

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

HPLC analýza aminů
Karin Sokolová

Bakalářská práce
2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Karin Sokolová**
Osobní číslo: **C14094**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Název tématu: **HPLC analýza aminů**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

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

1. Proveďte literární rešerši zabývající stanovením alifatických aminů pomocí kapalinové chromatografie. Zaměřte se na současné trendy při jejich stanovení za využití fluorescenční detekce. Popište možné způsoby derivatizace pro jejich stanovení. Proveďte derivatizaci vybraného aminu a optimalizujte metodu pro jeho stanovení.
2. Výsledky zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Aleš Eisner, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce:

doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

28. února 2017

Termín odevzdání bakalářské práce:

3. července 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. 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.

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

Karin Sokolová

Poděkování

Děkuji panu Ing. Aleši Eisnerovi, Ph.D. za odborné vedení práce, věcné připomínky, dobré rady a vstřícnost při konzultacích a vypracovávání bakalářské práce. Zvláštní poděkování patří také mé rodině a přátelům za jejich podporu a pomoc jak při zpracování bakalářské práce, tak po celou dobu studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením aminů pomocí kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí. Teoretická část se zabývá popisem kapalinové chromatografie, derivatizace a příklady stanovení aminů. Experimentální část popisuje výběr vhodných derivatizačních činidel pro stanovení aminů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kapalinová chromatografie, fluorescenční detekce, aminosloučeniny, derivatizace

ANNOTATION

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

KEYWORDS

Liquid chromatography, fluorescence detection, amino compounds, derivatisation, extraction

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	9
SEZNAM ZKRATEK	10
ÚVOD.....	12
1. TEORETICKÁ ČÁST	13
1. 1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie	13
1. 1. 1. Princip separace	13
1. 1. 2. Instrumentace.....	13
1. 1. 3. Kolony	14
1. 1. 4. Detekce	15
1. 2. Extrakce	15
1. 3. Derivatizace	16
1. 3. 1. Předkolonová a postkolonová derivatizace	16
1. 3. 2. Derivatizační činidla pro stanovení aminosloučenin.....	16
1. 3. 2. 1. Činidlo orto-ftalaldehyd (OPA).....	17
1. 3. 2. 2. Činidlo naftalen-2, 3-dikarboxaldehyd (NDA).....	17
1. 3. 2. 3. Činidlo 2,2-dihydroxyindan-1,3-dion (ninhydrin).....	17
1. 3. 2. 4. Činidlo fluoreskamin	17
1. 3. 2. 5. Činidlo 1-fluor-2,4-dinitrobenzen (FDNB)	17
1. 3. 2. 6. Činidlo 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčan (FMOC-Cl).....	18
1. 3. 2. 6. 1 Využití 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčanu.....	18
1. 3. 2. 7. Činidlo 4-chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazol (NBD-Cl).....	20
1. 3. 2. 7. 1. Využití 4-chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazolu.....	21
1. 3. 2. 8. Činidlo 5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid (DNS-Cl).....	24
1. 3. 2. 8. 1. Využití 5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchloridu.....	24
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
2. 1. Použité chemikálie.....	28
2. 2. Použité přístroje.....	28
2. 3. Optimalizace metody	29
2. 3. 1. Příprava roztoků	29
2. 3. 2. Derivatizace pomocí 5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchloridu	29
2. 3. 2. 1. Kalibrace metody.....	30

2. 4. Kvalitativní stanovení aminů.....	30
2. 4. 1. Stanovení aminů	30
2. 5. Vytvoření metody pro extrakci aminů.....	31
2. 5. 1. Stanovení vybraných aminů	31
2. 5. 2. Stanovení reálných vzorků	31
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	33
3. 1. Výsledky optimalizace složení mobilní fáze	33
3. 2. Výsledky optimalizace množství derivatizačního činidla	33
3. 3. Výsledky optimalizace teploty	34
3. 4. Výsledky optimalizace doby derivatizace	35
3. 5. Výsledky kalibrace metody	36
3. 6. Shrnutí metody	37
3. 7. Výsledky stanovení aminů	37
3. 8. Výsledky extrakce aminů	39
3. 9. Výsledky stanovení reálných vzorků.....	40
4 ZÁVĚR	42
5 POUŽITÁ LITERATURA	43

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Kapalinový chromatograf.....	14
Obrázek 2: Reakce FMOC-Cl s aminy za vzniku uretanů.....	18
Obrázek 3: Reakce NBD-Cl s aminy, vznik Meisenheimerova komplexu.....	21
Obrázek 4: Reakce DNS-Cl s terciálním aminem.....	24
Obrázek 5: Detonační směs se založeným nerezovým plechem a rozbuškou.....	32
Obrázek 6: Stírání vzorků z plechu po detonaci.....	32
Obrázek 7: Chromatogram slepého pokusu.....	33
Obrázek 8: Chromatogram DMA-DNS.....	33
Obrázek 9: Vliv množství DNS-Cl na plochu píku.....	34
Obrázek 10: Vliv teploty na plochu píku DMA-DNS.....	35
Obrázek 11: Vliv doby derivatizace na plochu píku DMA-DNS.....	36
Obrázek 12: Kalibrační závislost DMA-DNS.....	37
Obrázek 13: Chromatogram směsi aminů, stanovených metodou pro DNS-Cl.....	39
Tabulka 1: Shrnutí údajů optimalizace.....	37
Tabulka 2: Retenční časy aminů po derivatizaci.....	38
Tabulka 3: Výťažky extrakce DMA po derivatizaci DNS-Cl.....	40
Tabulka 4: Barva a výsledky detonačních směsí tvořené aminem, nitrometanem a nitrobenzenem.....	40
Tabulka 5: Barva a výsledky detonačních směsí tvořené aminem, nitrometanem a dinitrotoluenem.....	41
Tabulka 6: Výsledky stanovení aminů po detonaci metodou DNS-Cl.....	41

SEZNAM ZKRATEK

BUT - butylamin

C18 - oktadecysilikagel

CAD - kavaderin

CYK – cyklohexylamin

DEA – diethylamin

DMA- dimethylamin

DMA-DNS - derivát dimethylaminu a 5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchloridu

DMA-FMOC – derivát dimethylaminu a 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčanu

DMA-NBD – derivát dimethylaminu a 4-chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazolu

DNS-Cl - 5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid

EDA – ethylendiamin

ETA – etanolamin

ETILA – ethylamin

FDNB – 1-fluor-2, 4-dinitrobenzen

FEN - beta-fenylethyamin

FLD – fluorescenční detektor

FMOC-Cl - 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčan

FNT – fenetrol hydrobromid

HISTA – histamin

iBUT – isobutylamin

iPROP- isopropylamin

ISO – isoamlamin

LOD - limit detekce

NBD-Cl – 4-chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazol

NDA – naftalen-2, 3-dikarboxaldehyd

NDMA – N-nitrosodimethylamin

METILA – methylamin

MORF – morfolin

OPA – ortho-ftalaldehyd

PROP – propylamin

PUT – putrestein

PYR – pyridin

RTH – ritodrin hydrochlorid

SAX – saxagliptin

Sec-BUT – sekundární butylamin

TEA – triethylamin

TETA – triethanolamin

Terc-BUT – terciární butylamin

UHPLC – ultra výkonná kapalinová chromatografie

VDG – vildagliptin

ÚVOD

V současné době vzrůstá zájem o detekci alifatických aminů a to především kvůli jejich přítomnosti v odpadních vodách a průmyslových odpadních materiálech.

Alifatické aminy, zejména ty, které mají krátký uhlíkatý řetězec, jsou dnes hojně využívány v celé řadě průmyslových výrob chemikálií a léčiv. Mohou být tedy syntetického ale také biologického původu. Nachází se v tělních tekutinách a jsou produkty rozkladu aminokyselin, velké části proteinů a dalších dusíkatých látek. Dále jsou pak také často produkovány různými přírodními zdroji. Velká část těchto aminosloučenin je však toxická, dráždí oči, kůže a sliznice, jsou však i takové, které mají karcinogenní povahu. Vzhledem k tomu bylo navrženo mnoho způsobů jak tyto aminy detekovat v přírodních zdrojích a to zejména při ochraně životního prostředí^[1].

Mezi způsoby stanovení patří hlavně chromatografie a to jak plynová, tak kapalinová. Analyzovat aminy je možné například fluorescenčním detektorem. Problémem alifatických aminů je však jejich nízká fluorescence. Z tohoto důvodu je nutná jejich derivatizace. Použitím vhodných derivatizačních činidel fluorescence aminů narůstá a je tak možné je stanovit.

Značná část aminů bývá také součástí výbušnin, a je tedy nutné najít způsob, jak tyto aminy identifikovat. Vzhledem k tomu, že detekce probíhá až po explozi, kdy jsou zplodiny stírány tamponky, musela být nalezena také vhodná metoda extrakce.

Cílem této bakalářské práce bylo vytvořit vhodnou analytickou metodu pro stanovení aminů kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1. 1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve zkratce HPLC (z anglického High Performance Liquid Chromatography) je analytická separační technika, která je využívána k určování široké škály organických sloučenin. Její aplikace je rozšířená v mnoha průmyslových odvětvích, jako jsou například léčiva nebo barviva. Metodou HPLC je možné analyzovat až dvě třetiny všech organických látek^[2].

Jako základní analytická metoda tedy rozděluje směsi látek na jednotlivé části. Je založená na pevné, stacionární fázi a kapalně mobilní fázi. Podstatou kapalinové chromatografie tedy je interakce jednotlivých částí vzorků s těmito fázemi, zejména pak záleží na jejich afinitě k mobilní fázi. Separace bývá dosaženo dělením, adsorpcí nebo také výměnou iontů, v závislosti na použité stacionární fázi^[3, 4].

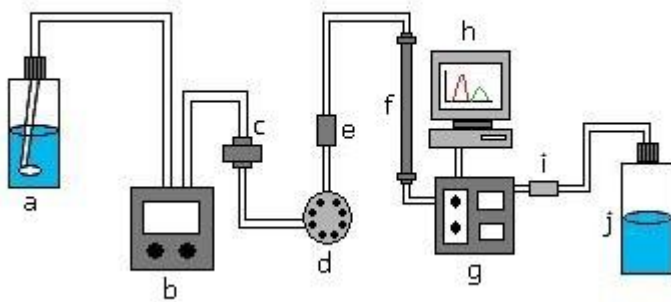
1. 1. 1. Princip separace

Jak již bylo řečeno, chromatografie je založená na různých afinitách stanovovaných látek ke dvěma různým fázím – stacionární a mobilní. To znamená, že různé molekuly mají různé afinity k těmto dvěma fázím. Mobilní fáze, která obsahuje také stanovovanou látku, tedy protéká přes fázi stacionární, látky ve směsi difundují mezi fázemi a dochází k jejich rozdělení. Čím vyšší je afinita molekuly k jedné fázi, tím déle ve fázi zůstane. Molekula s vyšší afinitou ke stacionární fázi je zadržena déle.

Doba, po kterou látka zůstává v koloně, je pro každou látku charakteristická. Tato doba se nazývá retenční čas. Podle něj je možné každou látku identifikovat^[5].

1. 1. 2. Instrumentace

Kapalinový chromatograf (Obrázek 1) se skládá z jednoho, nebo i více zásobníků, které obsahují mobilní fázi. Dále z čerpadla, které vede mobilní fázi do dávkovacího ventilu, kde dochází k zavedení analyzovaného vzorku do mobilní fáze. Další jeho součástí je potom chromatografická kolona, která obsahuje stacionární fázi. Pak se zde nachází detektor, jehož funkcí je detekce analytu a potom zařízení pro sběr dat, většinou počítač^[4].



a-vstupní filtr pro mobilní fázi, b-čerpadlo. C-filtr, d-dávkovací ventil, e-filtr, f-kolona, g-detektor, h-počítač, i-regulátor protitlaku, j-zásobní láhev pro odpad

Obrázek 1: Kapalinový chromatograf ^[3]

1. 1. 3. Kolony

Pro analýzu je nutné rozdělit stanovovanou látku mezi mobilní a stacionární fázi. Nejčastěji se analyzují látky rozpustné v organických rozpouštědlech s molekulovou hmotností do 1000 g/mol. Analyty bývají většinou separovány při normální teplotě, při teplotách vyšších než 60 °C by mohlo dojít k degradaci stacionární fáze.

System je složený z polární stacionární fáze a nepolární mobilní fáze. Existují také systémy s obrácenými fázemi, tedy nepolární stacionární a polární mobilní fází. Polarita kolon je závislá na funkčních skupinách vázaných na částice stacionární fáze. Rozdílné polarity separovaných látek spolu s polaritou stacionární fáze pak určují retenční časy jednotlivých analyzovaných látek ve směsi ^[4].

Náplň kolon bývá zrnitý sorbent. Takovým sorbentem bývá obvykle silikagel, oxid hlinitý, nebo třeba oxid křemičitý. K účinné separaci je nutné použít tak malá zrníčka sorbentu (3-10 μm), aby kladla dostatečný odpor prostupující mobilní fázi. Mobilní fáze se potom volí na základě své afinity ke vzorku.

Materiálem pro výrobu kolon je většinou nerezová ocel, mohou však být zhotoveny také ze skla či plastů (např. polyetherketonová vlákna). Kolony využívané při analýzách mohou mít délku 10-25 cm a vnitřní průměr okolo 5 mm. Rychlost průtoku mobilní fáze takovou kolonou je 1-2 ml/min. Dlouhé kolony (25-50 cm) s malými vnitřními průměry (1-2 mm) mají velmi vysokou účinnost a také jsou levnější ^[3, 6].

1. 1. 4. Detekce

Obecně je podmínkou detektorů jejich selektivita k analyzované látce a také jejich nízká citlivost pro použité mobilní fáze. Příkladem detektorů může být fotometrický refraktometrický a fluorescenční detektor.

Fluorescenční detekce nebo také fluorescenční spektrometrie je založena na fluorescenci tedy schopnosti látek absorbovat záření a poté vysílat záření o vyšší vlnové délce, které je pak dále měřeno.

Je hojně využívanou technikou zejména pro svou vysokou citlivost detekce. Jeho detekční limit je až 10^{-12} mol/l. V porovnání s UV/VIS detektorem je citlivost fluorescenčního detektoru 10 až 1000krát vyšší, navíc má vyšší schopnost rozlišit analyt od interferencí. Fluorescence molekuly může být přirozená, nebo se fluorescence dosáhne tzv. značením molekuly, to znamená, že se jejich svítivost podpoří derivatizační reakcí^[7] (jak je to i v případě aminů).

Ve fluorescenčním detektoru (FLD) respektive v jeho průtokové buňce, je molekula vystavena světlu o definované vlnové délce. Zdrojem tohoto záření je obvykle xenonová lampa a jeho působením dojde k excitaci.^[8] Poté se molekula nějakou dobu nachází v takzvaném excitovaném stavu a při návratu molekuly na nižší energetickou hladinu dojde k uvolnění záření – fluorescenci. Ta je obvykle pozorována s nižší energií, a tedy s delší vlnovou délkou než její excitace. Součástí detektoru je fotonásobič umístěn kolmo ke zdroji světla, který detekuje světlo vydávané molekulou^[7, 9].

1. 2. Extrakce

Extrakce je separační metoda, která dělí látky ve směsi na základě jejich rozdílné rozpustnosti. Z fyzikálního hlediska je možné extrakci chápat jako přechod složky fázovým rozhraním z jedné fáze (plynné, kapalné, pevné) do druhé (kapalné, pevné).

První možností je přechod látky mezi pevným a kapalným skupenstvím. Ke směsi látek se přidá rozpouštědlo, ve kterém se rozpustí jen požadovaná složka směsi a zbytek látek v dané směsi zůstane nerozpuštěn^{[10][11]}.

Další náročnější způsob extrakce je z kapaliny do kapaliny. Ta je založena na rozdělovací rovnováze dvou nemísitelných kapalin a na relativní rozpustnosti látek v nemísitelných kapalinách. Extrahovaná složka poté přechází do rozpouštědla, ve kterém je lépe rozpustná^[11, 12].

Dalším způsobem může být extrakce tuhou fází. Jejím základem je tuhý sorbent, přes který protéká analyt, a molekuly látky jsou poté na tomto sorbentu zachycovány. Modifikací této metody je extrakce z kapaliny nebo plynu na tuhou fázi ^[11].

1. 3. Derivatizace

Většina aminů nevykazuje přirozenou fluorescenci a jejich stanovení pomocí fluorescenčního detektoru není možné. Proto se v současné době využívá technika derivatizace^[13]. Derivatizace je proces, kdy se ke vzorku přidá takové chemické činidlo, které transformuje daný analyt na látku, která je detektorem rozpoznatelná. Derivatizovat se mohou jak organické, tak anorganické sloučeniny ^[14]. Bylo vyvinuto velké množství derivatizačních činidel, které způsobí, že původně nesvitivá molekula působením derivatizačního činidla začne vykazovat fluorescenci a je tedy možné ji pomocí fluorescenčního detektoru zaznamenat^[13].

1. 3. 1. Předkolonová a postkolonová derivatizace

Existují dva typy derivatizace. Prvním z nich je derivatizace předkolonová, kdy se činidlo přidává k analytu ještě před jeho umístěním do chromatografu. Tato metoda může být využita v případě, že jak derivatizační činidlo, tak vedlejší produkty jdou ze směsi snadno odstranit.

Při postkolonové derivatizaci se činidlo přidává do mobilní fáze poté, co proteče kolonou. Proces probíhá ve speciálním reaktoru, který je umístěn mezi kolonou a detektorem. Směs je tedy nejdříve chromatografií rozdělena na jednotlivé látky a je vedena do reaktoru, kde je k ní přivedeno činidlo. To potom reaguje se stanovovanou látkou, která je následně detekována^[15].

1. 3. 2. Derivatizační činidla pro stanovení aminosloučenin

Podmínkou funkce derivatizačního činidla je jeho vysoká reaktivita a hlavně specifita. Mělo by tedy dávat pouze jeden produkt. Také by mělo být spolu s přebytečnými produkty snadno odstranitelné ze směsi, nebo by nemělo narušovat separaci ^[15]. Výběr selektivního derivatizačního činidla je optimalizován na základě separačních a detekčních parametrů tak, aby byly výsledky reprodukovatelné, a zároveň aby byla možná jejich realizace^[16].

Vzhledem k velkému množství činidel si v následující podkapitole představíme činidla, která jsou používána zejména při derivatizaci aminů a aminokyselin

1. 3. 2. 1. Činidlo orto-ftalaldehyd (OPA)

Jedním z hojně využívaných činidel je ortho-ftalaldehyd. OPA je sám o sobě nefluorescenční, ale v přítomnosti látek s vázanou aminoskupinou vzniká derivát, který vykazuje vysokou fluorescenci.^[15] Nevýhodou je však nízká stabilita derivátů, a proto se při práci s tímto činidlem musí pracovat velmi rychle. Výhodou je pak jeho krátká reakční doba (kolem jedné minuty)^[16].

1. 3. 2. 2. Činidlo naftalen-2, 3-dikarboxaldehyd (NDA)

NDA je fluorogenní činidlo, využívané při derivatizaci primárních aminů. NDA spolu s kyanidovým iontem a aminem tvoří vysoce fluorescenční derivát s vysokou stabilitou. Lze ho použít při derivatizaci malých objemů vzorků, stejně jako vzorků s nízkými koncentracemi aminů^[16]. Při teplotě 10 °C je derivát stabilní po dobu až 13 hodin^[15].

1. 3. 2. 3. Činidlo 2,2-dihydroxyindan-1,3-dion (ninhydrin)

Ninhydrin je hojně využívaným činidlem zejména pro svou reaktivitu s primárními i sekundárními aminy. Využívá se tedy především při detekci aminokyselin, peptidů a bílkovin. Pro ninhydrin je typické, že s aminosloučeninami v mírně kyselém prostředí vzniká fialová sloučenina. Tato fialová barva je známá jako Ruhemannova fialová a má absorpční maximum při hodnotě 570 nm. Derivatizace ninhydrinem je přesná a snadno reprodukovatelná, a proto jednou z nejvyužívanějších postkolonových derivatizací aminokyselin^[15, 18].

1. 3. 2. 4. Činidlo fluoreskamin

Samotný fluoreskamin nevykazuje fluorescenci, ale reakcí s primárními aminy vznikají silně fluorescenční deriváty. V porovnání s ninhydridem je 10-100 krát citlivější. Je tedy ideálním adeptem pro detekci aminokyselin, peptidů a proteinů^[18]. Jeho výhodou je, že reakce probíhá velmi rychle a nadbytečné činidlo podléhá hydrolyze. Produkty této hydrolyzy již nejsou fluoreskující, a proto bývá využíván v postkolonové derivatizaci aminosloučenin^[19].

1. 3. 2. 5. Činidlo 1-fluor-2,4-dinitrobenzen (FDNB)

Činidlo FDNB (jinak také nazývané Sangerovo činidlo) bývá často používáno ke stanovení aminosloučenin ve farmaceutickém průmyslu, ale také pro derivatizaci aminokyselin

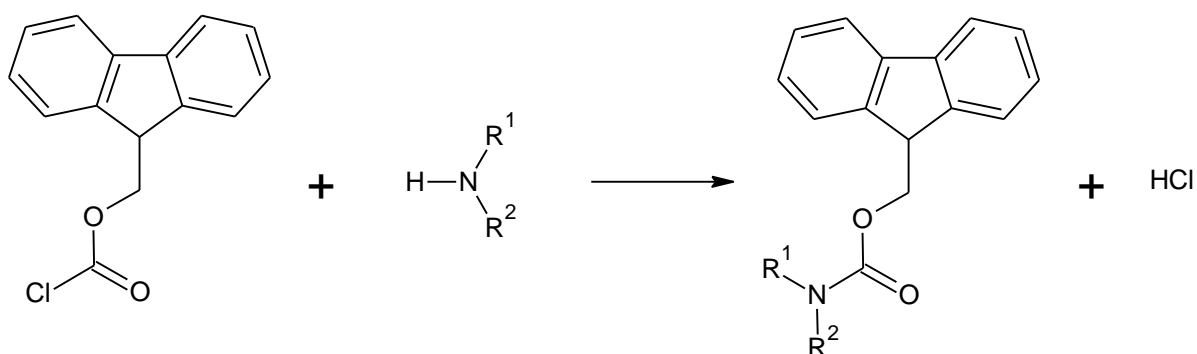
a aminoglykosidů v biologických tekutinách. Další jeho nevýhodou je, že v alkalických roztocích podléhá hydrolyze ^[15].

1. 3. 2. 6. Činidlo 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčan (FMOC-Cl)

Původně bylo FMOC-Cl používáno jako činidlo chránící aminoskupiny při syntéze peptidů. Později bylo zjištěno, že má také jiné využití. Jako derivatizační činidlo FMOC-Cl dobře reaguje jak s primárními, tak sekundárními aminy, alkoholy a aminokyselinami.

Jeho reaktivita je ovlivněna pH a proto nejlépe reaguje v pufovaných roztocích, za vzniku uretanů (obrázek 2). Tato reakce probíhá rychle. Při pokojové teplotě reaguje během pár vteřin ^[15]. Další výhodou tohoto činidla je snadné odstranění jeho přebytku (např. použitím diethyletheru). FMOC-Cl bývá využíván při předkolonové derivatizaci. Na rozdíl od činidel jako je OPA nebo třeba fluoreskamin, FMOC-Cl vykazuje fluorescenci již samotný. Vzhledem k tomu, že jeho přebytek i vedlejší produkty lze snadno odstranit, to není překážkou při analýze, pokud tedy nedojde ke ztrátě produktů derivatizace ^[21].

Toto derivatizační činidlo má však další využití, a v nanotechnologiích. Konkrétně bývá využíván pro kvantifikaci funkčních skupin na povrchu nanomateriálů. Původně byly aminoskupiny na nosičích detekovány pomocí UV testu s použitím organického rozpouštědla. Bylo však zjištěno že fluorescenční metoda s činidlem FMOC-Cl ve vodném roztoku je až 200 krát citlivější ^[22].



Obrázek 2: Reakce FMOC-Cl s aminy za vzniku uretanů ^[15]

1. 3. 2. 6. 1 Využití 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčanu

První zmínka o tomto činidle pochází z roku 1979 ^[29]. V tomto roce H. Moyer a A. J. Boning ^[30] založili metodu za použití FMOC-Cl pro stanovení primárních a sekundárních aminů a aminokyselin. Bylo zjištěno, že pro reakci je třeba alkalického prostředí, a že reakce probíhá velmi rychle, v čase kolem jedné minuty. Co se pak týče detekce, mohou být deriváty stanoveny

fluorescenční emisí při 310 nm a při excitaci 260 nm. Jelikož činidlo samotné podléhá fluorescenci, je nutné jeho přebytek, stejně jako vedlejší produkty, z analytu odstranit. FMOCCl má od té doby obrovské využití v mnoha odvětvích.

Roku 2011 byl autory P. Herbertem, L. Santosem, A. Alvesem ^[31] zveřejněn článek, kdy bylo činidlo FMOCCl použito při stanovování biogenních aminů a aminokyselin ve vzorcích vín. Cílem této práce tedy bylo navrhnout vhodnou metodu pro kvantifikaci 10 biogenních aminů (ethanolamin (ETA), methylamin (METILA), ethylamin (ETILA), histamin (HISTA), tyramin (TIR), beta-fenylethylamin (FEN) isoamylamin (ISO), kadaverin (CAD) a putretein (PUT)) a několika aminokyselin za použití tohoto činidla.

Byly připraveny standardní roztoky aminů, jejichž koncentrace se pohybovaly v rozmezí od 0,15 mg/l do 4,2 mg/l, všechny standardy byly ředěné HCl o koncentraci 0,1 mol/l. Jako vnitřní standard byla použita aminokyselina norvalin. Co se týče mobilní fáze a gradientu toku, byla separace provedena za použití binárního gradientu. První mobilní fáze (A) se skládala z octanu sodného, trethylaminu, tetrahydrofuranu a ethylendiamintetraoctové kyseliny. Hodnota pH byla upravena kyselinou octovou na hodnotu 7,2. První mobilní fáze byla smíchána s druhou mobilní fází. Druhá mobilní fáze (B) byla složena z octanu sodného, acetonitrilu triethylaminu a methanolu. Vlnové délky byly nastaveny na 237 nm excitační a 340 nm emisní vlnová délka. Roztok FMOCCl byl připravený z 15 μ l činidla, přidaného do 420 μ l borátového pufru o pH 10,6 a koncentraci 0,4 mol/l. Roztok se nechal 2 minuty stát v lahvičce. Poté bylo 20 μ l této směsi dávkováno do chromatografu ^[31].

Tento článek byl zveřejněn roku 1996 autorkou M. A. Lopéz a spol. ^[32] V této práci byla navržena metoda pro stanovení dimethylaminu (DMA) v podzemních vodách, za pomoci předkolonové derivatizace činidlem FMOCCl. Vzorky vody byly nejdříve homogenizovány a zfiltrány na membránovém filtru 0,22 μ m. Činidlo FMOCCl bylo rozpuštěno v bezvodém acetonitrilu a smícháno s boritanovým pufrem o koncentraci 1 mol/l tak, aby vzniklá směs dosahovala hodnoty pH 8. Takto upravené činidlo bylo přidáno k 400 μ l vzorku vody nebo také standardu DMA, a poté byla směs 2 min promíchávána pomocí vortexu. Reakční směs byla pak neutralizována kyselinou octovou a přebytek činidla byl odstraněn přidáním hexanu. Směs byla znovu na vortexu 30 s promíchávána. Následně bylo 20 μ l vodné směsi vstříkováno do chromatografu. Mobilní fáze se sestávala z acetatového pufru o pH 4 a koncentraci 0,03 mol/l a acetonitrilu, v poměru 30:70. Průtok mobilní fáze byla nastavena na 1 ml/min, vlnové délky pak na 260 nm excitační a 310 nm emisní.

Roku 2013 autor Sarangapani Muniraj a spol. ^[33] navrhli metodu tzv. jednostupňové derivatizace v injekční stříkačce. Jednalo se tedy o derivatizaci za použití mikrolitrových

objemů derivatizačních činidel. Aminy tedy reagují s činidlem ve stříkačce a poté jsou analyzovány. Byly připraveny standardní vzorky methylaminů o koncentraci 1 g/l. Dále byl připraven pufr, složený z roztoku kyseliny borité (0,05 mol/l) a NaOH (0,5 mol/l). Pufr byl naředěn acetonitrilem v poměru 25:1 a uschován alespoň 24 hodin před další reakcí. Činidlo FMOC bylo rozpuštěno v acetonitrilu a smícháno s pufrem v poměru 1:1. Injekční stříkačkou pak bylo odebráno 100 µl takto připraveného činidla. 20 ml standardního roztoku aminu bylo zahřáto na 70 °C a důkladně promícháno s 1 ml NaOH. Roztok činidla FMOC-Cl byl nasán do stříkačky a následně byl stříkačkou odebrán vzorek aminu. Derivatizace proběhla uvnitř stříkačky a poté byl derivát vpraven do většího množství činidla FMOC-Cl. Takto připravený derivát byl dávkován do chromatografu. Průtok byl nastaven na 1 ml/min, vlnové délky 264 nm excitační a 314 nm pro emisní. Mobilní fáze byla tvořena vodou a acetonitrilem v poměru 40:60.

Roku 1997 byla autorem Pilar Campíns-Falcó a spol. ^[34] navržena metoda derivatizace v tuhé fázi, která bývá využívána pro čištění a derivatizaci biologických tekutin. Jako standardy byly použity diethylamin a propylamin, které byly promyty vodou a sušeny ve vakuu po dobu 1 hodiny. Standardní vzorky činidla FMOC, propylaminu a diethylaminu byly připraveny jejich rozpuštěním v acetonitrilu. Další aminy pak jejich rozpuštěním ve vodě. Derivatizační kolonkou se nechal protéct 1 ml methanolu a následně 1 ml pufru. Následně bylo do kolonky dáno 0,25 ml vzorku a poté se kolonka nechala protéct 0,25 µl činidla FMOC. Získané deriváty byly adsorbovány a následně byla kolonka promyta 1 ml acetonitrilu. Z tohoto extraktu pak bylo odebráno 5 µl a dávkováno do chromatografu. Mobilní fáze byla voda a acetonitril, průtok kolonou byl nastaven na 1 ml/min.

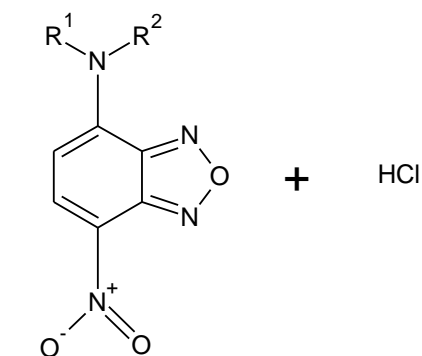
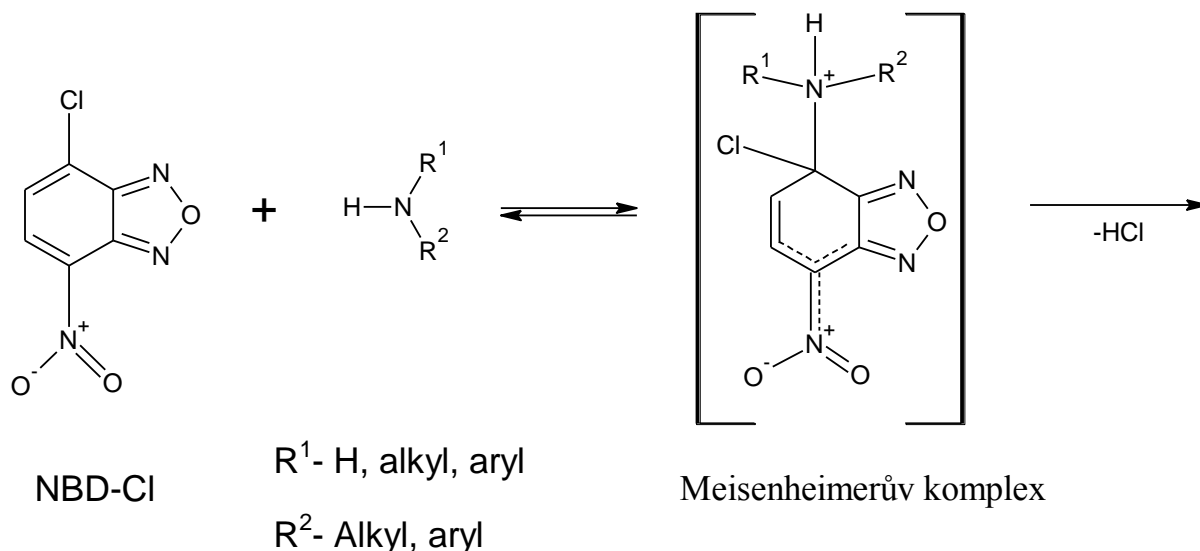
1. 3. 2. 7. Činidlo 4-chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazol (NBD-Cl)

NBD-Cl je halogenidové derivatizační činidlo, používané pro stanovení aminů a aminokyselin. Samostatně je nefluorescenční, ale spolu s alifatickými aminy vznikají silně fluorescenční deriváty Chyba! Nenalezen zdroj odkazů. Činidlo reaguje také s alkoholy a thioley, kdy v alkalickém prostředí vznikají slabě fluorescenční deriváty ^[15].

NBD-Cl má široké využití. Bývá využíván například ve farmaceutickém průmyslu při stanovování léčiv, které obsahují primární a sekundární aminy^[23]. Toto činidlo je levné a snadno dostupné, proto bývá hojně využíván také v biochemickém průmyslu a samozřejmě také v analytických aplikacích. Zejména v biochemickém průmyslu můžeme najít hned několik jeho aplikací. Jednou z nich je značení lipidů, fosfolipidů a cholesterolu při zkoumání membránových procesů v buňkách. Může být také zaveden do biologicky aktivních sloučenin,

kdy umožní sledování těchto derivátů při procesech v organismu. Stejně jako FMOC-Cl pak může napomáhat při studii nanomateriálů. Jednak se toto činidlo aplikuje při syntéze fluorescenčních nanočástic, a pak se také využívá při barvení křemičitých a kompozitních nanočástic.

NBD-Cl reaguje s aminy za vytvoření Meisenheimerova komplexu (Obrázek 3). Sama o sobě by tato reakce probíhala vratně ale v přítomnosti aminu, nebo například hydrogenuhličitanu sodného, dochází ke vzniku derivátu^[24].



Obrázek 3: Reakce NBD-Cl s aminy, vznik Meisenheimerova komplexu^[24]

1. 3. 2. 7. 1. Využití 4-chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazolu

Roku 2003 byla autory A. Al-Majedem^[35] a kolektivem zveřejněna studie pro stanovení léčiva gentamicinu v lidské plasmě. Cílem práce bylo vytvořit jednoduchou, rychlou a citlivou metodu pro stanovení tohoto léčiva fluorescenční metodou za pomoci derivatizačního činidla NBD-Cl. Postup byl popsán jak pro injekční podání léčiva, tak pro podání v očních, či ušních kapkách a mastích. Obecný postup byl následující: byly připraveny vzorky obsahující gentamicin o koncentracích od 4,2 do 21 µg/ml. Vzorky byly naředěny 5 ml destilované vody.

Ze zásobního roztoku byl odebrán 1 ml NBD-Cl a přidán k 4 ml metanolového, fosfátového pufru (pH 7,2). Takto upravené činidlo bylo přidáno k vzorku a směs byla zahřívána ve vodní lázni na 70 °C podobu jedné hodiny. Následně byly roztoky ochlazeny, bylo přidáno 0,2 ml HCl. Směs byla protřepána a následně doplněna na 10 ml. Aby bylo dosaženo koncentrací v rozmezí 0,84-4,2 µg/ml, byly roztoky ještě naředěny 50% vodným roztokem etanolu, který obsahoval 1% HCl. Vlnové délky byly nastaveny na 465 nm excitační a 530 nm emisní. Detekční limit byl 0,11 µg /ml. Metoda byla úspěšná, bylo dosaženo výtěžků kolem 97 %.

Jak již bylo zmíněno, metody stanovování aminosloučenin za pomoci derivatizace jsou dobře využitelné také ve farmaceutickém průmyslu. Roku 2004 byla autorem Ali A. El-Emamem a kolektivem^[36] zveřejněna studie, kdy bylo stanovováno množství léčiva lisinopril (1-[N-(S-1-karboxy-3-fenylpropyl)-l-lysyl]-l-prolindihydrátu) v lidské plasmě. Lisinopril je léčivo, užívané pacienty s vysokým krevním tlakem, nebo také při srdečním selhání. Cílem této práce bylo navrhnout jednoduchou, selektivní a citlivou metodu pro stanovení lisinoprylu jak v dávkových formách, tak v lidské plasmě. Byl připraven 0,3% metanolový roztok NBD-Cl. Dále byl připraven boritanový pufr o pH 9. Standardní roztok lisinoprilu obsahoval 0,1 mg/ml lisinopril dihydrátu rozpuštěného v metanolu. Vzorky lisinoprilu byly připraveny rozpuštěním tablet, které obsahovaly 10 a 20 mg účinné látky. Ty byly smíchány s 50 ml metanolu a směs byla míchána po dobu 45 minut, zfiltrována a doplněna na objem 100 ml metanolem. Derivatizované vzorky byly přeneseny do 10 ml baněk tak, aby jejich koncentrace byla v rozmezí 0,02-3,6 µg/ml. Následně byl přidán ml bumetanidu (vnitřní standard) o koncentraci 1 mg/ml. Mobilní fáze byla tvořena metanolovým roztokem dihydrogenfosforečnanu sodného o koncentraci 0,02 mol/l, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 3 kyselinou fosforečnou. Excitační vlnová délka byla nastavena na 470 nm, emisní na 540 nm. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min.

Stanovením dalších léčiv se zabýval Marwa S. Moneeb^[37]. Byla to léčiva vildagliptin ((2S)-1-[2-[(3-hydroxy-1-adamantyl)amino]acetyl]pyrrolidin-2-karbonitril) a saxagliptin ((1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-(3.1.0)hexan-3-karbonitril]). Vildagliptin (VDG) a saxagliptin (SAX) snižují hladinu glukagonu, a proto jsou využívány při léčbě cukrovky. Zásobní roztoky léčiv o koncentraci 1 mg/ml byly připraveny rozpuštěním 50 mg léčiva v 50 ml etanolu a uchovávány pod hliníkovou folií při 4 °C. Následně byly roztoky naředěny metanolem tak, aby vzniklé koncentrace byly pro VDG v rozmezí 25-400 µg/ml a pro SAX 15-250 µg/ml. Zásobní roztok NBD-Cl byl připraven rozpuštěním 100 mg v 50 ml methanolu. Pufry byly připraveny smícháním 50 ml kyseliny borité o koncentraci 0,2 mol/l s chloridem draselným (pro SAX pH 9, pro VDG pH 8,5). 1 ml standardních roztoků SAX a VDG byl přidán k 1 ml borátového

pufri, poté byl přidán 1 ml roztoku NBD-Cl. Roztoky byly promíchány a zahřívány na 70 °C, SAX po dobu 15 minut, VDG po dobu 20 minut. Následně byly roztoky ochlazeny, okyseleny 0,1 ml HCl (4 mol/l) a doplněny na objem 10 ml metanolem. Vlnové délky byly nastaveny pro SAX 542 nm emisní a 468 nm excitační, pro VDG 540 nm emisní a 465 excitační. Limit detekce byl pro SAX 3 ng/ml a pro VDG 7 ng/ml.

Roku 2006 byla autorem Cailing Yangem a spol.^[38] vytvořena metoda pro stanovení inzulínu v lidském séru. Zásobní roztok inzulínu byl tvořen bovinním inzulínem o koncentraci 1 g/l a fosfátovým pufrem o koncentraci 0,1 mol/l. Zásobní roztok NBD-Cl byl tvořen NBD-Cl o koncentraci 50 mmol/l rozpuštěným v acetonitrilu. Dále byl připraven fosfátový pufri o koncentraci 0,1 mol/l a pH 9. Do 1 ml lahvičky bylo předloženo 300 µl fosfátového pufri, 50 µl zásobního roztoku inzulínu a 150 µl roztoku NBD-Cl (3 mmol/l). Takto připravený roztok byl protřepán a vložen na 2 hodiny do vodní lázně o teplotě 50 °C. Reakce probíhala ve tmě a po jejím skončení byl roztok ochlazen na 0 °C. Bylo odebráno 400 µl této směsi a doplněno na objem 3 ml.

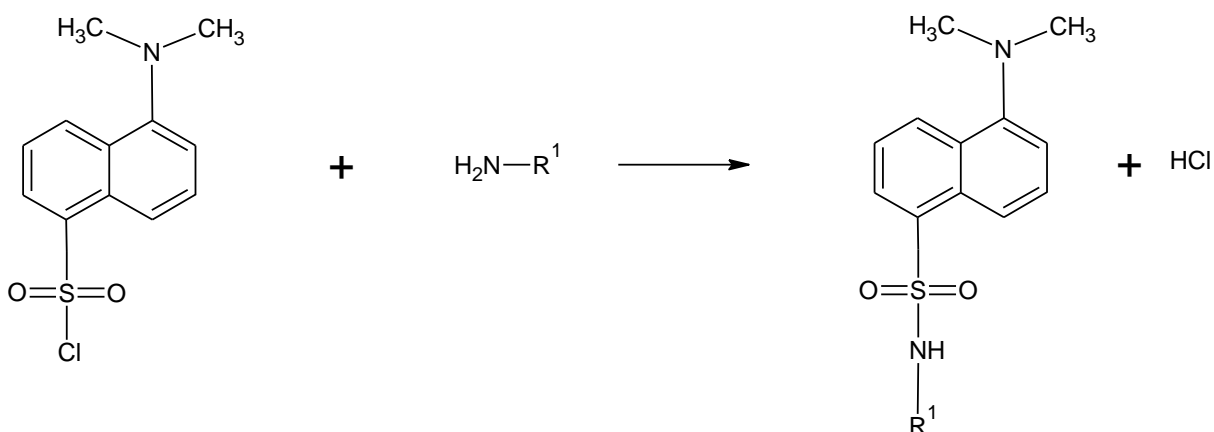
Do séra zdravých lidí byl vpraven zásobní roztok inzulínu v koncentracích 0,46-16,1 µmol/l, následně byl přidán roztok acetonitrilu a fosforečnanového pufri (0,1 mol/l). Tyto vzorky byly míchány po dobu 1 minuty, poté zahřívány na 48 °C po dobu 1 hodiny a následně vloženy na 10 minut do centrifugy. Směs byla zfiltrována a derivatizována. Následně bylo dávkováno 20 µl do chromatografu. Separace proběhla na koloně C18. Mobilní fáze byla tvořena acetonitrilem a vodou, která obsahovala 0,1 % kyseliny trifluoroctové v poměru 30:70. Excitační vlnová délka byla nastavena na 470 nm a emisní na 540 nm. Průtok byl nastaven na 1 ml/min, detekční limit byl 90 nmol/l. Bylo zjištěno, že retenční čas inzulínu-NBD je 10,03 min.

Roku 1984 autoři G. Mellbin a B. E. F. Smith^[39] zveřejnili studii, která se zabývala stanovováním alifatických aminů a to v rozmezí od n-butylaminu až po n-decylamin. 500 µl roztoků aminů o koncentraci 10 mol/l bylo smícháno se 100 µl hydrogenuhličitanu sodného o koncentraci 0,1 mol/l. Následně byly přidány 2 ml 0,05% etanolového roztoku NBD-Cl. Směs byla zahřívána na 55 °C po dobu 1 hodiny. Poté byly deriváty zředěny na požadované koncentrace. Do chromatografu bylo dávkováno 20 µl derivátu, průtok byl nastaven na 1 ml/min. Mobilní fáze byla tvořena acetonitrilem a pufrem (pH 7,7), tvořeným z tris(hydroxymethyl)aminomethanu a HCl v poměru 75:25.

1. 3. 2. 8. Činidlo 5-dimethylaminonafthalen-1-sulfonylchlorid (DNS-Cl)

Jedním z nejpoužívanějších činidel pro stanovení aminů a hlavně aminokyselin v kapalinové chromatografii je dansylchlorid (DNS-Cl). Ten reaguje jak s primárními, tak sekundárními aminy za vzniku silně fluoreskujících produktů^[25]. DNS-Cl reaguje dokonce také s terciálními aminy, kdy za vybraných podmínek poskytuje stabilní a dobře detekovatelné deriváty^[26] (obrázek 4). Všechny tyto reakce probíhají při mírně alkalickém pH. Pokud pH ještě zvýšíme, bude DNS-Cl reagovat docela rychle s fenoly, pomaleji pak také s alkoholy^[15].

V porovnání s OPA je stabilita derivátu u dansylchloridu vyšší. Navíc bylo také zjištěno, že s derivátem kyseliny šťavelové dojde k chemiluminiscenci, čímž se činidlo stává citlivějším a selektivnějším^[27]. Je vysoce reaktivní a proto byl použit pro derivatizaci mnoha fenolických steroidních hormonů^[28].



Obrázek 4: Reakce DNS-Cl s terciálním aminem^[26]

1. 3. 2. 8. 1. Využití 5-dimethylaminonafthalen-1-sulfonylchloridu

Roku 2011 byl autory M. E. Abd El-Ghaffar, D. R. El-Wasseef, D. T. El-Sherbiny, a S. M. El-Ashry^[40] zveřejněn článek, kdy byl DNS-Cl použit pro stanovení dvou léčiv Fenoterol hydrobromidu (1-(3, 5-dihydroxyfenyl)-2-(4-hydroxy-methylfenylethylamino)-etanol) a Ritodrin hydrochloridu (Erythro-1-(p-hydroxyfenyl)-2-(4-hydroxyfenetylamino) propanol). Fenoterol hydrobromid (FNT) a ritodrin hydrochlorid jsou sympatomimetika. FNT je využíván při léčbě obstrukcí dýchacích cest a RTH jako děložní relaxační látka. Byly připraveny standardní roztoky FNT a RTH o koncentraci 100 µg /ml rozpuštěním v acetonu. Uhličitanový pufr (0,1 mol/l) byl připraven rozpuštěním 5,3 g Na₂CO₃ v 500 ml destilované vody. pH bylo upraveno použitím HCl na hodnotu 10,5. Roztok DNS-Cl (1 mg/ml) byl připraven rozpuštěním

v acetonu. Do sady 10 ml baněk byly předloženy různé objemy standardních roztoků FNT a RTH tak, aby koncentrace dosahovaly hodnot od 0,5 do 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Do každé baňky byl následně přidán 1,5 ml uhličitanového pufru a 0,5 ml roztoku DNS-Cl. Při pokojové teplotě byly takto připravené roztoky ponechány 10 minut reagovat. Následně byl produkt extrahován diethyletherem (3 ml) v dělicí nálevce a poté doplněn diethyletherem na objem 10 ml. Vlnové délky excitační/emisní pro FNT 348/517 nm a 343/515 nm pro RTH. Limit detekce byl 0,065 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pro FNT a 0,045 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pro RTH.

Stanovením dalších léčiv obsahujících aminoskupiny se zabýval roku 2001 Ronald Bartzatt^[42]. V této studii bylo zkoumáno stanovení primárních, sekundárních i terciárních aminů po derivatizaci DNS-Cl. Mezi zkoumané látky patřil například isopropylamin, N,N-dimethylalanin, p-chloranilin, benzokain, nebo heroin. Všechny stanovované látky byly rozpuštěny v minimálním množství rozpouštědla. Byl k nim přidán uhličitanový pufr (2 mol/l) o pH 11 tak, aby výsledná koncentrace Na_2CO_3 dosahovala koncentrace 1 mol/l. Bylo přidáno činidlo DNS-Cl rozpuštěné v acetonu o koncentraci 5 mg/ml. Takto připravené vzorky primárních a sekundárních aminů byly umístěny do tmy na dobu 1 hodiny, vzorky terciárních aminů pak na téměř 2 hodiny. Následně byly extrahovány diethyletherem.

Metoda derivatizace našla také své uplatnění při zjišťování přítomnosti omamných látek v lidském organismu. Jednu z takových metod navrhl také Kazuichi Hayakawa a kolektiv^[43]. Konkrétně se jednalo o stanovení metamfetaminu v moči. Tato studie se zabývala nalezením vhodného činidla, a také porovnávala účinnost fluorescenční a chemiluminiscenční detekce. Vzorky metamfetaminu byly připraveny jeho rozpuštěním v lidské moči tak, aby koncentrace dosahovala hodnoty 1×10^{-7} mol/l. Následně byly 2 ml vzorku smíchány se 2 ml NaOH (2%) a extrahováno 2 ml diethyletheru. Byl připraven uhličitanový pufr o koncentraci 0,01 mol/l a pH bylo upraveno pomocí NaOH na hodnotu 9. Dále byl připraven roztok DNS-Cl v acetonu o koncentraci 0,001 mol/l. K 0,1 ml vzorku metamfetaminu nebo k standardním roztokům aminů (1×10^{-4} mol/l), bylo přidáno 0,4 ml uhličitanového pufru a 0,5 ml roztoku DNS-Cl. Vše bylo promícháno a zahříváno na 45 °C vodní lázni po dobu 60 minut. Všechny vzorky byly naředěny acetonitrilem a vodou (1:1) a dávkovány do chromatografu. Mobilní fáze byla tvořena acetonitrilem a vodou (7:3) a průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Fluorescence byla měřena při 343 nm excitační a 530 nm emisní vlnové délce.

Následující práce se zabývala stanovením alifatických aminů ve vzorcích vody. Byla zveřejněna roku 2002 autorem S. Meseguer Lloretem a spol^[44]. Autoři zde využili předkolonové derivatizace na tuhých sorbentech. Extrakční kapsle byly promyty methanolem a uhličitanovým pufrem o pH 12. Byl připraven pufr aceton-hydrogenuhličitan o pH 9,5 a

v tomto pufru bylo rozpuštěno činidlo DNS-Cl tak, aby výsledná koncentrace byla 5 mmol/l. Byly připraveny různé objemy standardních roztoků aminů. Ty byly přeneseny do patron, které obsahovaly tuhý sorbent. Následně byly kazety propláchnuty roztokem činidla v pufru. Patrony byly inkubovány při teplotě 85 °C po dobu 15 minut. Následně byly kazety propláchnuty roztokem NaOH, aby bylo eliminováno zbytkové činidlo. Náplně patron byly vysušeny. Deriváty zadržené na koloně byly desorbovány acetonitrilem. Poté bylo 20 µl takto získaných derivátů dávkováno do chromatografu. Vlnové délky byly nastaveny na 350 nm excitační a 530 nm emisní. Mobilní fáze byla tvořena acetolitrilem a imidazolem (50:50), průtok 1 ml/min. Limity detekce byly v jednotkách mg/l.

Další možné využití dansylchloridu je v potravinářském průmyslu. Roku 2009 byla autorkou Evou Dadákovou a kolektivem^[45] zveřejněna studie, kdy bylo stanovováno množství biogenních aminů v jídle, za použití ultra výkonné kapalinové chromatografie (UPLC). Byla vytvořena metoda pro analýzu osmi aminů (putrescin, cadaverin, spermidin, spermín, fenylethylamin, histamin, tyramin, tryptamin), které se měly nacházet ve vepřovém, hovězím, kuřecím mase, rybách, sýru nebo v houbách. Byly připraveny extrakty těchto potravin, ke kterým byl přidán vnitřní standard (1, 7 - heptandiamin, 400 mg/l). Dále byl připraven uhličitanový pufr, smícháním 50 ml roztoku NaHCO₃ (0,5 mol/l) s 12 ml Na₂CO₃ (0,5 mol/l), pH bylo upraveno na hodnotu pH 11 přidáním K₂CO₃. Pufr byl přidán k upravenému vzorku jídla, a poté krátce promíchán na vortexu. Byly přidány 2 ml dansyl chloridu, rozpuštěného v acetonu (5 mg/ml). Takto připravená směs byla protřepávána 20 hodin při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 200 µl prolinového roztoku, roztok byl hodinu protřepán a extrahován heptanem. Následovalo sušení, rozpuštění v acetonitrilu a filtrace. 20 µl směsi bylo dávkováno do kolony C18 (50 mm x 4,6 mm ID, velikost částic 1,8 µm). Mobilní fáze byla tvořena 100% acetonitrilem smíchaným s 50% vodným roztokem acetonitrilu. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Limity detekce byly mezi 0,032-0,098 µg/l. UV detekce probíhala při 225 nm.

Metodou derivatizace lze aminy stanovit také v alkoholických nápojích, jako je víno, pivo a jiné. Roku 2003 byla autory Zacharenia Loukou a Anastasia Zotou^[46] zveřejněna studie, která se zabývala stanovením 11 biogenních aminů ve vínu a pivu. Byly připraveny standardní roztoky aminů o koncentraci 100 mg/l. Z tohoto zásobního roztoku byly připraveny standardy o různých koncentracích (např. pro methylamin a ethylamin 0,008-0,8 mg/l). Následně byl ke standardům i skutečným vzorkům přidán polyvinylpyrrolidin. Vše bylo mícháno a centrifugováno. Vzorky piva byly navíc odplyněny na ultrazvuku. Byl připraven boritanový pufr rozpuštěním 3,81 g tetraboritanu sodného ve 100 ml vody a byl přidáván NaOH o koncentraci 10 mol/l dokud pH nebylo 10,5. Dále byl připraven 1% roztok DNS-Cl v acetonu.

5 ml standardních i reálných vzorků bylo upraveno boritanovým pufrům na pH 9,5. Z toho byly odebrány 2 ml a bylo přidáno 400 µl vnitřního standardu 1, 7, - diaminoheptanu (8,43 mg/l) a 800 µl roztoku DNS-Cl. Vše bylo doplněno na objem 4 ml acetonem a vodou v poměru 3:1. Směs byla zahřívána na 65 °C půl hodiny a poté dávkována do chromatografu. Mobilní fáze byla tvořena acetonitrilem a vodou a průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Detekce probíhala při 320 nm excitační a 523 nm emisní vlnové délce.

V následující práci bylo zkoumáno množství N-nitrosodimethylaminu (NDMA) ve vzorcích vody. Touto prací se zabýval roku 2006 Woosuk Cha^[47]. Cílem práce bylo stanovení NDMA ve vzorcích vody a odpadní vody. Stanovované množství bylo v jednotkách nanogramů. Nejdříve byla provedena denitrosace. Denitrosační činidlo bylo tvořeno 1 ml 48% kyseliny bromovodíkové, a poté byla doplněna na objem 10 ml kyselinou octovou. Byl zjišťován vliv koncentrace NBD-Cl, dále byl zkoumán vliv pH, teploty a doby derivatizace na stanovení NDMA ve vodě. Byly odvozeny optimální podmínky. Denitrosovaný produkt byl následně derivatizován roztokem NBD-Cl v acetonu o koncentraci 500 µg/l. Bylo přidáno 50 µl NaOH (1 mol/l) a 200 µl NaHCO₃. Směs byla zahřívána na 40 °C po dobu 30 minut. Bylo dávkováno 10-20 µl. Složení mobilní fáze bylo voda-acetonitril (1:2) a průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Fluorescence byla měřena při 340 nm excitační a 530 nm emisní vlnové délce. Detekční limit byl 10 ng/l.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením aminů fluorescenční detekcí, kdy se využívá metody derivatizace. Na základě reaktivnosti, snadnosti použitelnosti a také ceny derivatizaci bylo vybráno derivatizační činidlo DNS-Cl. Byla také provedena optimalizace podmínek derivatizace.

2. 1. Použité chemikálie

Butylamin (BUT), Isopropylamin (iPROP) a cyklohexylamin (CYK) byly dodány firmou Alfa Aesar (Kandel, Německo), 4–chlor–7–nitrobenzofurazan od Alfa Aesar (Karlsruhe, Německo). Diethanolamin (DETA), triethylamin (TEA), kyselina boritá a pyridin (PYR) dodala firma Lach–Ner, s. r. o. (Neratovice, ČR). Diethylamin (DEA), 9–(fluorenyl)ethylchloromravenčan a ethylendiamin (EDA) od Fluka (Steinheim, Švýcarsko). 40% vodný roztok dimethylaminu (DMA) a hydrogenuhličitan sodný od Merk (Darmstadt, Německo). Isobutylamin (iBUT), Propylamin (PROP), sec–butylamin (sec-BUT), terc–butylamin (terc-BUT) od ACROS ORGANICS (New Jersey, USA). Acetonitril – grade od Sigma–Aldrich (St. Louis, USA), Dansyl chlorid, od TCI (Tokyo, Japonsko), Hydroxid sodný od PENTA (Chrudim, ČR), Morfolin (MORF), technický, od VWR CHEMICALS (Rue Carnot, Francie), n – hexan od Sigma–Aldrich (Steinheim, Německo), n – pentan od LAB–SCAN (Dublin, Irsko), Triethanolamin (TETA) od VEB LABORCHEMIE APOLDA (Apolda, Německo).

2. 2. Použité přístroje

Pro separaci vzorků byl použit kapalinový chromatograf od firmy Shimadzu (Japonsko), který obsahoval řídicí jednotku SCL – 10A a kolonu C18 (150 mm × 4,6 mm, 2,6 μm). Další součástí chromatografu byl termostat CTO – 10 ASVP. Dávkovacím systémem byl autosampler SIL-10 AD a dávkovací objem 20 μl. Detekce probíhala pomocí fluorescenčního detektoru RF-20 A xs. Pro ohřev látek byla použita sušárna Memmert UM400 (Německo). Látky byly míchány za použití elektronické míchačky YELLOW LINE (2 200 otáček/min). Pro odplyňování některých látek (např. mobilní fáze) byl použit ultrazvuk PS 3000A (Slovensko). Redestilovaná voda byla získávána z demistanice Milli-Q od firmy Merck (Německo). pH pufrů bylo zjišťováno pomocí pH metru Thermo Orion model 310 od firmy Thermo Electron Corp (USA). Na odstředění látek při extrakci byla použita centrifuga Spectrafuge 16M od firmy Labnet (USA)

2. 3. Optimalizace metody

Jak již bylo zmíněno, pro citlivé, selektivní a přesné stanovení aminů je potřeba metodu derivatizace optimalizovat. Jako modelový amin byl použit dimethylamin (DMA). Optimalizována byla teplota a čas derivatizační reakce, složení mobilní fáze a také množství derivatizačního činidla.

2. 3. 1. Příprava roztoků

Standardní roztoky aminů byly připraveny ředěním zásobních roztoků a jejich doplněním na objemy 10 ml a 25 ml deionizovanou vodou.

Zásobní roztok 5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchloridu byl připraven rozpuštěním 0,1349 g DNS-Cl v acetonitrilu a následně doplněn na objem 50 ml. Výsledná koncentrace tohoto roztoku byla 2 mmol/l. Dále byl připraven uhličitanový pufr o koncentraci 0,5 mol/l rozpuštěním 4,2 g hydrogenuhličitanu sodného ve 100 ml deionizované vody. pH pufru bylo upraveno pomocí NaOH na hodnotu 9.

2. 3. 2. Derivatizace pomocí 5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchloridu

Vytvoření této metody bylo inspirováno prací autora Woosuk Cha^[47], který se zabýval stanovením N-nitrosodimethylaminu ve vzorcích vody. Podle této práce byly vlnové délky nastaveny na 340 nm excitační a 530 nm emisní. Pro tuto práci byl jako modelový amin použit dimethylamin. Citlivost detektoru byla nastavena na hodnotu high 4x. Pro získání nižší hodnoty limitu detekce byla citlivost zvýšena na high 16x.

Bylo optimalizováno množství činidla, vliv teploty a vliv doby derivatizace na plochu výsledného píku. V 5 ml nádobkách bylo smícháno 400 μ l dimethylaminu (1×10^{-4} mol/l) se 400 μ l uhličitanového pufru o pH 9. Dále bylo přidáno 300 μ l roztoku DNS-Cl v acetonitrilu, o koncentraci 2 mmol/l. Byl také připraven slepý roztok, který obsahoval místo DMA deionizovanou vodu (400 μ l). Takto připravené deriváty byly 20 s promíchávány na elektronickém míchadle, poté vloženy do sušárny kde byly po dobu 10 minut zahřívány na 70 °C. 20 μ l derivátů bylo dávkováno do chromatografu. Mobilní fáze byla tvořena vodou a acetonitrilem v poměru 60:40.

Jedním ze sledovaných faktorů, které mají vliv na výtěžek reakce, je množství derivatizačního činidla. Deriváty byly připraveny stejně jako v předchozím případě. Měnilo se pouze množství činidla DNS-Cl, které bylo přidáváno v množstvích od 100 do 800 μ l. Deriváty byly 20 s promíchávány a poté zahřívány na 70 °C po dobu 10 minut. Po ochlazení ve vodní lázni byly dávkovány do chromatografu.

Dalším sledovaným faktorem byl vliv teploty na plochu píku. Byly připraveny deriváty smícháním 400 μl roztoků DMA (1×10^{-4} mol/l) se 400 μl uhličitanového pufru (pH 9) a 300 μl činidla DNS-Cl. Postupně pak byly vkládány do sušárny, při různých teplotách. Reaktivita byla zkoumána při teplotách od 40 do 80 °C. Následně byly deriváty dávkovány do chromatografu.

Výtěžek lze také ovlivnit dobou derivatizace. Deriváty byly připraveny stejně jako v předchozím případě. Roztoky byly promíchány a zahřívány na 70 °C po různě dlouhou dobu. Sledovaná doba derivatizace se pohybovala v rozmezí od 5-30 minut. Všechny roztoky byly poté ochlazeny ve vodní lázni a dávkovány do chromatografu.

2. 3. 2. 1. Kalibrace metody

Pro zjištění limitu detekce byly připraveny roztoky dimethylaminu v různých koncentracích. Proměřované koncentrace se pohybovaly v rozmezí od 10^{-4} do 5×10^{-5} mol/l. 400 μl takto připravených roztoků bylo smícháno se 400 μl uhličitanového pufru o pH 9 a koncentraci 0,5 mol/l a s 300 μl acetonitrilového roztoku DNS-Cl (2 mmol/l). Deriváty byly 20 sekund promíchávány na elektronickém míchadle a následně v sušárně zahřívány na 70 °C po dobu 10 minut. Dále byly deriváty ochlazeny a po 20 μl injektovány do chromatografu.

2. 4. Kvalitativní stanovení aminů

Bylo stanovováno celkem 14 alifatických aminů: butylamin, cyklobutylamin, isobutylamin, isopropylamin, morfolin, propylamin, sekundární a terciární bytylamin, etylendiamin, diethanolamin, triethanolamin, diethylamin, triethylamin a pyridin. Byly vytvořeny standardní roztoky jednotlivých aminů a každý z nich byl před vlastní analýzou derivatizován. Následně byla také proměřena směs těchto aminů a byla prozkoumána možnost jejich chromatografické separace. U každého aminu byl sledován retenční čas a také limit detekce.

2. 4. 1. Stanovení aminů

Deriváty vybraných aminů byly připraveny stejně jako v případě dimethylaminu (viz. Kapitola 2. 3. 2.). Stejným způsobem byl připraven také slepý vzorek, kdy byla místo aminu použita deionizovaná voda. Každý derivát byl připraven třikrát a také třikrát proměřen. 20 μl derivátů bylo dávkováno do chromatografu. Mobilní fáze byla tvořena vodou a acetonitrem v poměru 50:50 a průtok byl nastaven na 0,5 ml/min. Fluorescence byla měřena při 344 nm excitační a 526 nm emisní vlnové délce.

2. 5. Vytvoření metody pro extrakci aminů

Součástí této bakalářské práce bylo také stanovení aminů jako součástí výbušných směsí. Reálné vzorky těchto směsí byly stírány tamponky, tvořenými skelnou tkaninou. Bylo tedy třeba vytvořit metodu extrakce aminů z těchto tamponků. Pro extrakci byla vybrána celkem tři činidla acetonitril, methanol a voda. Byl zvolen dimethylamin jako modelový amin a byla zkoumána účinnost jednotlivých extrakčních činidel.

Vzorky pro stanovení byly připraveny následujícím způsobem. 100 μl roztoku DMA v acetonitrilu o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ bylo nakapáno na tamponek, který byl vložen do Eppendorfovy nádoby. Do nádoby bylo přidáno 1,5 ml extrakčního činidla. Byl připraven také slepý vzorek, místo dimethylaminu bylo použito 100 μl acetonitrilu. Takto připravené vzorky byly 30 minut extrahovány. Po uplynutí této doby byla provedena derivatizace podle vytvořené metody.

Pro derivatizaci činidlem DNS-Cl bylo odebráno 400 μl extraktu a přidáno 400 μl uhličitanového pufru o pH 9 a 300 μl acetonitrilového roztoku DNS-Cl o koncentraci 2 mmol/l. Vše bylo promícháno a zahříváno 10 minut na 70 °C. U roztoků, které byly extrahovány methanolem a acetonitrilem, došlo ke vzniku bílých vloček. Ty byly odstraněny vložením do centrifugy, aby nedocházelo k ucpávání předkolonky. Připravené vzorky byly dávkovány do chromatografu.

2. 5. 1. Stanovení vybraných amin

Pomocí vytvořené metody byly stanoveny i ostatní aminy. Stejně jako modelový dimethylamin byly jednotlivé aminy naředěny acetonitrilem a poté nakapány na tamponky. Ty byly vloženy do Eppendorfovy nádoby a bylo k nim přidáno 1,5 ml vody. Extrakce probíhala 30 minut. Deriváty byly připraveny stejným způsobem jako v předchozí kapitole.

Takto připravené extrakty nedosahovaly příliš vysokých výtěžků. Z tohoto důvodu byly extrakty po 30 minutách extrahování vloženy navíc do ultrazvuku na 10 minut. To způsobilo nárůst výtěžnosti všech aminů. U některých byl nárůst vyšší o více než 10%. Proto byl tento krok zařazen při analýze reálných vzorků.

2. 5. 2. Stanovení reálných vzorků

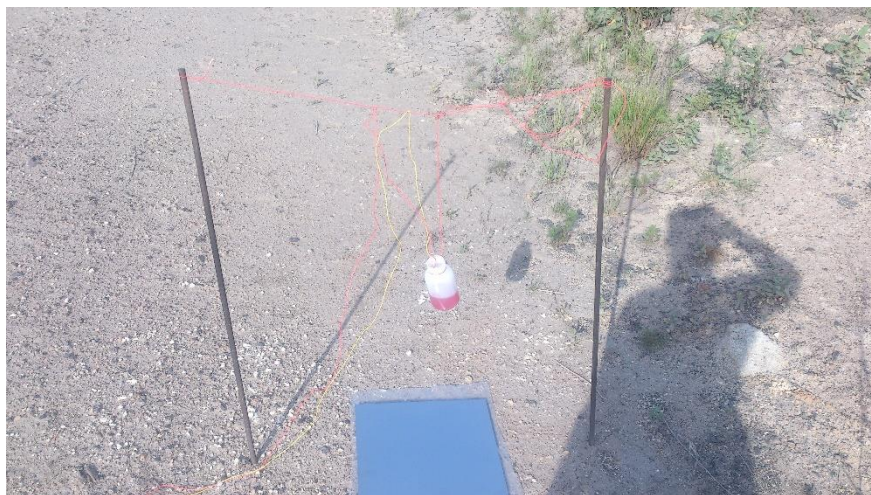
Jak již bylo zmíněno, tato bakalářská práce se zabývala také stanovením aminů, které byly přimíchány do směsi výbušnin. Jako aminy byly použity diethanolamin, triethanolamin, diethylamin, triethylamin, propylamin, isopropylamin, N-butylamina sekundární butylamin. Byly vytvořeny dvě detonační směsi. První detonační směs byla tvořená nitrometanem a

nitrobenzenem, ke kterým byl přidáván příslušný amin. Druhá směs byla tvořena aminem, nitrometanem a dinitrotoluenem.

Nádobky s těmito výbušnými roztoky byly zavěšeny a byla do nich vložena rozbuška. Pod tyto nádobky byl založen nerezový plech (33 x 33 cm). Ukázka odpaliště je uvedena na obrázku 5. Po detonaci byly plechy stírány tamponky ze skelné tkaniny a vloženy do lahvíček opatřených septy. Ukázka plechu po detonaci je uvedena na Obrázku 6.

Vzorky v lahvíčkách byly převezeny k analýze do laboratoře. Tamponky byly vyjmuty z lahvíček a vloženy do Eppendorfových nádobek. Bylo přidáno 1,5 ml vody a půl hodiny probíhala extrakce. Následně byly vzorky vloženy do ultrazvuku na 10 minut.

Bylo odpipetováno 400 μ l extraktů jednotlivých aminů přidáno 400 μ l uhličitanového pufru o pH 9 a koncentraci 0,5 mol/l a 300 μ l roztoku DNS-Cl o koncentraci 2 mmol/l (v acetonitrilu). Vše bylo promícháno a zahříváno 10 minut na 70 °C.



Obrázek 5: Detonační směs se založeným nerezovým plechem a rozbuškou

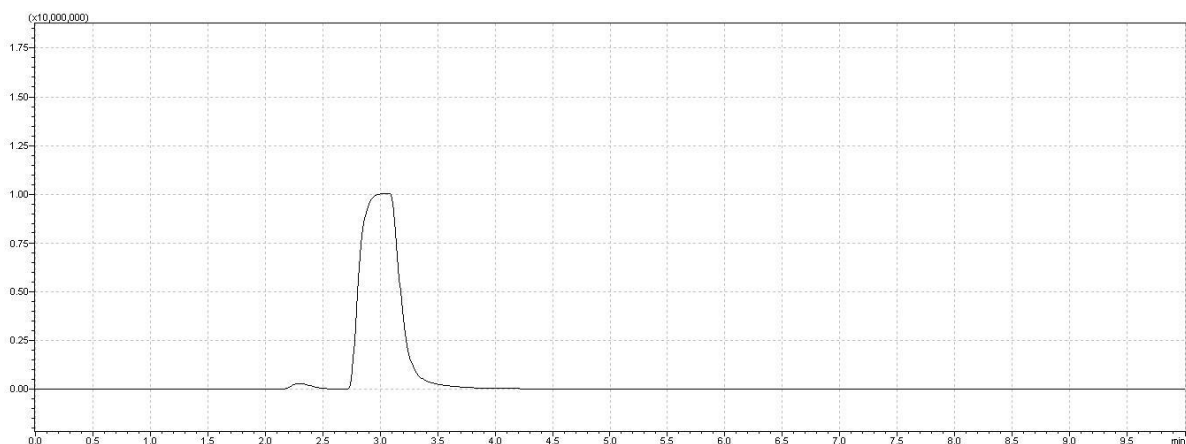


Obrázek 6: Stírání vzorků z plechu po detonaci

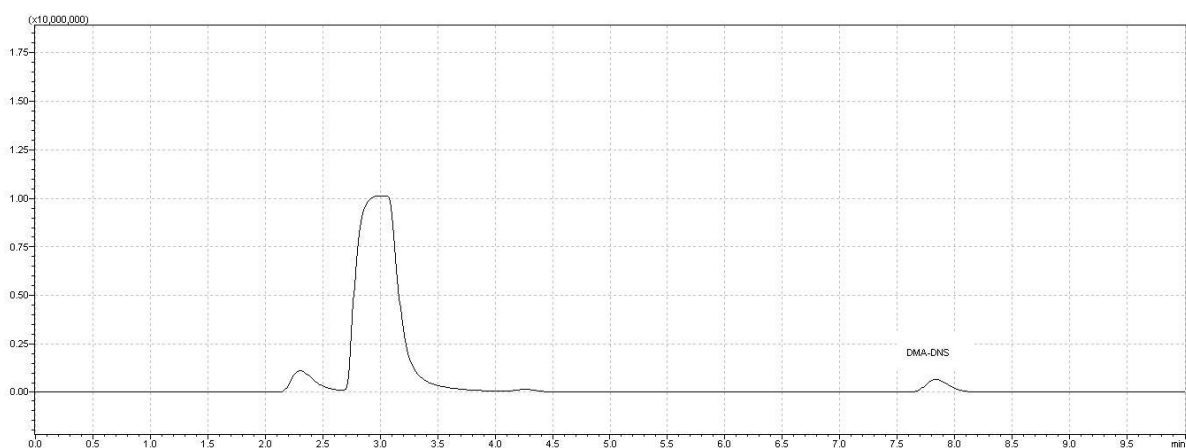
3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3. 1. Výsledky optimalizace složení mobilní fáze

Pík byl nalezen porovnáním chromatogramu slepého pokusu (Obrázek 7) s chromatogramem derivátu DMA-DNS (Obrázek 8). Mobilní fáze byla tvořena vodou a acetonitrilem v poměru 40:60. Retenční čas DMA byl 7,8 min. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min.



Obrázek 7: Chromatogram slepého pokusu

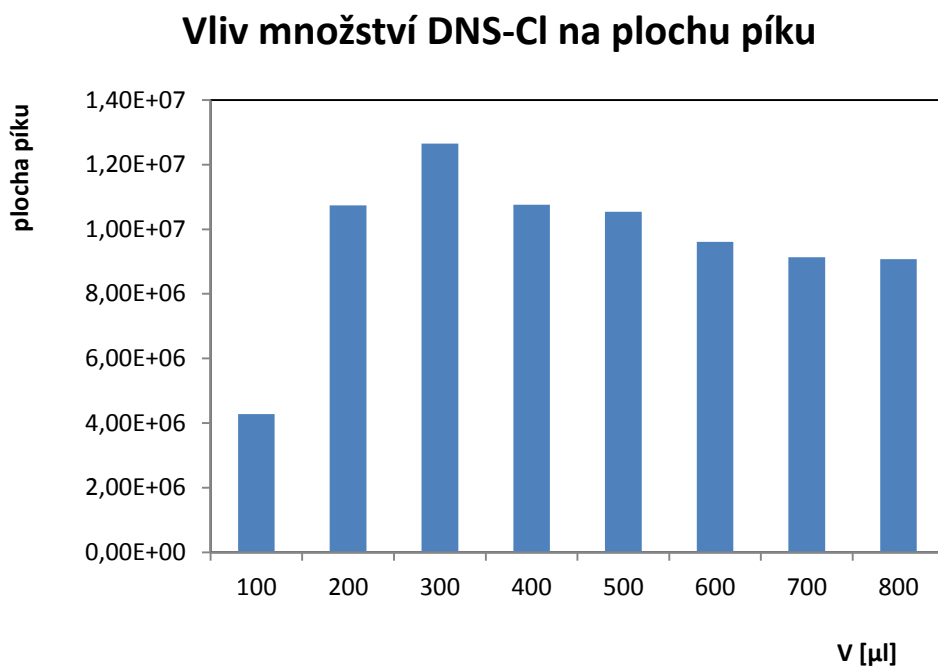


Obrázek 8: Chromatogram DMA-DNS

3. 2. Výsledky optimalizace množství derivatizačního činidla

Byly zaznamenány plochy píku a byl vytvořen graf závislosti plochy píku derivátu DMA-DNS na množství dansylchloridu (Obrázek 9). Z grafu je patrné, že plocha píku je

největší při použití 300 μl činidla o koncentraci 2 mmol/l. S nárůstem objemu činidla klesá výtěžek derivatizace. Pro další měření bylo tedy zvoleno množství 300 μl DNS-Cl.

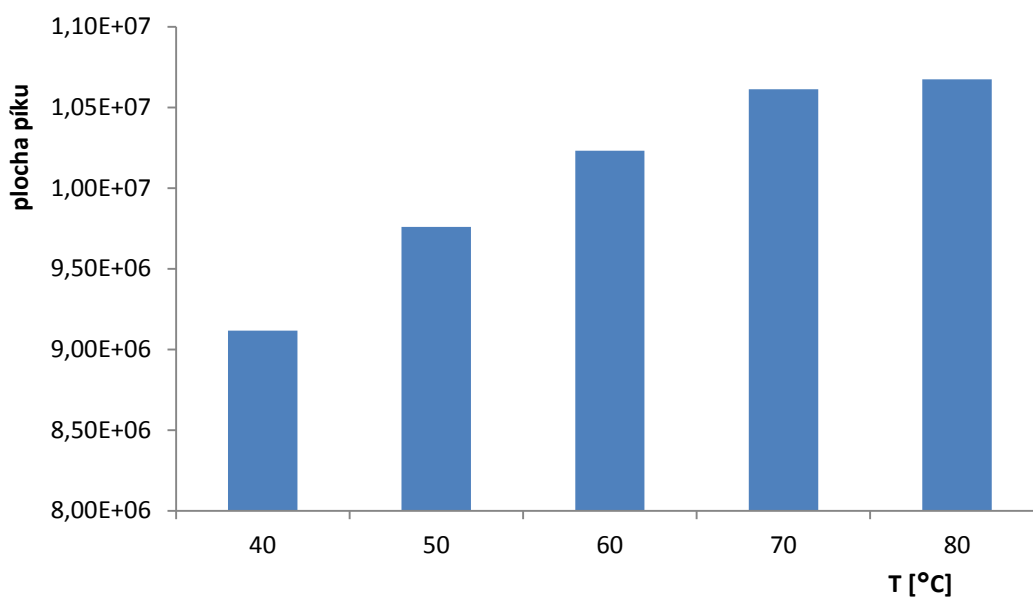


Obrázek 9: Vliv množství DNS-Cl na plochu píku

3. 3. Výsledky optimalizace teploty

Reaktivita derivátů byla sledována při teplotách od 40 do 80 $^{\circ}\text{C}$. Byly vyhodnoceny plochy píku DMA-DNS a zaznamenány do grafu. Výsledkem byl graf závislosti plochy píku na teplotě (Obrázek 10). Z grafu je patrné, že plocha píku je největší, probíhá-li derivatizace při teplotách mezi 70 $^{\circ}\text{C}$ a 80 $^{\circ}\text{C}$. Pro další práci byla zvolena teplota 70 $^{\circ}\text{C}$.

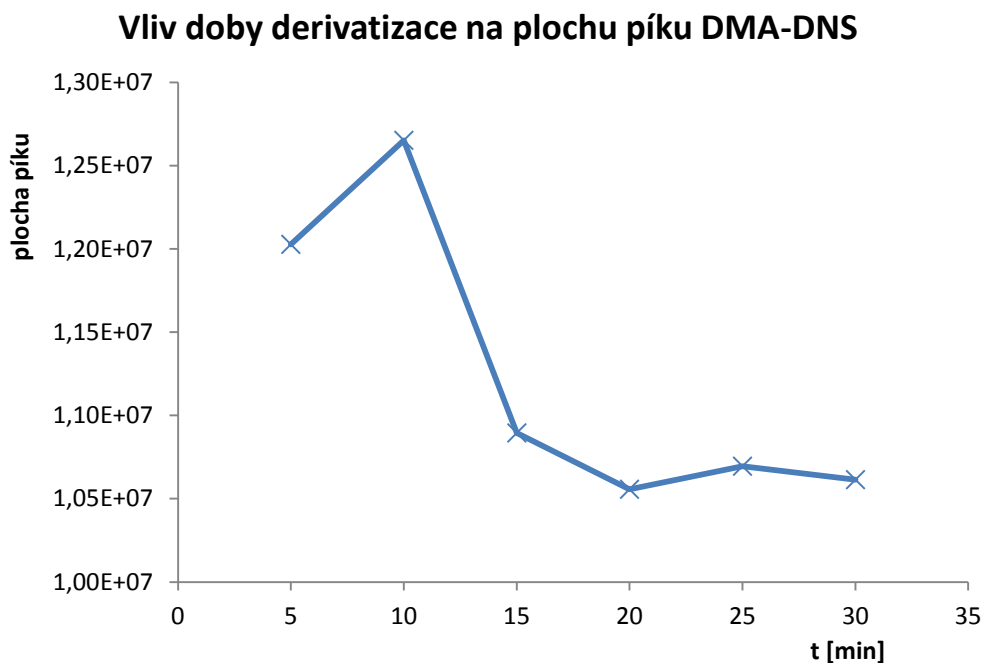
Vliv teploty na Plochu píku DMA-DNS



Obrázek 10: Vliv teploty na plochu píku DMA-DNS

3. 4. Výsledky optimalizace doby derivatizace

Deriváty byly zahřívány na 70 °C po dobu od 5 do 30 minut. Následně proběhla chromatografická separace. Byly zaznamenány plochy píku DMA-DNS a tyto hodnoty pak vloženy do grafu. Výsledkem byla závislost plochy píku na reakční době (Obrázek 11). Z grafu je patrné, že nejvhodnější doba pro reakci je 10 minut. Při delší době reakce plocha píku prudce klesá a klesá tedy i výtěžek reakce.

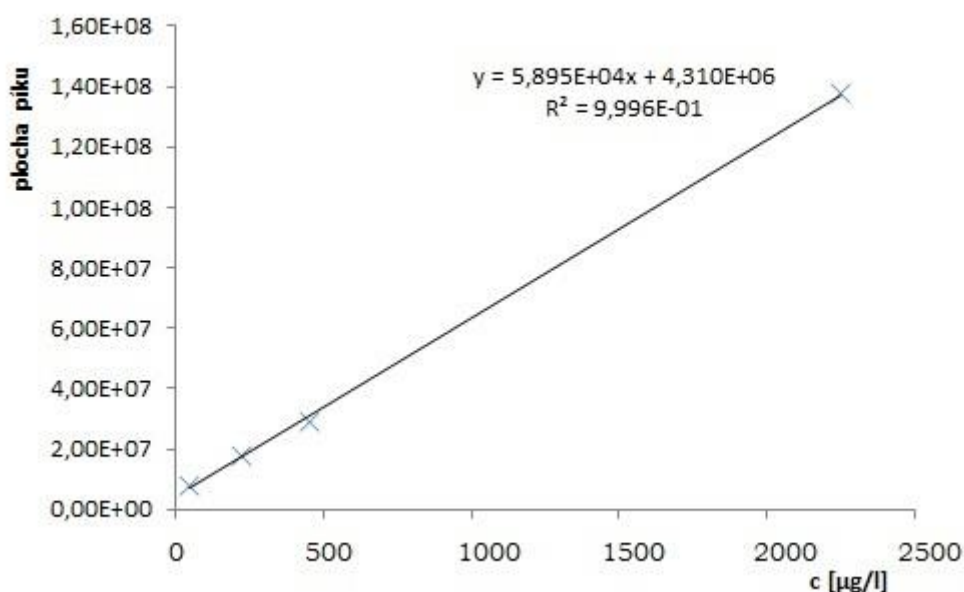


Obrázek 11: Vliv doby derivatizace na plochu píku DMA-DNS

3. 5. Výsledky kalibrace metody

Po proměření různých koncentrací DMA byly vyhodnoceny plochy píku a vloženy do grafu (Obrázek 12). Byla získána závislost plochy píku DMA-DNS na koncentraci DMA. Lineární rozsah tohoto činidla byl od 5×10^{-5} - 1×10^{-6} mol/l. Koeficient determinace této lineární části byl $R^2 = 0,996$. Pro stanovení co nejnižšího limitu detekce byla zvýšena citlivost fluorescenčního detektoru. Při citlivosti high 16x byl limit detekce stanoven na 1×10^{-7} mol/l (4,5 $\mu\text{g/l}$).

Kalibrační závislost DNS-DMA



Obrázek 12: Kalibrační závislost DNS-DMA

3. 6. Shrnutí metody

Pro stanovení modelového aminu (dimethylaminu) se metoda ukázala jako účinná. Souhrn údajů získaných při optimalizaci byl shrnut v Tabulce 1.

Tabulka 1: Shrnutí údajů optimalizace

Činidlo	DNS-Cl
Množství činidla	200 µl
Koncentrace činidla	2 mM
Pufr (množství, koncentrace, pH)	Uhličitanový (400 µl; 0,5mol/l; 9)
Teplota derivatizace	70 °C
Doba derivatizace	10 minut
Doba analýzy	10 minut
Limit detekce DMA	4,5 µg/l

3. 7. Výsledky stanovení aminů

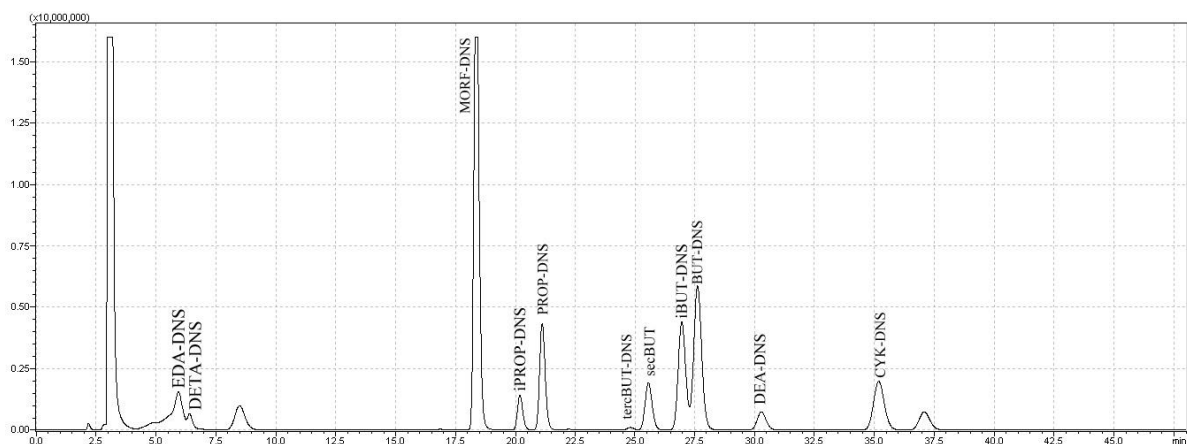
Chromatogramy jednotlivých standardů jednotlivých aminů byly srovnány s chromatogramem slepého pokusu a byly odečteny jejich retenční časy. Rovněž byly získány jejich limity detekce. V Tabulce 2 jsou shrnuty průměrné retenční časy jednotlivých aminů.

Tabulka 2: Retenční časy aminů po derivatizaci DNS-Cl

Amin	Retenční čas (min)
Butylamin	27,03
Cyklobutylamin	34,51
Isobutylamin	26,40
Isopropylamin	19,80
Morfolin	17,51
Propylamin	20,26
Sec-Butylamin	25,15
Terc-butylamin	24,52
Ethylendiamin	4,24
Diethanolamin	5,64
Deiethylamin	29,82

Ne všechny aminy ale byly nalezeny. U derivátu pyridinu a triethylaminu nebyl ve srovnání se slepým pokusem nalezen žádný pík. Nedošlo tedy k zderivatizování aminu. Dalším problémem byly téměř stejné retenční časy u ethylendiaminu, triethylaminu a diethanolaminu. Proto byl poměr mobilní fáze změněn na voda-acetonitril 40:60. Touto změnou se podařilo oddělit ethylendiamin, ne však triethylamin od diethanolaminu. Z tohoto důvodu nebyl triethylamin přidán do směsi aminů.

Směs aminů tedy obsahovala 11 aminů. Pro jejich separaci byla nastavena gradientová eluce. Složení mobilní fáze bylo v jednotlivých časech následující: voda-acetonitril 0-10 min 60:40, 11 min 50:50, 40 min 50:50. Chromatogram směsi aminů je zobrazen na Obrázku 11. Koncentrace jednotlivých aminů ve směsi je 1×10^{-4} mol/l.



Obrázek 13: Chromatogram směsi aminů, stanovených metodou pro DNS-Cl

3. 8. Výsledky extrakce aminů

Bylo potřeba vytvořit metodu pro extrakci aminů. Bylo tedy nutné nalézt vhodné extrakční činidlo. Pro extrakci byla vybrána tři činidla: methanol, acetonitril a voda. Podrobněji je tato extrakce popsána v kapitole 2. 5.

Nejvhodnější extrakční činidlo bylo vybráno na základě srovnání se slepým pokusem a také na výtěžku jednotlivých reakcí. Byly porovnávány plochy píků a z těchto hodnot byl vypočten výtěžek. Výtěžek byl vypočten podle vzorce 1. V čitateli byl rozdíl plochy píku aminu a slepého pokusu a ve jmenovateli rozdíl průměru ploch píku maximálního výtěžku DMA a průměru ploch píku slepého pokusu.

$$VÝTĚŽEK = \frac{A(\text{amin}) - A(\text{slepý pokus})}{\phi A(\text{max.výtěžek}) - \phi A(\text{slepý pokus})} \quad (1)$$

Jako neúčinné extrakční činidlo se ukázal methanol, vzhledem k tomu, že pík derivátu DMA-DNS byl deformovaný, tudíž i výtěžky této reakce vykazovali záporné hodnoty. U vody a acetonitrilu nebyla pozorována deformace. Jako nejvhodnější činidlo byla zvolena voda, protože dosahovala vyšších výtěžků (okolo 50 %) než acetonitril (viz Tabulka 3).

Tabulka 3: Výtěžky extrakce DMA po derivatizaci DNS-Cl

Extrakční činidlo	Voda	Acetonitril
Výtěžek (%)	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	0,49

3. 9. Výsledky stanovení reálných vzorků

Každá směs aminů byla charakteristická svou barvou a způsobem detonace. Ne u všech směsí však k explozi došlo. V tabulkách 4 a 5 jsou zaznamenány barvy a výsledky detonace jednotlivých směsí.

Tabulka 4: Barva a výsledky detonačních směsí tvořené aminem, nitrometanem a nitrobenzenem

Amin	Barva detonační směsi	Výsledek detonace
Diethanolamin	Žlutooranžová	Překlopení terče
Triethanolamin	Žlutooranžová	Překlopení terče
Diethylami	Červená	Detonace
Triethylamin	Žlutooranžová	Nedošlo k detonaci
Propylamin	Červená	Mírná deformace
Isopropylamin	Růžová	Detonace
N-butylamin	Růžová	Perforace terče (5 otvorů)
Sec-butylamin	Růžová	Detonace

Tabulka 5: Barva a výsledky detonačních směsí tvořené aminem, nitrometanem a dinitrotoluenem

Amin	Barva detonační směsi	Výsledek detonace
Diethanolamin	Červená	Mírná deformace
Triethanolamin	červená	Detonace
Diethylami	Červená	Detonace
Triethylamin	Červená	Perforace
Propylamin	Fialová	Detonace
Isopropylamin	Fialová	Detonace
N-butylamin	Fialová	Detonace
Sec-butylamin	fialová	Detonace

Chromatogramy extraktů aminů byly srovnávány se slepým vzorkem. Slepé vzorky byly připraveny setřením nerezového plechu před detonací a setřením dalšího čistého plechu po provedení všech detonací, kvůli možnému výskytu nečistot. Chromatogramy extraktů jednotlivých aminů byly také porovnávány s chromatogramy standardů jednotlivých aminů. Výsledky byly vyhodnoceny. Metodou s činidlem DNS-Cl se povedlo stanovit většinu aminů. Aminy sec-butylamin a diethylamin nebyly detekovány. Mohlo dojít ke spálení aminu při detonaci. Vzorky č. 1 obsahovaly detonační směs složenou z nitrometanu, nitrobenzenu a příslušného aminu. Vzorky č. 2 obsahovaly směs nitrometanu, dinitrotoluenem a příslušného aminu. Výsledky stanovení aminů jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Výsledky stanovení aminů po detonaci metodou DNS-Cl

Amin	Metoda	Vzorek 1	Vzorek 2
Isopropylamin	DNS-CL	neidentifikován	identifikován
Diethylamin	DNS-CL	neidentifikován	neidentifikován
N-Butyamin	DNS-CL	identifikován	identifikován
Sec-butylamin	DNS-CL	neidentifikován	neidentifikován
Triethanolamin	DNS-CL	identifikován	identifikován
Propylamin	DNS-CL	identifikován	identifikován
Triethylamin	DNS-CL	identifikován	identifikován
Diethanolamin	DNS-CL	identifikován	identifikován

4 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení aminů kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí. Bylo zapotřebí vytvořit analytickou metodu, díky které by takové stanovení bylo možné. Vzhledem k tomu, že aminy nejsou sloučeniny, které by samy vykazovali fluorescenci, byla nutná jejich derivatizace. Bylo vybráno derivatizační činidlo 5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid (DNS-Cl). S tímto činidlem byla provedena optimalizace metody, kdy byly zjišťovány optimální podmínky pro stanovení aminů. Jako modelový amin byl použit dimethylamin.

Kromě dvou aminů (pyridinu a triethylaminu) se podařilo všechny aminy stanovit. Také směs těchto aminů se podařilo chromatograficky rozdělit.

Součástí práce bylo také stanovení reálných vzorků, které byly získány z výbušné směsi po jejím odpálení. Tyto vzorky byly sbírány pomocí tamponků, které bylo třeba dále analyzovat. Z tohoto důvodu musela být vytvořena také metoda extrakce. Jako extrakční činidlo byla použita voda. Při stanovení reálných vzorků se činidlo DNS-Cl osvědčilo. Podařilo se identifikovat téměř všechny aminy. Z celkových výsledků vyplývá, že vytvořená metoda je vhodná pro stanovování aminů v povýbuchových zplodinách.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] MUNIRAJ, Sarangapani, Hou-Kung SHIH, Ying-Fang CHEN, Chunming HSIECH, Vinoth Kumar PONNUSAMY a Jen-Fon JEN. Novel one-step headspace dynamic in-syringe liquid phase derivatization–extraction technique for the determination of aqueous aliphatic amines by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* [online] **2013**. 1296, 104-110 [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.03.053. ISSN 00219673.
- [2] PATNAIK, Pradyot. Application of High-Performance Liquid Chromatography in Environmental Analysis. In: *Handbook of Environmental Analysis : Chemical Pollutants in Air, Water, Soil, and Solid Wastes, Second Edition, CRC Press, ProQuest Ebook Central* [online] **2010**. 109-113. [cit. 2018-02-21]. ISBN 9781420065824. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/upce-ebooks/reader.action?docID=589926&ppg=40>
- [3] LIBRE TEXTS™. 2017. Chemistry. *Libre texts* [online]. Updated 2017-02-17 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography
- [4] The United States Pharmacopeial Convention. Physical Tests And Determinations. In: *Food Chemicals Codex* (10th Edition). The United States Pharmacopeial Convention [online] **2016**. 1385-1426 [cit. 2018-02-21]. ISBN 978-1-5231-0167-2.
- [5] BERGER, Christian, NIXON, Lori. HPLC. In: *Biopharm, dod. The BioPharm Guide to Bioanalytical Methods* [online] **2001**. 23-25 [cit. 2018-03-7]. ISSN 1040-8304.
- [6] KLOUDA, Pavel. Chromatografie. In: *Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd.* Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 25-26. ISBN 80-86369-07-2.
- [7] FRANZ, Holger; JENDREIZIK, Verena. Fluorescence Method Development Handbook. *Thermo Fisher Scientific, Germering, Germany*, 2013. [online]. [cit. 2017-04-23]. 1-2. Dostupné z: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/AN-70302-Fluorescence-Method-Development-Handbook-AN70302-E.pdf>
- [8] DORAZIO, Giovanni, Anna ROCCO a Salvatore FANALI. Fast-liquid chromatography using columns of different internal diameters packed with sub-2µm silica particles. In: *Journal of Chromatography A* [online] **2012**. 1228, 213-220 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.05.053. ISSN 00219673.

- [9] Fluorescence Detection Techniques. *Introduction to Fluorescence Sensing* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands **2009**. 65. [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1007/978-1-4020-9003-5_3. ISBN 978-1-4020-9002-8.
- [10] ČERNÁ, Ladislava, ŠKLUBALOVÁ, Zdeňka. *Laboratorní technika: Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola Hradec Králové* [online]. [cit. 2017-05-28]. Dostupné z: <http://lat.zshk.cz/vyuka/extrakce.aspx>
- [11] KLOUDA, Pavel. Chromatografie. In: *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 43-46. ISBN 80-86369-07-2.
- [12] Robert, DENTON BRAUN. Chemical analysis **2018**. *Britannica Academic* [online] **2018**. [cit. 2018-04-11]. Dostupné z: <https://academic.eb.com/levels/collegiate/article/chemical-analysis/110403#80784.toc>
- [13] Zhao, X. E., Li, Y. L., You, J. M., Liu, Y. J., & Suo, Y. R. Pre-column Derivatization-High Performance Liquid Chromatography for the Determination of Aliphatic Amines with Fluorescence Detection and Mass Spectrometry Identification. In: *Chinese Journal of Analytical Chemistry* [online] **2007**. 35(6), 779-785. [cit. 2017-05-21].
- [14] VALLERO, Daniel. Laboratory Analysis of Air Pollutant. In: *Fundamentals of Air Pollution (4th Edition)* [online]. Elsevier **2008**. 472-496. [cit. 2018-04-25]. ISBN: 978-0-08-055284-2.
- [15] ANDERSON, Jared L, BERTHOD, Alain, ESTÉVEZ, Verónica Pino, STALCUP, Apryll M. Sample Derivatization in Separation Science. In: *Analytical Separation Science* [online]. 5 Volume. John Wiley & Sons, **2015**. 1725-1752.
a. [cit. 2018-04-18]. ISBN: 978-1-5231-1058-2.
- [16] HADDAD, Paul R. POOLE, Colin F. *Liquid Chromatography-Applications Amino Acids*. [online]. **2013**. Elsevier. 574. [cit. 2018-04-18]. ISBN: 978-0-12-415866-5.
- [17] RAMMOUZ, Georges, Marlène LACROIX, Jean Christophe GARRIGUES, Véréna POINSOT a François COUDERC. The use of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde for the analysis of primary amines using high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. In: *Biomedical Chromatography* [online]. **2007**, 21(12), 1223-1239 [cit. 2018-04-25]. DOI: 10.1002/bmc.893. ISSN 02693879.

- [18] CREIGHTON, Thomas E. Polypeptide structure. In: *Biophysical Chemistry of Nucleic Acids and Proteins*. [online]. **2010**. Helvetian Press. 227-270 [cit. 2018-04-25]. ISBN: 978-1-61344-339-2.
- [19] Haddad, Paul R.; Poole, Colin F. Amino Acid and Bioamine Separations. In: *Liquid chromatography-applications* [online]. **2013**. Elsevier. 131-147. [cit. 2018-04-25]. ISBN: 978-0-12-415866-5.
- [20] GEORGIU, C. KOUPPARIS, Michael A, HADJIOANNOU, Themistocles P. Flow-injection stopped-flow kinetic spectrophotometric determination of drugs, based on micellar-catalysed reaction with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. In: *Talanta* [online]. **1991**. 38(7), 689-696 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/0039-9140(91)80187-5. ISSN 00399140.
- [21] EINARSSON, S., JOSEFSSON, B., LAGERKVIST, S. Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high performance liquid chromatography. In: *Journal of Chromatography* [online]. **1983**. 609-618 [cit. 2018-04-26]. ISSN: 0021-9673.
- [22] ZHANG, Y., CHEN Y. Fmoc-Cl fluorescent determination for amino groups of nanomaterial science. In: *IET Nanobiotechnology* [online]. **2012**, 6(2), 76-80 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1049/iet-nbt.2011.0027. ISSN 17518741.
- [23] MOYE, H. Anson, BONING, A. J. A Versatile Fluorogenic Labelling Reagent for Primary and Secondary Amines: 9-Fluorenylmethyl Chloroformate. In: *Analytical Letters* [online]. **1979**, 12(1), 25-35 [cit. 2018-06-22]. DOI: 10.1080/00032717908082516. ISSN 0003-2719
- [24] MIYOSHI, Y., OYAMA, T., KOGA, R., HAMASE, K. Amino Acid and Bioamine Separations. In: *Liquid Chromatography* [online]. **2013** Elsevier. 131-147 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/B978-0-12-415806-1.00006-1. ISBN 9780124158061.
- [25] HERBERT, P., SANTOS, L., ALVES, A. Simultaneous Quantification of Primary, Secondary Amino Acids, and Biogenic Amines in Musts and Wines Using OPA/3-MPA/FMOC-CI Fluorescent Derivatives. In: *Journal of Food Science* [online]. **2001**, 66(9), 1319-1325 [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb15208.x. ISSN 0022-1147.
- [26] 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. In: *Journal of Chromatography A* [online].

1996, 721(2), 231-239 [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.1016/0021-9673(95)00787-3. ISSN 00219673.

- [27] MUNIRAJ, Sarangapani, SHIH Hou-Kung, CHEN, Ying-Fang, HSIECH, Chunming, PONNUSAMY, Vinoth Kumar, JEN, Jen-Fon. Novel one-step headspace dynamic in-syringe liquid phase derivatization–extraction technique for the determination of aqueous aliphatic amines by liquid chromatography with fluorescence detection. In: *Journal of Chromatography A* [online]. **2013**, 1296, 104-110 [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.03.053. ISSN 00219673
- [28] AMPÍNS-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. In: *Analytica Chimica Acta* [online]. **1997**, 344 (1-2), 125-136 [cit. 2018-05-09].
- [29] EL-KOSASY, A. M., Omar ABDEL-AZIZ, 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. In: *Journal of Fluorescence* [online] **2015**, 25(3), 695-705 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1007/s10895-015-1555-8. ISSN 1053-0509.
- [30] IBRAHIM, F., EL-ENANY, F., EL-SHAHENY, R. N., MIKHAIL, I. E. Validated spectrofluorimetric and spectrophotometric methods for the determination of brimonidine tartrate in ophthalmic solutions via derivatization with NBD-Cl. Application to stability study. In: *Luminescence* [online]. **2015**, 30(3), 309-317 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1002/bio.2730. ISSN 15227235
- [31] ANNENKOV, Vadim V., VERKHOZINA, Olga N., SHISHLYANNIKOVA Tatyana A., DANILOVTSEVA Elena N. Application of 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole in analysis: Fluorescent dyes and unexpected reaction with tertiary amines. In: *Analytical Biochemistry* [online] **2015**, 486, 5-13 [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1016/j.ab.2015.06.025. ISSN 00032697.
- [32] ANNENKOV, Vadim V., VERKHOZINA, Olga N., SHISHLYANNIKOVA Tatyana A., DANILOVTSEVA Elena N. Application of 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole in analysis: Fluorescent dyes and unexpected reaction with tertiary amines. In: *Analytical Biochemistry* [online] **2015**, 486, 5-13 [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1016/j.ab.2015.06.025. ISSN 00032697.

- [33] EL-EMAM, Ali A, HANSEN, Steen Honoré, MOUSTAFA, Mohamed A., EL-ASHRY Saadia M., EL-SHERBINY, Dina T. Determination of lisinopril in dosage forms and spiked human plasma through derivatization with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) followed by spectrophotometry or HPLC with fluorimetric detection. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. **2004**, 34(1), 35-44 [cit. 2018-05-22]. DOI: 10.1016/j.japna.2003.08.021. ISSN 07317085
- [34] MONEEB, Marwa S. Spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for the determination of saxagliptin and vildagliptin in bulk and pharmaceutical preparations. In: *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University* [online] **2013**. 51(2), 139-150 [cit. 2018-05-22]. DOI: 10.1016/j.bfopcu.2013.03.003. ISSN 11100931.
- [35] YANG, Cailing, HUANG, Huayu, ZHANG, Haixia, LIU, Mancang. Analysis of Insulin by High Performance Liquid Chromatographic Method with Precolumn Derivatization with 4-Chloro-7-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole. In: *Analytical Letters* [online] **2006**, 39(12), 2463-2473 [cit. 2018-05-22]. DOI: 10.1080/01932690600824147. ISSN 0003-2719.
- [36] MELLBIN, G., SMITH, B. E .F. Trace determination of aliphatic amines using high-performance liquid chromatography with chemiluminescence excitation and photon counting. In: *Journal of Chromatography A* [online] **1984**, 312, 203-210 [cit. 2018-05-22]. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)92775-X. ISSN 00219673.
- [37] LEHTONEN, Pekka. Isolation and HPLC determination of amines in wine. In: *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* [online]. **1986**, 183(3), 177-181 [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1007/BF01027442. ISSN 0044-3026. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01027442>
- [38] HERNÁNDEZ-BORGES, Javier, D’ORAZIO, G., ATURKI, Z., FANALI, S. Nano-liquid chromatography analysis of dansylated biogenic amines in wines. In: *Journal of Chromatography A* [online]. **2007**, 1147(2), 192-199 [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.02.072. ISSN 00219673.
- [39] 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. In: *The Analyst* [online]. **1999**, 124(4), 477-482 [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1039/a808736i. ISSN 00032654.

- [40] EL-GHAFFAR, M. A., EL-WASSEEF, D. R., EL-SHERBINY, D. T., EL-ASHRY, S. M. Spectrofluorimetric determination of two β -agonist drugs in bulk and pharmaceutical dosage forms via derivatization with dansyl chloride. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. **2011**, 66(5), 476-481 [cit. 2018-04-27]. ISSN 10619348.
- [41] ABD EL-GHAFFAR, M. E., EL-WASSEEF, D. R. EL-SHERBINY, D. T. EL-ASHRY, S. M. Spectrofluorimetric determination of two β -agonist drugs in bulk and pharmaceutical dosage forms via derivatization with dansyl chloride. In> *Journal of Analytical Chemistry* [online]. **2011**, 66(5), 476-481 [cit. 2018-05-24]. DOI: 10.1134/S1061934811050029. ISSN 1061-9348.
- [42] BARTZATT, Ronald. Fluorescent labeling of drugs and simple organic compounds containing amine functional groups, utilizing dansyl chloride in Na₂CO₃ buffer. In: *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* [online]. **2001**, 45(3), 247-253 [cit. 2018-05-24]. DOI: 10.1016/S1056-8719(01)00157-5. ISSN 10568719.
- [43] HAYAKAWA, Kazuichi, HASEGAWA, Kimie, IMAIZUMI, Noriko, WONG, Osborne S., MIYAZAKI, Motoichi. Determination of amphetamine-related compounds by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence and fluorescence detections. In: *Journal of Chromatography A* [online]. **1991**, 464, 343-352 [cit. 2018-05-25]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)94252-3. ISSN 00219673.
- [44] MESEGUER LLORET, S., MOLINS LEGUA C., CAMPINS FALCO, P. Preconcentration and dansylation of aliphatic amines using C18 solid-phase packings. In: *Journal of Chromatography A* [online]. **2002**, 978(1-2), 59-69 [cit. 2018-05-24]. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)01431-0. ISSN 00219673.
- [45] DADÁKOVÁ, Eva, KŘÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). In: *Food Chemistry* [online]. **2009**, 116(1), 365-370 [cit. 2018-05-24]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.018. ISSN 03088146.
- [46] LOUKOU, Zacharenia, ZOTOU, Anastasia. Determination of biogenic amines as dansyl derivatives in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection and characterization of the dansylated amines by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. In: *Journal of Chromatography A* [online]. **2003**, 996(1-2), 103-113 [cit. 2018-05-24]. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00558-2. ISSN 00219673.

- [47] CHA, Woosuk, FOX, Peter, NALINAKUMARI, Brijesh. High-performance liquid chromatography with fluorescence detection for aqueous analysis of nanogram-level N-nitrosodimethylamine. In: *Analytica Chimica Acta* [online]. **2006**, 566(1), 109-116 [cit. 2018-05-25]. DOI: 10.1016/j.aca.2006.02.059. ISSN 00032670.

