Proměřeny byly koncentrace od  $10^{-4}$  mol/l do  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l DMA. Po validaci dat, které nevyhovovali koncentrace  $5 \cdot 10^{-7}$  mol/l a  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l, byla lineární část vyhodnocena v rozmezí  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l až  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Hodnoty byly vyneseny do grafu 11 a linearita zhodnocena pomocí koeficientu determinace  $R^2$ , který měl hodnotu 0,9999. Nevýhodou metody byla nízká reprodukovatelnost pro koncentrace  $5 \cdot 10^{-7}$  mol/l DMA, což výrazně snížilo možnost kvantitativního stanovení.

Pro zjištění limitu detekce byla citlivost detektoru nastavena na hodnotu high 16x. Při tomto nastavení byly proměřeny koncentrace  $5 \cdot 10^{-7}$  mol/l,  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l a  $5 \cdot 10^{-8}$  mol/l, které byly porovnány se slepými pokusy. Po porovnání naměřených hodnot byl limit detekce stanovený na 4,51  $\mu\text{g/l}$  (tj.  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l DMA), protože u koncentrace  $5 \cdot 10^{-8}$  mol/l DMA byla intenzita fluorescence na úrovni blanku.



Graf 11: Kalibrační závislost DMA-NBD

#### 4.7 Shrnutí metod

Při hodnocení metod bylo nejvýznamněji pohlíženo na dosažený LOD metody, lineární rozsah a chromatografické podmínky. Ačkoliv činidlo FMOC poskytuje vysoce fluoreskující deriváty, nebyla tato metoda vyhodnocena jako nejvhodnější. Lineární rozsah byl v tomto případě přes dva koncentrační řády. Vlivem vysokého pozadí nebylo ale možné nastavit maximální citlivost detektoru, což bylo jedním z důvodů pro dosažení LOD pouze 22,5  $\mu\text{g/l}$ . Nepříznivá je také délka analýzy, která z důvodu velkého množství píků a vysoké fluorescence činidla vzrostla na 45 min. Naopak výhodou činidla je rychlý průběh derivatizace za laboratorních podmínek.

Dansyl chlorid neposkytuje oproti činidlu FMOC-Cl příliš vysoce fluoreskující deriváty, což umožňuje nastavení detektoru na citlivější hodnoty. Nadbytek činidla je odstraňován teplotou, proto není třeba využívat extrakci a nedochází ke ztrátě derivátu. Lineární rozsah metody je nižší než u metody FMOC, ale možností vyšší citlivosti detektoru byl snížen LOD na 4,51  $\mu\text{g/l}$ . Výhodou je výrazně kratší analýza, menší spotřeba činidla, vyšší koeficient  $R^2$  a chromatogram obsahující malé množství píků.

Poslední zkoumané činidlo NBD-Cl vykazovalo velmi podobné chování jako dansyl chlorid. Lineární rozsah metody a LOD jsou dokonce totožné. Nevýhodou NBD-Cl oproti DNS-Cl je vyšší reakční teplota, delší reakční čas a horší reprodukovatelnost u nižších koncentrací. Celkové porovnání všech metod je znázorněno v tabulce 5.

Tabulka 5: Porovnání metod

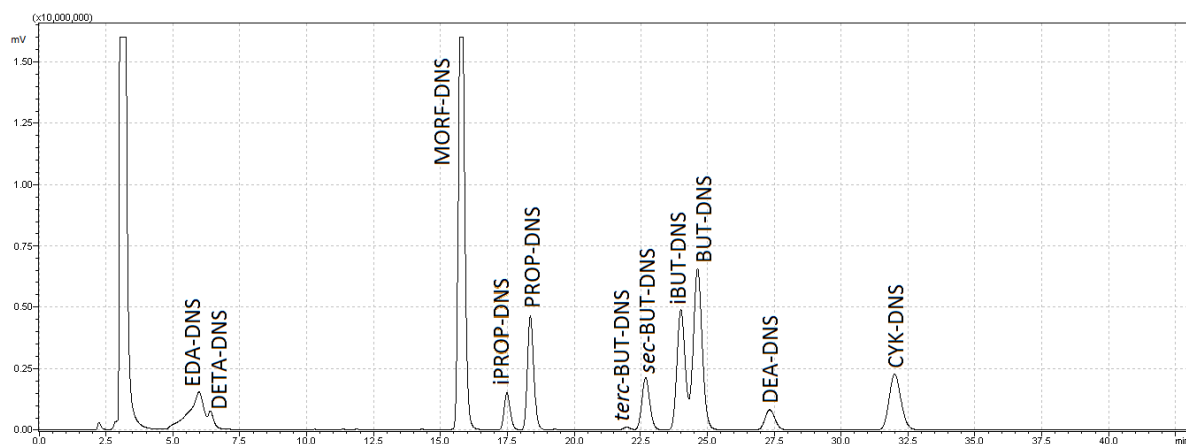
Činidlo	FMOC-Cl	DNS-Cl	NBD-Cl
Množství a koncentrace činidla	900 $\mu$ l 15 mmol/l	300 $\mu$ l 2 mmol/l	200 $\mu$ l 10 mmol/l
Doba derivatizace	2,7 min	10,3 min	20,3 min
Teplota derivatizace	25°C	70°C	80°C
Doba analýzy	45 min	10 min	11 min
Lineární rozsah	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-6}$ mol/l	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-6}$ mol/l	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-6}$ mol/l
LOD	22,5 $\mu$ g/l	4,51 $\mu$ g/l	4,51 $\mu$ g/l

#### 4.8 Kvalitativní stanovení vybraných aminů

Jelikož činidla DNS-Cl a NBD-Cl vykazovala podobné výsledky, byly pro následné kvalitativní stanovení vybraných aminů zvoleny obě činidla. Ke stanovení bylo vybráno 14 aminů a jejich výčet je uveden příloze 6. Tyto aminy jsou vhodné jako senzibilizátory pro směs s nitromethanem a tvoří spolu výbušnou směs.

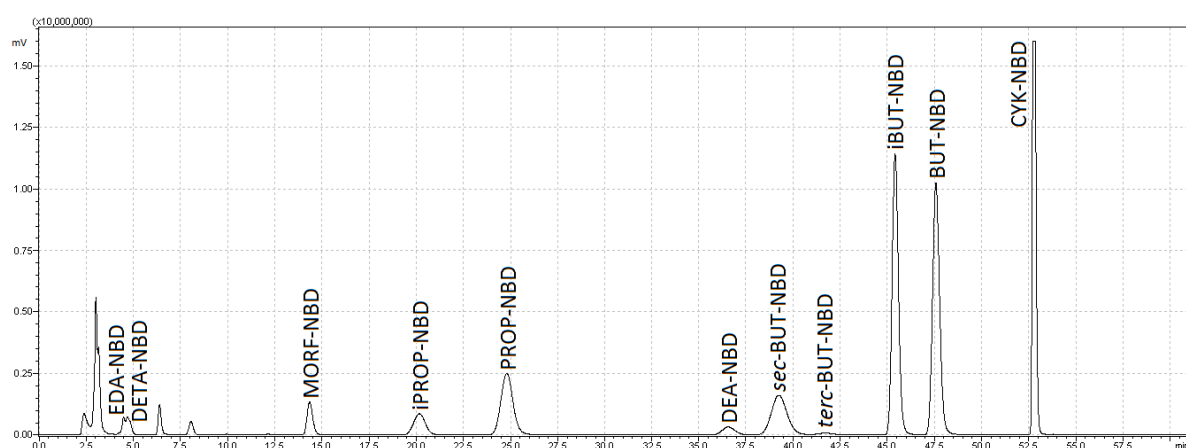
S činidlem DNS-Cl byly deriváty připraveny smícháním 400  $\mu$ l 0,5 mol/l uhličitanového pufru (pH 9), 400  $\mu$ l příslušného aminu a 300  $\mu$ l 2 mmol/l DNS-Cl. Derivatizační směs byla po 20 vteřinovém míchání vložena na 10 min do sušárny vyhřáté na 70°C. Deriváty byly identifikovány porovnáním různých koncentrací aminů se slepým pokusem. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a vody v poměru 50:50 (v/v) s průtokem 0,5 ml/min. Eluční časy standardních vzorků a odchylky jednotlivých měření jsou shrnuty v příloze 6. Triethylamin a pyridin nevykazovaly žádné změny oproti slepému pokusu, protože nejspíše s činidlem nereagovaly nebo tvořily nefluoreskující deriváty. Deriváty diethanolaminu, triethylaminu a ethylendiaminu eluovaly téměř ve stejný čas, proto byla mobilní fáze změněna na poměr 60:40 (v/v) acetonitril – voda. Touto změnou se podařilo oddělit ethylendiamin od diethanolaminu a triethylaminu, které se však rozseparovat nepodařilo. Jelikož nebylo možné tyto dva aminy rozseparovat, nebyl triethanolamin přidán do směsi aminů, protože měl mnohem menší plochu píku než derivát diethanolaminu. Složení mobilní fáze pro separaci směsi aminů bylo 0 – 10 min 40% (v/v) B, 11 min 50% (v/v) B, 40 min 50% (v/v) B. Chromatogram směsi aminů s koncentrací  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l je znázorněn na obrázku 17. V tabulce 6 jsou uvedeny limity detekce jednotlivých aminů ve směsi.





Obrázek 17: Chromatogram směsi aminů stanovené metodou DNS-Cl

S činidlem NBD-Cl byly deriváty připraveny reakcí 400  $\mu$ l aminu, 400  $\mu$ l 0,5 mol/l borátového pufru (pH 8,5) a 200  $\mu$ l 10 mmol/l NBD-Cl. Reakce probíhala 20 minut při teplotě 80°C. Při identifikaci derivátů byla mobilní fáze složena ze směsi acetonitril – voda v poměru 40:60 (v/v) s průtokem 0,5 ml/min. Jednotlivé eluční časy derivátu standardních roztoků byly uvedeny příloze 6. Jelikož při tomto složení mobilní fáze eluovalo několik aminů v podobný čas, bylo složení mobilní fáze změněno. Kvůli lepší separaci a zkrácení doby analýzy byla využita gradientová eluce, která byla nastavena 0 – 40 min 30% (v/v) B, 41 min 40% (v/v) B, 47 min 40% (v/v) B, 48 min 70% (v/v) B, 60 min 70% (v/v) B. Koncentrace aminů ve směsi byly stejné jako s činidlem DNS-Cl. Výsledný chromatogram s koncentrací aminů  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l je znázorněn na obrázku 18 a limity detekce v tabulce 6.



Obrázek 18: Chromatogram směsi aminů stanovené metodou NBD-Cl

Tabulka 6: Limity detekce jednotlivých aminů ve směsi

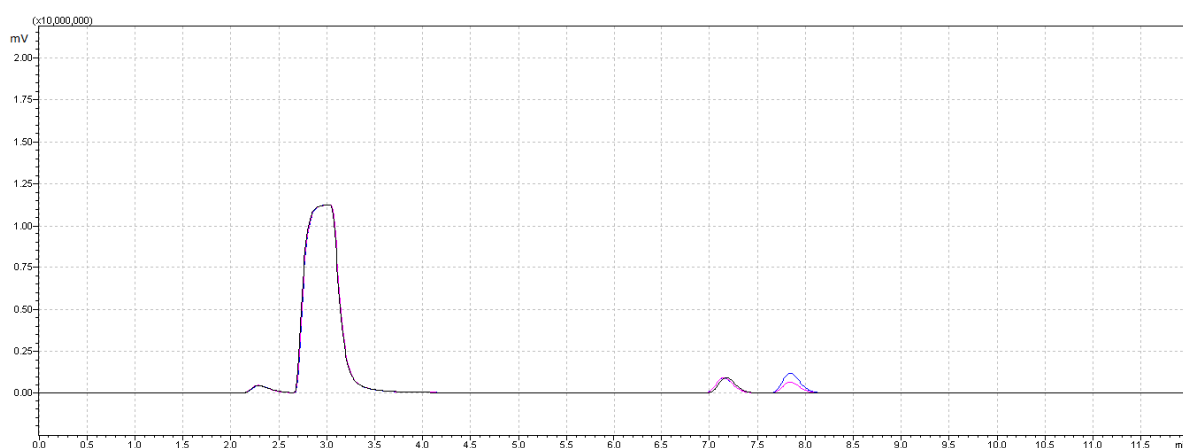
Amin	DNS-Cl [ $\mu\text{g/l}$ ]	NBD-Cl [ $\mu\text{g/l}$ ]
Butylamin	73,14	0,73
Cyklobutylamin	99,17	9,92
Isobutylamin	0,73	0,73
Isopropylamin	5,91	59,11
Morfolin	87,12	87,12
Propylamin	5,91	59,11
<i>Sec</i> -butylamin	0,73	73,14
<i>Terc</i> -butylamin	731,40	7314,00
Ethylendiamin	601,00	60,10
Diethanolamin	1051,40	105,14
Diethylamin	73,14	731,40

#### 4.9 Extrakce

Jelikož reálné vzorky budou stírány tamponky ze skelné tkaniny, bylo třeba připravit techniku pro extrakci látek. Pokud je na tamponku aplikován vodný roztok, nedochází k vsáknutí vzorku, ale k tvorbě kapky. Z tohoto důvodu byly připraveny roztoky DMA v acetonitrilu, který byl využit opět jako modelový amin. Testována byla extrakce do acetonitrilu, methanolu a vody. Výběr nejvhodnějšího extrakčního činidla byl proveden porovnáním slepého pokusu, extrakce DMA z tamponku a maximálního výtěžku DMA. Slepý pokus byl připraven nanesením 100  $\mu\text{l}$  acetonitrilu na tamponku, který byl vložen do Eppendorfovy nádoby a následovalo přidání 1,5 ml extrakčního činidla. Extrakce DMA z tamponku byla provedena totožně, pouze byl na tamponku nanesen roztok DMA o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l. Maximální výtěžnost dimethylaminu byla zjištěna přidáním 100  $\mu\text{l}$   $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l DMA do Eppendorfovy nádoby doplněnou 1,5 ml extrakčního činidla. Doba extrakce byla pokaždé 30 minut. Z Eppendorfových nádobek bylo vždy odebráno alikvotní množství 400  $\mu\text{l}$  a provedena derivatizace dle vypracovaných metod.

U metody DNS-Cl došlo při derivatizaci extrahovaného DMA metanolem a acetonitrilem k vyloučení bílých vloček, které byly odděleny pomocí centrifugy. Při analýze derivátů methanolickeho extraktu vykazovaly píky DMA deformaci. Tato koeluce byla prověřena i u jiných aminů, u kterých se vyskytovala také. Deformace u derivátu dimethylaminu (DMA-DNS) a propylaminu (PROP-DNS) jsou znázorněny v příloze 7. To znemožnilo identifikaci aminů, proto byl methanol jako extrakční činidlo pro metodu DNS-Cl

zamítnuto. Při použití acetonitrilu jako extrakčního činidla byla výtěžnost příliš malá, což mohlo být způsobeno vznikem vloček. Jako nejlepší extrakční činidlo byla vyhodnocena voda, neboť nedošlo k vzniku vloček a byla zaznamenána největší výtěžnost. Porovnání chromatogramů slepého pokusu (černý), extrahovaného DMA (růžový) a maximálního výtěžku DMA (modrý) pro metodu DNS-Cl s vodou jako extrakčním činidlem bylo znázorněno na obrázku 19. Výsledky extrakce jsou znázorněny v tabulce 7, ačkoliv hodnoty pro methanol nebyly uváděny, kvůli zkreslení vlivem deformace píku.



Obrázek 19: Porovnání chromatogramů metody DNS-Cl pro DMA s vodou jako extrakčním činidlem (slepý pokus - černá, extrahované DMA – růžová, maximální výtěžek DMA – modrá)

Tabulka 7: Výtěžnosti extrakcí u metody DNS-Cl pro dimethylamin

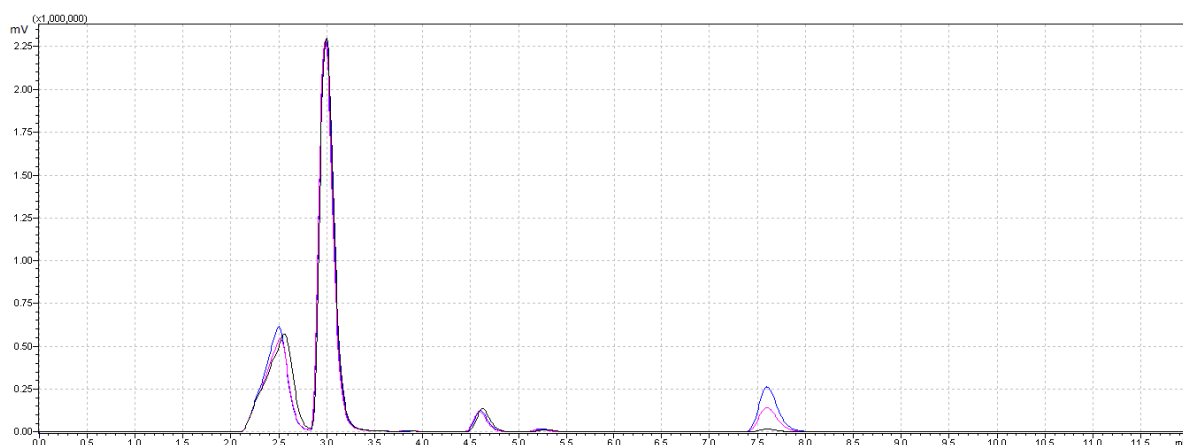
Extrakční činidlo	Voda	Acetonitril
Výtěžnost [%]	55,07	0,37
	53,37	0,48
	54,91	0,49
	51,15	0,59
	50,60	0,53
	50,71	0,46
Průměr [%]	52,64 ± 2,08	0,49 ± 0,07

U metody NBD-Cl nebyly výše popsané ani žádné jiné komplikace pozorovány a derivatizace proběhla u všech extraktů. Naměřená data a vypočtené výtěžnosti jsou uvedeny v tabulce 8. Z výsledků byla vybrána opět voda jako nejvhodnější extrakční činidlo s nejvyšší výtěžností. Opět byly porovnány chromatogramy slepého pokusu (černý), extrahovaného DMA (růžový) a maximálního výtěžku DMA (modrý) pro metodu NBD-Cl s vodou jako

extrakčním činidlem bylo znázorněno na obrázku 20. Výtěžnosti u obou metod s vodou jako extrakčním činidlem byly pro DMA velmi podobné a pohybovaly se průměrně okolo 52 %.

Tabulka 8: Výtěžnost extrakcí u metody NBD-Cl pro dimethylamin

Extrakční činidlo	Voda	Acetonitril	Methanol
Výtěžnost [%]	49,07	40,08	50,59
	48,47	36,16	48,60
	50,63	34,45	49,76
	55,32	33,15	45,43
	52,10	37,58	45,64
	55,99	37,43	46,27
Průměr [%]	51,93 ± 3,16	36,48 ± 2,47	47,72 ± 2,23



Obrázek 20: Porovnání chromatogramů metody NBD-Cl Cl pro DMA s vodou jako extrakčním činidlem (slepý pokus - černá, extrahované DMA - růžová, maximální výtěžek DMA - modrá)

Jednotlivé výtěžnosti byly vypočteny dle vzorce 2. Kvůli vlivu pozadí byly do výpočtu zahrnuty i hodnoty ze slepého pokusu. V čitateli byl rozdíl plochy píku extrahovaného DMA z tamponku a průměr ploch píku blanku. Ve jmenovateli byl rozdíl průměru ploch píku maximální výtěžnosti DMA a průměru ploch píku slepého pokusu. Výsledek byl poté uveden v procentech.

$$VÝTĚŽNOST = \frac{A_{aminu} - \phi A_{blanku}}{\phi A_{max. výtěžku} - \phi A_{blanku}} \quad (2)$$

Extrakce byly provedeny u všech identifikovaných aminů a výtěžnosti extrakcí jsou uvedeny v tabulce 9. Jelikož výtěžky extrakce byly nízké, byla testována extrakce s pomocí ultrazvuku. Vzorky byly extrahovány opět 30 minut rozpouštědlem a poté byly vloženy na 10 minut do ultrazvuku. Tímto krokem byla zvýšena účinnost extrakce téměř u všech aminů, proto bude tato metoda využita při extrakci reálných vzorků. Pro reprodukovatelnost byla každá extrakce provedena třikrát.

Tabulka 9: Výtěžky extrakcí do vody jednotlivých aminů

Amin	Extrakce rozpouštědlem		Extrakce ultrazvukem	
	DNS-Cl [%]	NBD-Cl [%]	DNS-Cl [%]	NBD-Cl [%]
Butylamin	75,71 ± 0,28	67,23 ± 0,31	97,77 ± 0,52	91,92 ± 1,62
Cyklobutylamin	98,71 ± 0,79	97,12 ± 1,45	97,95 ± 0,35	94,45 ± 0,27
Isobutylamin	63,66 ± 0,25	68,36 ± 1,11	75,69 ± 0,47	92,82 ± 0,69
Isopropylamin	59,78 ± 0,03	43,23 ± 0,01	76,08 ± 0,22	62,14 ± 0,01
Morfolin	99,40 ± 1,38	97,08 ± 0,15	98,26 ± 0,38	98,35 ± 1,75
Propylamn	67,37 ± 0,34	63,76 ± 0,05	78,71 ± 0,12	68,88 ± 0,11
Sec-butylamin	68,53 ± 0,11	66,48 ± 0,18	80,47 ± 0,13	98,21 ± 0,28
Terc-butylamin	54,54 ± 0,02	63,01 ± 0,03	80,73 ± 0,03	89,45 ± 0,01
Ethylendiamin	71,90 ± 0,77	82,95 ± 0,01	85,92 ± 0,43	82,07 ± 0,05
Diethanolamin	79,50 ± 0,49	98,11 ± 0,17	88,71 ± 0,35	98,45 ± 0,16
Triethanolamin	98,23 ± 0,07	95,21 ± 0,01	99,18 ± 0,05	92,20 ± 0,02
Diethylamin	61,12 ± 0,16	69,94 ± 0,02	61,61 ± 0,14	92,43 ± 0,05

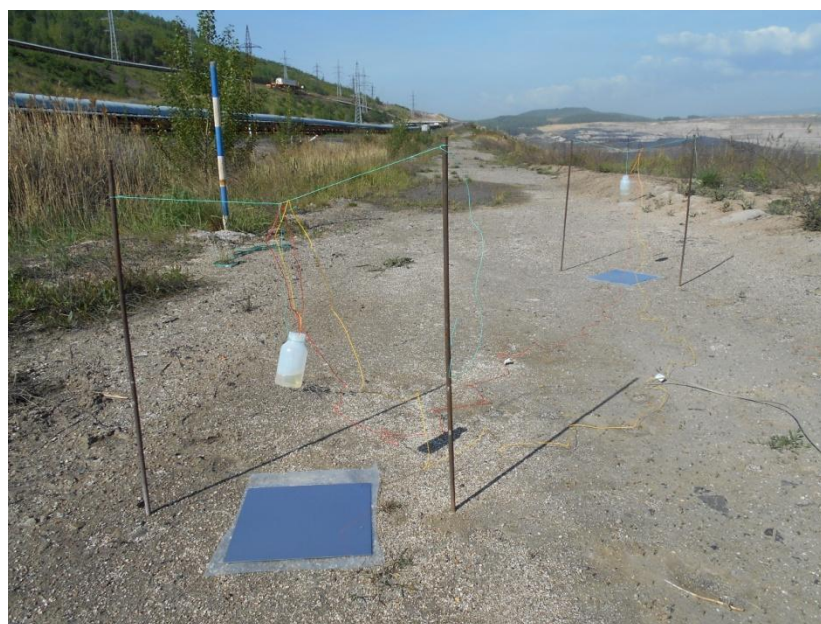
#### 4.10 Reálné vzorky

Reálné vzorky byly získány stěry nerezových plechů (33 × 33 cm), které byly umístěny pod detonační směsí. Ukázka odpališť je uvedena na obrázku 21. Výbušniny byly připraveny v den odpalu a směs byla složena z nitromethanu a aminu v poměru 95:5 (m/m). Ukázka nerezového plechu po detonaci je na obrázku 22. Stěrovými tamponky byla setřena celá plocha plechu a tamponěk byl uložen do nádoby uzavřené víčkem se septem. V laboratoři byly podrobeny výše popsané extrakci a extrakt byl zderivatizován. K identifikaci byla zvolena metoda s nižším LOD (viz tabulka 6), jestliže byly LOD stejné, byla zvolena metoda DNS-Cl kvůli rychlejší přípravě derivátů i samotné analýze. Chromatogramy aminů byly porovnány se slepými pokusy, které byly odebírány vždy na začátku a konci odstřelů, kvůli případné kontaminaci. Použité metody a výsledky identifikace

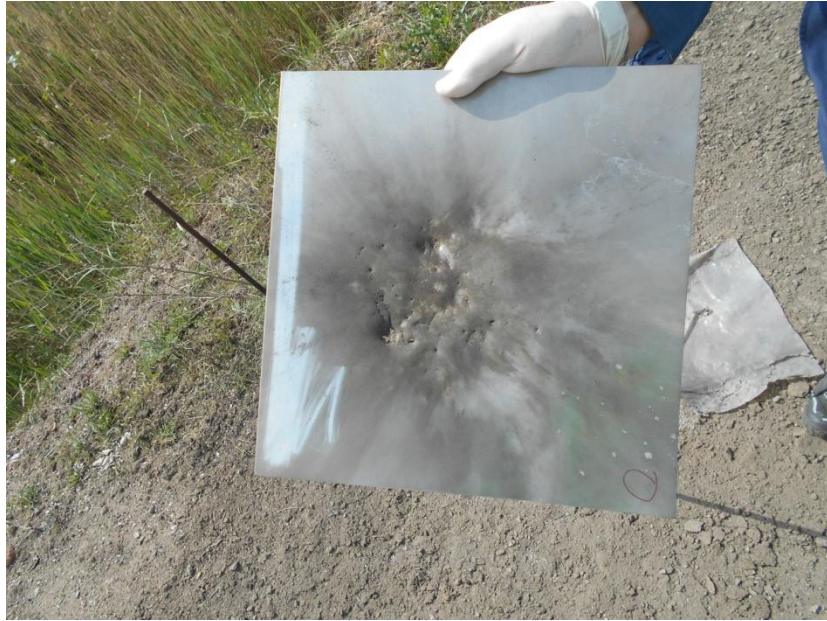
jsou shrnuty v tabulce 10. Ve vzorcích nebyly identifikovány pouze dva aminy (morfolin, *terc*-butylamin), protože během výbuchu pravděpodobně došlo k jejich úplnému spálení. Kvůli reprodukovatelnosti byly z každého extraktu provedeny vždy dvě derivatizace a každý derivát třikrát změřen. Při porovnání výsledků naměřených dat ze stejných extraktů byl závěr o identifikaci vždy shodný.

Tabulka 10: Identifikace aminů po detonaci

Amin	Metoda	Vzorek 1	Vzorek 2
Isobutylamin	DNS-Cl	identifikován	identifikován
Isopropylamin	DNS-Cl	identifikován	identifikován
Morfolin	DNS-Cl	neidentifikován	neidentifikován
Propylamin	DNS-Cl	identifikován	identifikován
<i>Sec</i> -butylamin	DNS-Cl	identifikován	identifikován
<i>Terc</i> -butylamin	DNS-Cl	neidentifikován	neidentifikován
Triethanolamin	DNS-Cl	identifikován	identifikován
Diethylamin	DNS-Cl	identifikován	identifikován
Butylamin	NBD-Cl	identifikován	identifikován
Cyklobutylamin	NBD-Cl	identifikován	identifikován
Ethylendiamin	NBD-Cl	identifikován	identifikován
Diethanolamin	NBD-Cl	identifikován	identifikován



Obrázek 21: Odpaliště



Obrázek 22: Nerezový plech po detonaci

## 5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vypracování analytické metody pro identifikaci vybraných aminů, které mohou být použity jako senzibilizátory výbušnin. Nejprve byla provedena literární rešerše pro stanovení aminolátek kapalinovou chromatografií s fluorescenčním detektorem. Při této detekci bylo nutné provést derivatizaci, přičemž zvýšená pozornost byla věnována činidlům vhodným pro primární i sekundární aminy.

Po provedení literární rešerše byla jako vodná derivatizační činidla vybrána dansylchlorid, 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčan a 4-chlor-7-nitrobenz-2,1,3-oxadiazol. U všech činidel byly optimalizovány derivatizační a chromatografické podmínky na dimethylaminu. Shrnutí a porovnání vypracovaných metod bylo uvedeno v předchozí kapitole. Jelikož hlavním cílem diplomové práce byla detekce aminů po detonaci, byla vybrána činidla s nejnižším limitem detekce a nejnižším pozadím. Těmto kritériím nejlépe vyhovovala činidla DNS-Cl a NBD-Cl, která byla použita pro stanovení vybraných aminů.

Ke kvalitativnímu stanovení čtrnácti vybraných aminů byly použity vypracované metody. Činidly však nebylo možné stanovit všechny zvolené aminy, přičemž nebyl identifikován pyridin a triethylamin. Pro detekované aminy, s výjimkou triethanolaminu, byla vypracována metoda pro separaci aminů ve směsi a určeny byly také limity detekce jednotlivých aminů ve směsi.

Zhodnocení vypracovaných metod bylo provedeno na reálných vzorcích. Jelikož reálné vzorky byly pořízeny stěry kovových plechů tamponky, bylo nutné vypracovat také extrakční metodu. Jako nejvhodnější extrakční činidlo byla vyhodnocena voda. Extrakce byla provedena u všech detekovaných aminů a zhodnocena vzhledem k výtěžnosti extrakce. Kvůli nízké výtěžnosti extrakcí kapalinou byla metoda nahrazena extrakcí pomocí ultrazvuku. Vypracované metody byly aplikované na reálné vzorky, přičemž bylo detekováno deset aminů z původních dvanácti. Z výsledků vyplývá, že tyto metody jsou vhodné pro identifikaci vybraných aminů v nízkých koncentracích.



## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- 1 ELLER, K., HENKES, E., ROSSBACHER, R., HÖKE, H. Amines, Aliphatic. In: *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry: Air*, 2. Effects of Air Polltants to Amines, Aromatic. 7th completely rev. ed. ELVES Barbara, ed. Weinheim WCH, 2011, s. 648 – 691. Vol. 2. ISBN 978–3–527–32943–4
- 2 BEYER, H., WALTER, W. *Organic chemistry: A comprehensive degree text and source book*. Chichester: Albion Pub., 2012. ISBN 978–0–08–100028–1.
- 3 SMITH, S. P., BLOCK, E. Amine. Britannica Academic [online]. [cit. 2017–03–09]. Dostupné z: <http://academic.eb.com/levels/collegiate/article/amine/7181>
- 4 McMurry, J. *Organická chemie*. Aminy a heterocykly. Osmé vydání. Brno: VUTIUM, 2012, s. 809 – 811. ISBN 978–0–8400–5453–1
- 5 LAWRENCE, S. A. *Amines: synthesis, properties, and applications*. New York: Cambridge University Press, 2004. ISBN 0–521–78284–8.
- 6 VOGT, P. F., GERULIS, J. J. Amines, Aromatic. In: *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry: Air*, 2. Effects of Air Polltants to Amines, Aromatic. 7th completely rev. ed. ELVES Barbara, ed. Weinheim WCH, 2011, s. 699 – 715. Vol. 2. ISBN 978–3–527–32943–4
- 7 FOURNIER, M., LESAGE, J., OSTIGUY, C., VAN TRA, H. Sampling and analytical methodology development for the determination of primary and secondary low molecular weight amines in ambient air. *Journal of Environmental Monitoring*. 2008, 10 (3), 379 – 386. ISSN 1464–0325.  
Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b719091n>
- 8 HAMPL, F., RÁDL S., PALEČEK, J. *Farmakochemie*. 3., upravené a rozšířené vydání. Praha: Vysoká škola chemicko–technologická v Praze, 2015. ISBN 978–80–7080–875–7.
- 9 KULSHRESHTHA, A. K., VASILE, C. *Handbook of Polymer Blends and Composites*. Shawbury: Smithers Rapra Technology, 2002. Volumes 1–4. ISBN 978–1–85957–309–6
- 10 ZEMAN, S., VÁVRA, P. Energetické materiály – současnost a trendy vývoje výbušnin. *Chem. Listy*, 2010. 104, 791 – 797. ISSN 0009–2770
- 11 EDWARDS, D. W. *Aqueous explosive comprising higher amine, gelling agent and inorganic oxidizer salt*. Atlas Chem Ind. US 3695947 A. Uděleno 3. 10. 1972

- 12 LAURENCE, E. A. *Stabilized explosive containing nitromethane and amine*. Aerojet General Co. US 3239395 A. Uděleno 8. 3. 1966.
- 13 PETZOLD, J., KILCULLEN, D., LEE, M. Ch., RANCOURT M., SCHNEIDER H. *Amine reacted alpha, beta-unsaturated carbonyl compound thickened explosive emulsions*. Orica Explosives Technology Pty Ltd. WO 2010071946 A1. Uděleno 1. 7. 2010
- 14 KUPEC, J. *Toxikologie*. Vyd. 2. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2004. ISBN 80-7318-216-5.
- 15 TATOR, K. B. *ASM Handbook – Protective Organic Coatings*. Ohio: ASM International, 2015. ISBN 978-1-68015-887-8
- 16 Compiled and edited by the international food information service. *Dictionary of food science and technology*. 2nd ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2009. ISBN 978-161-583-120-3.
- 17 GREIM, H., BURY, D., KLIMISCH, H.-J., OEBEN-NEGELE, M., ZIEGLER-SKYLAKAKIS, K. Toxicity of aliphatic amines: Structure-activity relationship. *Chemosphere*. 1998, 36 (2), 271-295 ISSN 00456535. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653597003652>
- 18 ABBOTT, P. J., MATTIA, A., RENWICK, A. J., DiNOVI M. Aliphatic and aromatic amines and amides. INCHEM @2008, [cit. 2017-04-10] Dostupné z: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v56je13.pdf>
- 19 BRAUN, R. D. Chemical analysis. Encyclopaedia Britannica Inc., 2016 [cit. 20.10.2016].  
Dostupné z: <http://academic.eb.com/levels/collegiate/article/110403#80823.toc>
- 20 LAWRENCE, J. F. *Organic trace analysis by liquid chromatography*. Orlando: Academic Press, 1981. ISBN 0-12-439150-8.
- 21 WERKHOVEN-GOEWIE, C. E., W. M. BOON, A. J. J. PRAAT, R. W. FREI, U. A. BRINKMAN T., LITTLE, C. J. Preconcentration and LC analysis of chlorophenols, using a styrene-divinyl-benzene copolymeric sorbent and photochemical reaction detection. *Chromatographia*. 1982, 16 (1), 53-59. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02258869>
- 22 Lab-training.com [online]. @ 2016 [cit. 2016-10-21]. Dostupné z: <http://lab-training.com/wp-content/uploads/2011/12/Diagram-.jpg>

- 23 DE SAEGER, S. *Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing, 2011. ISBN 978–1–84569–674–0
- 24 SCHULZOVÁ, V. *Kapalinová chromatografie v analýze potravin a přírodních produktů (Mobilní fáze)*. Praha: VŠCHT, 2013. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/3%20HPLC%202013%20Mobilní%20fáze.pdf>
- 25 WILSON, I. D., POOLE C. F. *Handbook of methods and instrumentation in separation science*. První vydání. Burlington: Elsevier/Academic Press, 2009. ISBN 978–0–12–375095–2
- 26 VOJTA, J. et al. Příprava a aplikace monolitických kolon jako moderních separačních médií. *Chemické listy*. 2014, 108, 127–134. ISSN 1213–7103
- 27 ŠVEC, F., TENNIKOVA, T. B., DEYL, Z. *Monolithic materials: preparation, properties and applications*. První vydání. Amsterdam: Elsevier, 2003. ISBN 0–444–50879–1.
- 28 HIGSON, S. *Analytical chemistry*. První vydání. New York: Oxford University Press, 2003. ISBN 0–19–850289–3.
- 29 Česla, P. *Derivatizace pro separační techniky (Základy kapalinové chromatografie)*. Pardubice: UP FChT, 2016.
- 30 TEUTENBERG, T. *High–temperature liquid chromatography: a user's guide for method development*. Cambridge: RSC Pub., 2010. ISBN 978–1–84973–013–6
- 31 SWARTZ, M. HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2010, 33 (9–12), 1130–1150. ISSN 1082–6076.  
Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826076.2010.484356>
- 32 ANNA, D. H. *The occupational environment: its evaluation, control and management*. Třetí vydání. Fairfax, Va.: American Industrial Hygiene Association, 2011. ISBN 978–1–935082–15–6
- 33 FEILDEN, A. *Update on undertaking extractable and leachable testing*. Shrewsbury: iSmithers, 2010. ISBN 978–1–84735–455–6
- 34 COUFAL, P. *High Performance Liquid Chromatography*. @ 1996 [cit. 2016–11–01]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/images/obr35.gif>
- 35 BLACKER, J. A., WILLIAMS, M. T. *Pharmaceutical process development: current chemical and engineering challenges*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2011. ISBN 978–1–84973–146–1

- 36 LAWRENCE, J. F., FREI, R. W. *Chemical derivatization in liquid chromatography*. New York: Elsevier Scientific Publishing Company, 1976. Volume 7. ISBN 0-444-41429-0.
- 37 ATAPATTU, S. N., ROSENFELD, J. M. Solid phase analytical derivatization as a sample preparation method. *Journal of Chromatography A*. 2013, 1296, 204–213. ISSN 0021-9673.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967313004585>
- 38 HADDAD, P. R., POOLE, C. F. *Liquid chromatography – application*. Amsterdam: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-415866-5
- 39 BEYER, H., WALTER, W. *Organic chemistry: A comprehensive degree text and source book*. Chichester: Albion Pub., 1997. ISBN 978-1-898563-37-2
- 40 BARTZATT, R. Fluorescent labeling of drugs and simple organic compounds containing amine functional groups, utilizing dansyl chloride in Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2001, 45 (3), 247–253 ISSN 1056-8719.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056871901001575>
- 41 MARCÉ, M., BROWN, D. S., CAPELL, T., FIGUERAS, X., TIBURCIO, A. F. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1995, 666 (2), 329–335. ISSN 0378-4347.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037843479400586T>
- 42 ROSMUS, J., DEYL, Z. Chromatographic methods in the analysis of protein structure. *Journal of Chromatography A*. 1972, 70(2), 221–339. ISSN 0021-9673.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300927006>
- 43 DE MEY, E. et al. Dansyl derivatisation as an alternative for dansylation in the detection of biogenic amines in fermented meat products by reversed phase high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 2012, 130 (4), 1017–1023 ISSN 0308-8146.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611011022>
- 44 MARTIN, M. A., LIN B., DEL CASTILLO, B. The use of fluorescent probes in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1988, 6 (6–8), 573–583 ISSN 0731-7085.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0731708588800712>

- 45 TROKA, J., CAPELLETTI, C., PAPADOPOULOU–BOURAOUI, A., PALLARONI, L., ANKLAM, E. Investigation of alternative reagents to 2–mercaptoethanol for the pre–column derivatization of fumonisins with o–phthaldialdehyde, for hplc analysis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2002, 25 (12), 1821–1833 ISSN 1082–6076.  
Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/JLC-120005876>
- 46 LOZANOV, V. et al. Liquid chromatography method for simultaneous analysis of amino acids and biogenic amines in biological fluids with simultaneous gradient of pH and acetonitrile. *Journal of Chromatography B*. 2007, 860(1), 92–97. ISSN 1570–0232. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023207007301>
- 47 CHAFERPERICAS, C, HERRAEZ–HERNANDEZ, R., CAMPINS FALCÓ, P. A new selective method for dimethylamine in water analysis by liquid chromatography using solid–phase microextraction and two–stage derivatization with –phthalaldialdehyde and 9–fluorenylmethyl chloroformate. *Talanta*. 2005, 66(5), 1139–1145. ISSN 0039–9140.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914005000238>
- 48 JÁMBOR, A., MOLNÁR–PERL, I. Amino acid analysis by high–performance liquid chromatography after derivatization with 9–fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. *Journal of Chromatography A*. 2009, 1216(15), 3064–3077 ISSN 0021–9673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309001447>
- 49 GOODMAN, M. et al. *Methods in Organic Chemistry*. Stuttgart: Thieme, 2004. ISBN 978–3–13–140084–0.
- 50 IMAI, K., UZU, S., TOYO'OKA, T. Fluorogenic reagents, having benzofurazan structure, in liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1989, 7 (12), 1395–1403 ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/073170858980144X>
- 51 BOPANA, V. K., MILLER–STEIN, C., POLITOWSKI, J. F., RHODES, G. R. High–performance liquid chromatographic determination of peptides in biological fluids by automated pre–column fluorescence derivatization with fluorescamine. *Journal of Chromatography A*. 1991, 548, 319–327 ISSN 0021–9673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301886143>
- 52 CREIGHTON, T. E. *The biophysical chemistry of nucleic acids and proteins*. Milverton: Helvetian Press, 2010. ISBN 978–0–9564781–1–5.

- 53 CALLEJÓN, R. M., TRONCOSO, A. M., MORALES, M. L. Determination of amino acids in grape-derived products: A review. *Talanta*. 2010, 81 (4–5), 1143–1152 ISSN 0039–9140.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914010001372>
- 54 COHEN, S. A., DE ANTONIS, K. M. Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. *Journal of Chromatography A*. 1994, 661 (1–2), 25–34. ISSN 0021–9673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967393E0821B>
- 55 LAWRENCE, J. F., FREI, R. W. Fluorogenic labeling of organophosphate pesticides with dansyl chloride. *Journal of Chromatography A*. 1976, 121 (2), 343–351. ISSN 0021–9673.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300850323>
- 56 GENNARO, M. C., MENTASTI, E., SARZANINI, C., PORTA, V. Aliphatic monoamines, diamines, polyamines: An HPLC method for their identification and separation by a dansylation reaction; The study of separation factors in homologous series. *Chromatographia*. 1988, 25 (2), 117–124. ISSN 0009–5893.  
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02259027>
- 57 WANG, Z., XU, H., FU, C. Sensitive fluorescence detection of some nitrosamines by precolumn derivatization with dansyl chloride and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1992, 589 (1–2), 349–352 ISSN 0021–9673.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002196739280044U>
- 58 MARCÉ, M., BROWN, D. S., CAPELL, T., FIGUERAS, X., TIBURCIO, A. F. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1995, 666 (2), 329–335 ISSN 03784347. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037843479400586T>
- 59 MOLINS-LEGUA, C., CAMPÍNS-FALCÓ, P., SEVILLANO-CABEZA, A., PEDRÓN-PONS, M. Urine polyamines determination using dansyl chloride derivatization in solid-phase extraction cartridges and HPLC. *The Analyst*. 124 (4), 477–482. ISSN 0003–2654. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=a808736i>

- 60 MESEGUER, L. S., MOLINS-LEGUA, C, CAMPÍNS-FALCÓ, P. Preconcentration and dansylation of aliphatic amines using C18 solid-phase packings. *Journal of Chromatography A*. 2002, 978 (1-2), 59-69 ISSN 0021-9673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967302014310>
- 61 CHA, W., FOX, P., NALINAKUMARI, B. High-performance liquid chromatography with fluorescence detection for aqueous analysis of nanogram-level N-nitrosodimethylamine. *Analytica Chimica Acta*. 2006, 566 (1), 109-116. ISSN 0003-2670.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267006004806>
- 62 SARI, F., AYDOĞMUŞ, Z., ULU, S. T. Spectrofluorimetric Determination of Aliskiren in Tablets and Spiked Human Plasma through Derivatization with Dansyl Chloride. *Journal of Fluorescence*. 2012, 22 (2), 549-556. ISSN 1053-0509.  
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10895-011-0988-y>
- 63 OMAR, M. A., ABDELMAGEED, O. H., DERAYEA, S. M., ATTIA. T. Z. Spectrofluorimetric protocol for antidepressant drugs in dosage forms and human plasma through derivatization with dansyl chloride. *Arabian Journal of Chemistry*. 2013. ISSN 1878-5352.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535213004437>
- 64 WOLFRAM, J. H., FEINBERG, J. I., DOERR, R. C., FIDDLER, W. Determination of N-nitrosoproline at the nanogram level. *Journal of Chromatography A* [online]. 1977, 132 (1), 37-43. ISSN 00219673.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300937683>
- 65 AKTAS, E. S., ERSOY, L., SAGIRLI, O. A new spectrofluorimetric method for the determination of lisinopril in tablets. *Il Farmaco*. 2003, 58 (2), 165-168. ISSN 0014-827x.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014827X02000137>
- 66 AL-MAJED, A. A., BELAL, F., ABOUNASSIF, M. A., KHALIL, N. Y. Fluorimetric Determination of Gentamicin in Dosage Forms and Biological Fluids Through Derivatization with 4-Chloro-7-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole (NBD-Cl). *Microchimica Acta*. 2003, 141(1-2), 1-6. ISSN 0026-3672. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00604-002-0920-x>
- 67 YANG, C., HUANG, H., ZHANG, H., LIU, M. Analysis of Insulin by High Performance Liquid Chromatographic Method with Precolumn Derivatization with

- 4-Chloro-7-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole. *Analytical Letters*. 2006, 39 (12), 2463–2473. ISSN 0003–2719.  
Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01932690600824147>
- 68 ÖNAL, A., SAĞIRLI, OLCA Y a., ÇETIN, MÜGE S., TOKER S. A Selective LC Method for the Determination of Reboxetine in Human Plasma with Fluorescence Detection. *Chromatographia*. 2007, 66 (S1), 103–107 ISSN 0009–5893. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1365/s10337-007-0203-0>
- 69 MONEEB, M. S. Spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for the determination of saxagliptin and vildagliptin in bulk and pharmaceutical preparations. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*. 2013, 51 (2), 139–150. ISSN 1110–0931.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1110093113000070>
- 70 MARTINC, B., ROŠKAR, R., GRABNAR, I., VOVK, T. Simultaneous determination of gabapentin, pregabalin, vigabatrin, and topiramate in plasma by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. 2014, 962, 82–88. ISSN 1570–0232.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023214003389>
- 71 EL-KOSASY, A. M., ABDEL-AZIZ, Omar, MAGDY, N., EL ZAHAR, N. M. Screening and Optimization of the Reaction of Polymyxin B Sulphate with NBD-Cl for the Synchronous Spectrofluorimetric Determination of Polymyxin B Sulphate in Human Plasma. *Journal of Fluorescence*. 2015, 25 (3), 695–705. ISSN 1053–0509.  
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10895-015-1555-8>
- 72 ADHIKARI, S., KANG, Jong S., LEE, W. A convenient and validated enantiomer separation of chiral aliphatic amines as nitrobenzoxadiazole derivatives on polysaccharide-derived chiral stationary phases under simultaneous ultraviolet and fluorescence detection. *Chirality*. 2016, 28 (12), 789–794. ISSN 0899–0042.  
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/chir.22659>
- 73 IWAKI, K., OKUMURA, N., YAMAZAKI, M., NIMURA, N. KINOSHITA, T. Precolumn derivatization technique for high-performance liquid chromatographic determination of penicillins with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 1990, 504, 359–367. ISSN 0021–9673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730189539X>



- 74 AL-DIRBASHI, O., KURODA, N., NAKASHIMA, K. Characterization of the fluorescence properties of 4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole derivatives of some primary and secondary sympathomimetic amines. *Analytica Chimica Acta*. 1998, 365 (1-3), 169-176. ISSN 0003-2670.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267097006752>
- 75 ZHU, X., SHAW, P. N., BARRETT, D. A. Catecholamines derivatized with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole: characterization of chemical structure and fluorescence properties. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2003, 478(2), 259-269. ISSN 0003-2670.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267002015155>
- 76 FUKUSHIMA, T., NAKA-AKI, E., GUO, X., LI, F., VANKEIRSBILCK, T., BAEYENS, W. R. G., IMAI, K., TOYO'OKA, T. Determination of fluoxetine and norfluoxetine in rat brain microdialysis samples following intraperitoneal fluoxetine administration. *Analytica Chimica Acta*. 2004, 522 (1), 99-104. ISSN 00032670.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267004008013>
- 77 RODRÍGUEZ LÓPEZ, Margarita, GONZÁLEZ ALVAREZ, María José, MIRANDA ORDIERES, Arturo J., TUÑÓN BLANCO, Paulino. Determination of dimethylamine in groundwater by liquid chromatography and precolumn derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate. *Journal of Chromatography A*. 1996, 721 (2), 231-239. ISSN 0021-9673.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967395007873>
- 78 CAMPÍNS - FALCÓ, Pilar, HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, Rosa, SEVILLANO-CABEZA, Adela, TRÜMPLER, Isabel. Derivatization of amines in solid-phase extraction supports with 9-fluorenylmethyl chloroformate for liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 1997, 344 (1-2), 125-136. ISSN 0003-2670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267096005818>
- 79 VERDÚ-ANDRÉS, J., CAMPÍNS-FALCÓ, P., HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R. Liquid chromatographic determination of aliphatic amines in water using solid support assisted derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Chromatographia*. 2002, 55 (3-4), 129-134. ISSN 0009-5893.  
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02492132>
- 80 NEDELKOSKA, T. V., LOW, G. K. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column

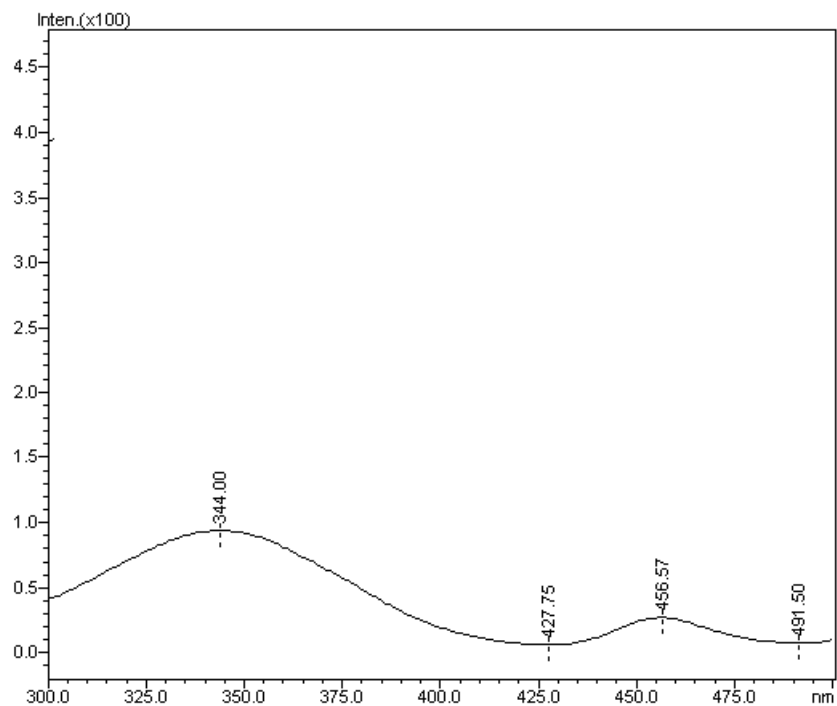
- derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Analytica Chimica Acta*. 2004, 511 (1), 145–153. ISSN 0003–2670.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267004000662>
- 81 XIAO, S., YU, P. H. A fluorometric high-performance liquid chromatography procedure for simultaneous determination of methylamine and aminoacetone in blood and tissues. *Analytical Biochemistry*. 2009, 384 (1), 20–26. ISSN 0003–2697.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269708006040>
- 82 SHRAIM, N., CLINCKERS, R., SARRE, S., MICHOTTE, Y., VAN EECKHAUT, A. Determination of reboxetine in rat brain microdialysates and plasma samples using liquid chromatography coupled to fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. 2012, 898, 53–61. ISSN 1570–0232.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023212002309>
- 83 CHEPYALA, D., TSAI, L., SUN, H. Y., LIN, S. W., KUO, C. H. Development and validation of a high-performance liquid chromatography–fluorescence detection method for the accurate quantification of colistin in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2015, 980, 48–54. ISSN 1570–0232.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023214007600>
- 84 SONG, M., WU, S., LU, P., QIAO, Y., HANG, T. A selective and sensitive pre-column derivatization HPLC method for the trace analysis of genotoxic impurity hydroxylamine in active pharmaceutical ingredients. *Anal. Methods*. 2016, 8 (47), 8352–8361. ISSN 1759–9660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6AY02675C>
- 85 BUSTO, O., GUASCH, J., BORRULL, F. Determination of biogenic amines in wine after precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate. *Journal of Chromatography A*. 1996, 737 (2), 205–213. ISSN 0021–9673.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967396000222>
- 86 HERNÁNDEZ-ORTE, P., PEÑA-GALLEGO, A., CACHO, J., FERREIRA, V. Biogenic amine determination in wine using solid-phase extraction: A comparative study. *Journal of Chromatography A*. 2009, 1216(15), 3398–3401. ISSN 0021–9673.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309001836>
- 87 HUANG, K., WEI, C., XIE, W., LIU, Y., CHEN, Y., ZHANG, J. LC Analysis of Aliphatic Primary Amines and Diamines After Derivatization with 2,6-Dimethyl-4-quinolinecarboxylic Acid N-Hydroxysuccinimide Ester. *Chromatographia*. 2009, 70 (5–6), 747–752. ISSN 0009–5893.

Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1365/s10337-009-1256-z>

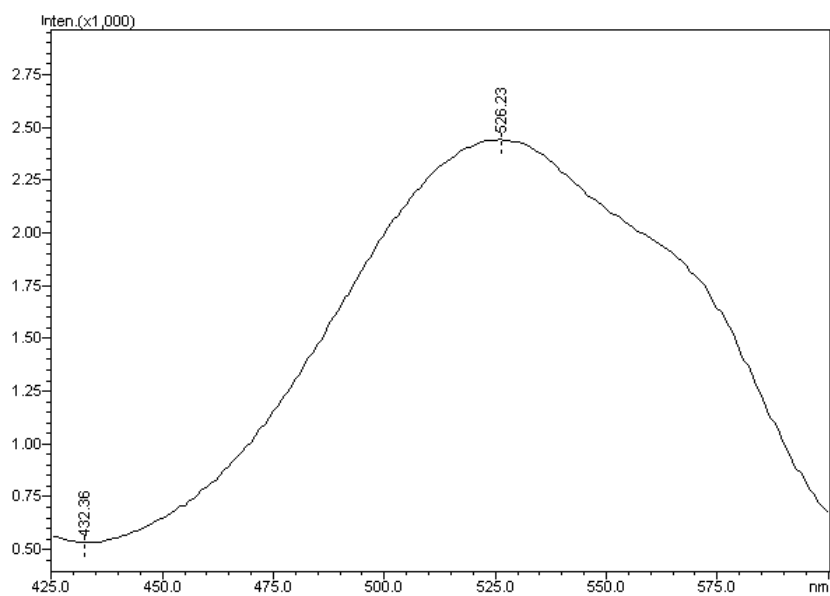
- 88 DOPICO-GARCÍA, M. S., LÓPEZ-VILARIÑO, J. M., FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, G., GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. V. Liquid chromatography method to determine polyamines in thermosetting polymers. *Analytica Chimica Acta*. 2010, 667 (1-2), 123-129. ISSN 0003-2670.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267010004113>

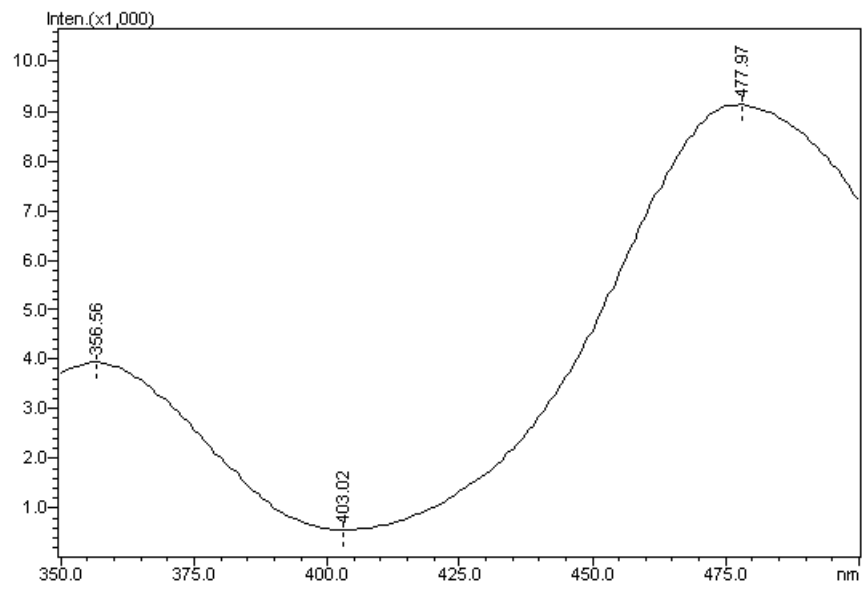
## 7 PŘÍLOHY



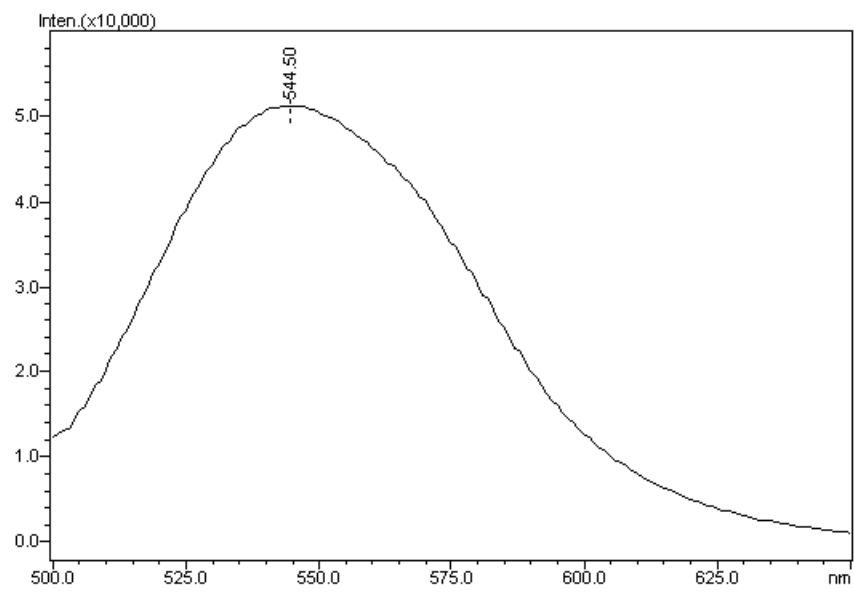
Příloha 1: Excitační spektrum pro DMA-DNS



Příloha 2: Emisní spektrum DMA-DNS



Příloha 3: Excitační spektrum DMA-NBD



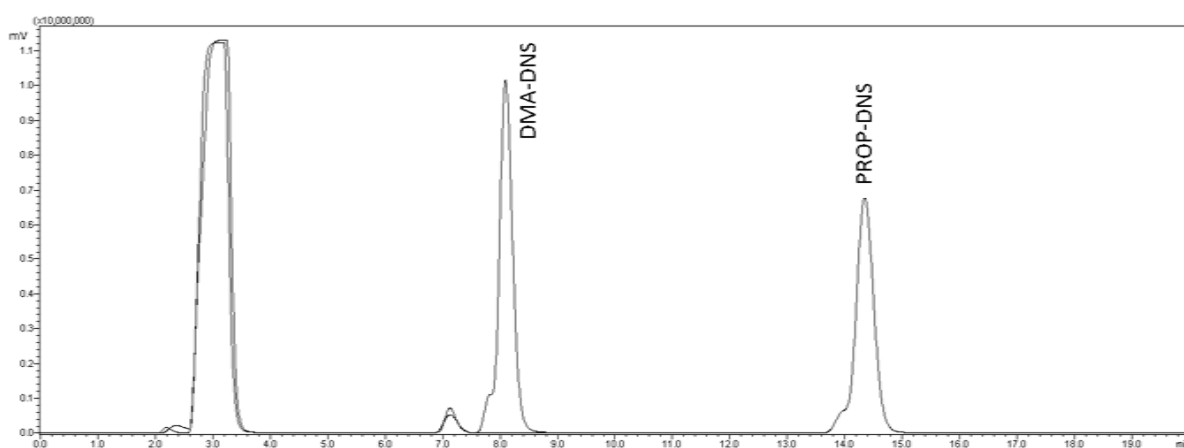
Příloha 4: Emisní spektrum DMA-NBD

Příloha 5: Výsledky statistického testu

Anova: jeden faktor				
Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl
40°C	8	655894716	81986840	1,75E+14
50°C	9	810031776	90003531	6,29E+12
60°C	9	816972750	90774750	3,74E+11
70°C	9	822205606	91356178	1,79E+11
80°C	9	822475521	91386169	7,07E+10
90°C	9	821594261	91288251	1,67E+12

Příloha 6: Eluční časy derivátů s DNS-Cl a NBD-Cl

Amin	DNS - Cl		NBD-Cl	
	t [min]	Odchylka	t [min]	Odchylka
Butylamin	20,03	0,02	56,40	0,15
Cyklobutylamin	27,21	0,09	102,57	0,61
Isobutylamin	19,40	0,04	48,96	0,02
Isopropylamin	13,00	0,03	21,92	0,05
Morfolin	11,51	0,04	14,71	0,03
Propylamin	13,96	0,01	21,92	0,05
Sec-butylamin	18,15	0,01	40,84	0,04
Terc-butylamin	17,52	0,01	42,63	0,02
Pyridin	NA	–	NA	–
Ethylendiamin	4,24	0,01	4,52	0,02
Diethanolamin	4,64	0,01	4,69	0,01
Triethanolamin	4,63	0,01	4,69	0,01
Triethylamin	NA	–	NA	–
Diethylamin	22,59	0,05	37,71	0,18



Příloha 7: Deformace piku při extrakci metanolem