

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza amínov
Kristína Matúšová

Bakalárska práca

2017

Vyhlasujem:

Túto prácu som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, najmä so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 ods. 1 autorského zákona, a s tým, že pokiaľ dôjde k užitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia o užití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená od mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorenie diela vynaložila, a to až podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Zb. O vysokých školách a o zmene a doplnení niektorých zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov, a smernicou Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práca zverejnená v Univerzitnej knižnici a prostredníctvom Digitálnej knižnice Univerzity Pardubice

Súhlasím s prezenčným sprístupnením svojej práce v Univerzitnej knižnici.

V Pardubiciach dňa

Pod'akovanie

Rada by som poďakovala vedúcemu mojej bakalárskej práce Ing. Alešovi Eisnerovi Ph.D. za poskytnutie odborných a cenných rád. Taktiež by som rada poďakovala doc. Ing. Petre Bajerovej, Ph.D. za čas, ktorý mi venovala v priebehu spracovania bakalárskej práce.

ANOTÁCIA

Táto práca je zameraná na stanovenie amínov v rôznych matriciach, konkrétne na aromatické amíny. Cieľom mojej práce je sa zamerať u aromatických amínov na ich derivatizáciu pre stanovenie metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s fluorescenčnou detekciou.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

amíny, derivatizácia, vysokoúčinná kapalinová chromatografia, fluorescenčná detekcia

TITLE

Analysis amines

ANNOTATION

This paper is focused on determination of amines in different states, specifically on aromatic amines. The purpose of this paper is to be focused on aromatic amines and their derivatization used for determination by a highly effective liquid chromatography with fluorescent detection method.

KEYWORDS

amines, derivatization, high performance liquid chromatography, fluorescence detection

Obsah

ZOZNAM OBRÁZKOV	8
ZOZNAM TABULIEK	9
Zoznam skratiek.....	10
Úvod.....	11
1. Charakteristika chromatografie.....	12
1.1. Základné poznatky o chromatografii	12
1.2. Rozdelenie chromatografických metód.....	12
1.3. Separáčny mechanizmy	13
2. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia	14
2.1. História kvapalinovej chromatografie.....	16
2.2. Hlavné súčasti kvapalinového chromatografu	17
2.2.1. Vysokotlaková pumpa – čerpadlá.....	17
2.2.2. Dávkovacie zariadenie	19
2.2.3. Chromatografická kolóna	19
3.3. Druhy stanovenia	21
3.3.1. Kvalitatívne stanovenie.....	21
3.3.2. Kvantitatívne stanovenie.....	21
4. Amíny	23
4.1. Usporiadanie amínov	23
4.2. Výskyt amínov	24
4.3. Prírodné zlúčeniny dusíka	24
4.4. Fyzikálne vlastnosti.....	25
4.5. Chemické vlastnosti	26
4.6. Rozpustnosť vo vode.....	26
4.7. Aromatické amíny	27

4.7.1. Monocyklické amíny	28
4.7.2 Polycyklické aromatické uhľovodíky	31
4.7.3. Heterocyklické amíny	31
5. Derivatizácia	32
5.1. Derivatizácia v HPLC	32
5.1.1. Spôsoby derivatizácie	32
5.1.2. Dôvody použitia derivatizácie v HPLC	33
5.1.3 Aplikácia derivatizácie	33
5.2. Fluorescenčný HPLC detektor	33
5.3. Deriváty pre fluorometrickú detekciu	34
5.3. Výber derivatizačného činidla.....	35
5.4. Činidlá pre detekciu fluorescencie a chemiluminiscencie	35
5.5. Činidlá pre amíny	36
5.5.1. Sulfonylchloridy	37
5.5.2. Karbonylchloridy	38
6. Záver	40

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1 –Moderná HPLC (http://www.se-source.com)	14
Obrázok 2 – Vyhodnotenie separácie bielkovín (https://web.natur.cuni.cz/).....	15
Obrázok 3 – Schéma HPLC (http://labmet.zshk.cz).....	16
Obrázok 4 - Šesticestný ventil (http://slideplayer.cz/slide/3160943/)	19
Obrázok 5 - Chromatografická kolóna (http://www.hplc.cz)	20
Obrázok 6 - Štruktúra primárnych,sekundárnych,terciálnych a heterocyklických zlúčenín (https://www2.chemistry.msu.edu)	23
Obrázok 7 - Prírodné zlúčeniny dusíku (https://www2.chemistry.msu.edu)	25
Obrázok 8 - Vodíková väzba (http://www.chemguide.co.uk)	27
Obrázok 9 - Fluorescenčný HPLC detektor (http://www.hplc.cz)	34

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1 – Detektory HPLC (prevzaté a upravené z knihy Analytická chemie).....	18
Tabuľka 2 - Body varu amínov (http://www.chemguide.co.uk)	26
Tabuľka 3 - Reprezentatívne aromatické uhl'ovodíky (prevzaté a upravené podľa Vogt and Gerulis, 2005)	28

Zoznam skratiek

ACN - acetonitril

AK – aminokyselina

Dis-Cl – disylchlorid

Fmoc-Cl – 9 – fluorenyl-methyloxycarbonyl chlorid

HA – heterocyklický amín

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografia

IgM – imunoglobulín M

Mh – molekulová hmotnosť

NCF-Cl – 2-naftyloxycarbonylchlorid

NMA - N-methylanilín

PAU - polycyklické aromatické uhlovodíky

TCC – termostat s kolonou

t_R - retenčný čas

Úvod

Cieľom tejto bakalárskej práce je stanovenie amínov v rôznych matriciach. Práca sa podrobnejšie zaoberá aromatickými amínmi. U aromatických amínov sa zameriava na ich derivatizáciu pre stanovenie metódou HPLC s fluorescenčnou detekciou.

Účelom tejto detekcie je zaviesť do molekuly takú skupinu, ktorá vykazuje fluorescenčné vlastnosti a umožní nám tak detekciu týchto látok.

1. Charakteristika chromatografie

1.1. Základné poznatky o chromatografii

Chromatografia je súhrnný termín pre sadu laboratórnych techník na separáciu zmesí. Je separačnou (deliacou) a súčasne aj analytickou metódou (to znamená, že nám poskytuje kvalitatívne a kvantitatívne informácie o vzorku). Využíva distribúciu látok medzi dve fázy: mobilnú (pohyblivú) a stacionárnu (nepohyblivú). Táto zmes sa rozpustí v tekutine zvanej mobilná fáza, nesie ju skrz štruktúru, ktorá drží iný materiál s názvom stacionárna fáza. Rôzne zložky zmesi cestujú pri rôznych rýchlostiach, čo spôsobuje ich oddelenie. Separácia je založená na diferenciálnom rozdelení medzi mobilnou a stacionárnou fázou. Jemné rozdiely v dôsledku rozdeľovacieho koeficientu sú výsledkom diferenciálneho zadržania na stacionárnej fáze a tým sa mení rozdelenie zlúčeniny (McMurry, 2011).

Chromatografia môže byť preparatívna alebo analytická. Cieľom preparatívnej chromatografie je oddeliť komponenty zmesi pre pokročilejšie použitie (forma čistenia). Analytická chromatografia sa vykonáva obvykle s menším množstvom materiálu a je určená pre meranie relatívnych pomerov stanovovaných látok v zmesi (Hostettman et. al., 1998).

1.2. Rozdelenie chromatografických metód

Najčastejšie delíme metódy podľa nasledujúcich piatich hľadísk.

- Povaha mobilnej fázy: plynová , kvapalinová
 - Spôsob prevedenia: kolónová (stĺpcová), plošná (plošná)
 - Princíp separácie: adsorpčná, rozdeľovacia, iónovo výmenná, gélová, afinitná, chirálna
 - Pracovný postup: elučná (analytická), frontálna, vytesňovacia
 - Účel: analytická, preparatívna
- (Cazes, 2005)

1.3. Separáčné mechanizmy

- príčiny zadržiavania a delenia separovaných látok

Gelová permeačná chromatografia

- využíva mechanického delenie molekúl analytov v póroch gélu na základe ich rozdielnej veľkosti.

Rozdeľovacia chromatografia

- využíva rozdielne rozpustnosti (a teda aj rozdielne distribúcia) molekúl analytov medzi dvoma úplne nemiešateľným kvapalinami.

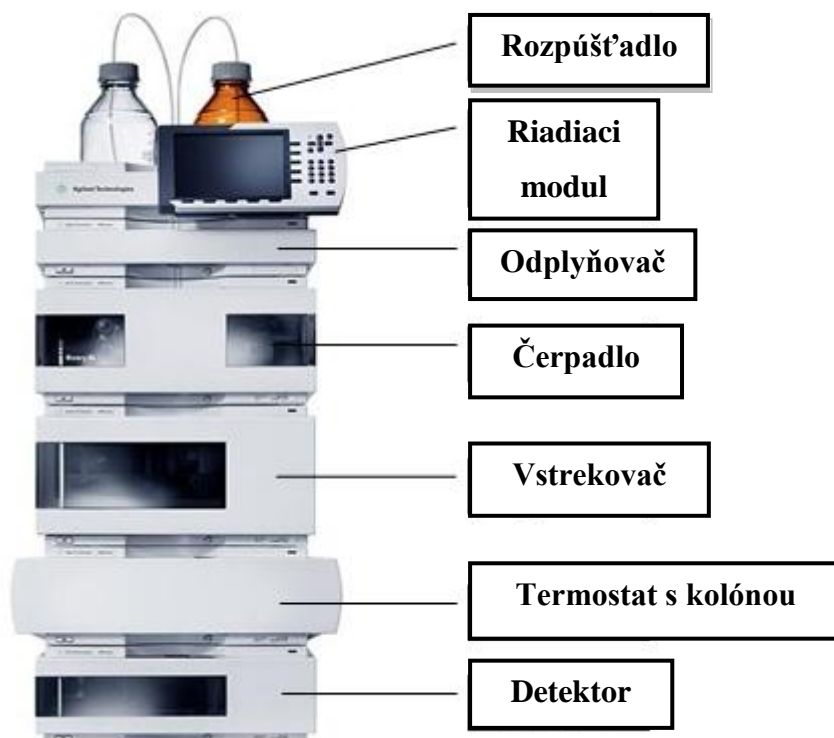
Adsorpčná chromatografia

- využíva rozdielne adsorpcie molekúl analytov na povrchu tuhej fázy s aktívnymi centrami.

Iónovo výmenná chromatografia

- využíva rozdielne výmenné adsorpcie analytov (iónov) na povrchu iónového meniča (Vondrák and Vulterin, 1985).

2. Vysokoučinná kvapalinová chromatografia



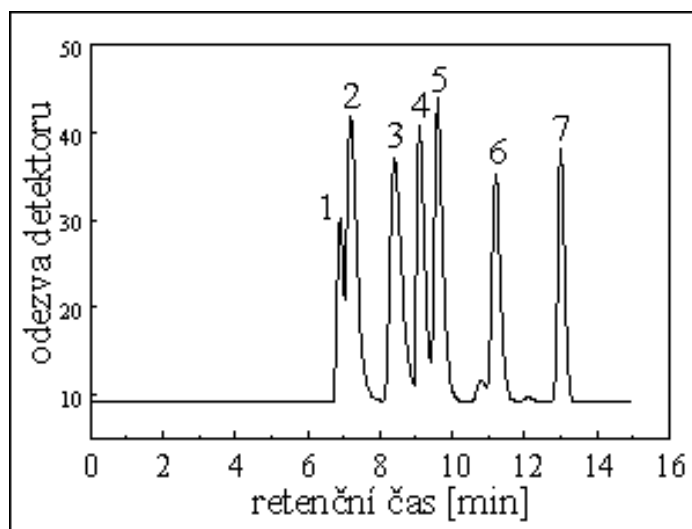
Obrázok 1 – Moderná HPLC (<http://www.se-source.com>)

Chromatografia môže byť opísaná ako veľkokapacitný proces prenosu zahŕňajúci adsorpciu. Je založená na kontinuálnom opakovanom ustanovovaní rovnovážneho delenia zložiek vzorku medzi dvoma navzájom nemiešateľnými fázami stacionárnou a mobilnou fázou. HPLC, ktorú môžeme vidieť na obrázku č.1, pracuje pod vysokými tlakmi kvapalín privádzajúce do kolóny pomocou čerpadiel. Látky sú separované na kolóne na základe rôznej afinity kvapalín alebo zmesi kvapalín k stacionárnej fáze. Separované zložky vzorku sú vnášané na začiatok kolóny do prúdu mobilnej fáze a opúšťajú ju v poradí v akom sú v kolóne zadržované. Najmenej zadržované zložky opúšťajú kolónu ako prvé, najviac zadržované ako posledné. Mierou zadržania (retencie) zložky v chromatografickej kolóne je jej retenčný čas t_R . Aktívna zložka z kolóny, adsorbent, je spravidla granulovaný materiál vyrobený z pevných častíc (napr. oxid kremičitý, polyméry, silikagel atď.)(Gerber et. al., 2004).

K deleniu zmesi na jednotlivé zložky dochádza na chromatografickej kolóne. Zložky vzorku zmesi sú od seba oddelené v dôsledku ich rôznych stupňov interakcie s časticami adsorbenta (stacionárna fáza). Stacionárna fáza je definovaná ako nepohyblivý materiál naplnený do

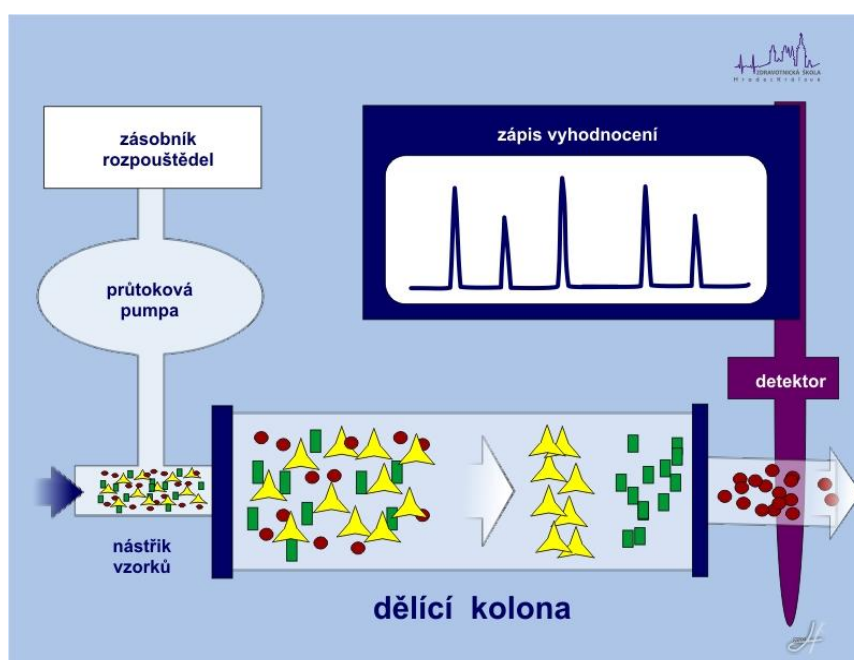
chromatografickej kolóny. Interakcia analytu s mobilnou a stacionárnou fázou môže byť ovplyvnená zložením jednak mobilnej fázy, ale aj použitím rôznych typov stacionárnych fáz v kolónach. Kvapalina je typická zmes rozpúšťadiel (napr. voda, acetonitril / alebo metanol) a je označovaná ako "mobilná fáza". Jej zloženie a teplota zohrávajú významnú úlohu v procese separácie ovplyvnením interakcie, ku ktorým dochádza medzi vzorkami komponenty a adsorbentom. Tieto interakcie sú fyzikálneho charakteru ako je napríklad hydrofóbna (disperzná), dipól-dipól a iónová, najčastejšie kombinácie (Kazachevich and McNair, 2007).

Ak je stacionárna fáza polárnejšia ako mobilná fáza, hovoríme o systémoch s normálnymi fázami napríklad heptan, pentan chloform a ich zmesi. V opačnom prípade ide o systém s reverznou fázou (methanol, acetonitril, voda a ich zmesi). Po prechode separačnou kolónou sú analyzované látky v mobilnej fáze detekované v prietokovej celi detektora. Meranou veličinou je fluorescencia, absorbancia, index lomu, elektrická vodivosť. Výstupom z detektora je grafický záznam závislosti odozvy detektora na retenčnom čase, čo sa nazýva chromatogram, na ktorom sa hodnotí plocha alebo výška píku a túto závislosť môžeme vidieť na obrázku číslo 2. Kvantitatívna analýza sa vykonáva na princípe odpočítania výsledku z kalibračnej krivky (Holzbecher, 1987).



Obrázok 2 – Chromatogram bielkovín, kolóna o rozmeroch 25 cm x 9,4 mm so stacionárnou fázou Zorbax GF – 250, detekcia UV fotometrická pri 210 nm, píky: 1) myšací IgM 2) hovädzí tyreoglobulin 3) β -amyláza zo zemiakov 4) hovädzie sérum albumín 5) kurací albumín 6) hovädzia RNAasa 7) azid (<https://web.natur.cuni.cz>)

HPLC sa odlišuje od tradičných ("nízkym tlakom"), kvapalinových chromatografií pretože prevádzkové tlaky sú výrazne vyššie (50 až 350 Pa), zatiaľ čo bežná kvapalinová chromatografia zvyčajne závisí na gravitačnej sile, ktorá sa odovzdá cez mobilnú fázu skrz kolónu. Vzhľadom k malému množstvu vzorku oddelené analytickou HPLC, typické rozmery kolóny sú o priemere 2,1 - 4,6 milimetrov a dĺžka 30-250 mm. Tiež HPLC kolóny sú vyrábané s menšími časticami sorbentu (2-50 mikrometrov v priemere veľkosti častíc). To dáva HPLC vyššiu rozlišovaciu schopnosť (schopnosť rozlišovať medzi zlúčeninami) pri oddeľovaní zmesi a to robí chromatografickú techniku populárnou. Na obrázku číslo 3 môžeme vidieť schému prístroja HPLC (Karger, 1997).



Obrázok 3 – Schéma HPLC (<http://labmet.zshk.cz>)

2.1. História kvapalinovej chromatografie

Objaviteľom chromatografie sa stal v roku 1903 botanik M.S. Cvet. Priekopnícka práca spočívala v delení chloroplastových pigmentov z rastlinných extraktov na sklenenej kolóne naplnenej CaCO_3 s použitím organických rozpúšťadiel. Znovuobjavenie nastalo v roku 1931 Kuhn a Lederer. Z histórie kvapalinovej chromatografie:

- 1940-1949 Martin a Synge ukázali, že separačná rýchlosť je limitovaná rýchlosťou difúzie rozpustenej látky z kvapalnej fázy. Separácia malých molekúl, najmä aminokyselín (AK vo vlne)
- 1950-1959 Sober, Peterson a Gutter zaviedli používanie médií na báze celulózy (iónomeniče), Porath a Flodin prvýkrát použili médium na báze dextransu pre gélovú filtráciu
- 1960-1969 Hjerten opísal použitie separačných médií na báze agarózy
- 1970-1979 Vyvinutá technika vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie tj. HPLC: Halasz, Horvath, Kirkland et al., Regnier et al
- 1980-1989 Nové médiá s vyššou mechanickou odolnosťou (CL- agaróza, "cross-linked") umožňujú použitie vyšších tlakov pre separáciu; pod obchodným názvom "Fast Protein Liquid Chromatography" uvedený na trh systém bio-HPLC pre separáciu biopolymérov
- 1990 Zdokonaľovanie techniky perfúzy chromatografie. Princíp patentovaný roku 1989 (Afeyan, Regnier, Dean). Separáciou s vysokým rozlíšením je možné dosiahnuť v priebehu jednej minúty (Dolan et al., 2013).

2.2. Hlavné súčasti kvapalinového chromatografu

- Vysokotlaková pumpa
- Dávkovacie zariadenie
- Deliaci kolóna
- Detektor (jednotlivý popis detektorov nájdeme v tabuľke číslo 1)
- Vyhodnocovacie zariadenie (zapisovač, počítač, tlačiareň)

2.2.1. Vysokotlaková pumpa – čerpadlá

Vysokotlakové čerpadlo s rozsahom voliteľného a plne reprodukovateľného čerpaného prietoku od 0,001 do 20,0 ml / min pri tlaku od 0 do 40 MPa je vhodné pre použitie ako v analytickej tak aj v preparatívnej HPLC. Je tiež použiteľné všade tam, kde je potrebné presne čerpať kvapaliny do nízkych i vysokých tlakov, pričom čerpanej kvapaliny môžu byť aj silne agresívne (Holzbecher et al., 1987).

Tabuľka 1 – Detektory HPLC (prevzaté a upravené Holzbecher et al., 1987)

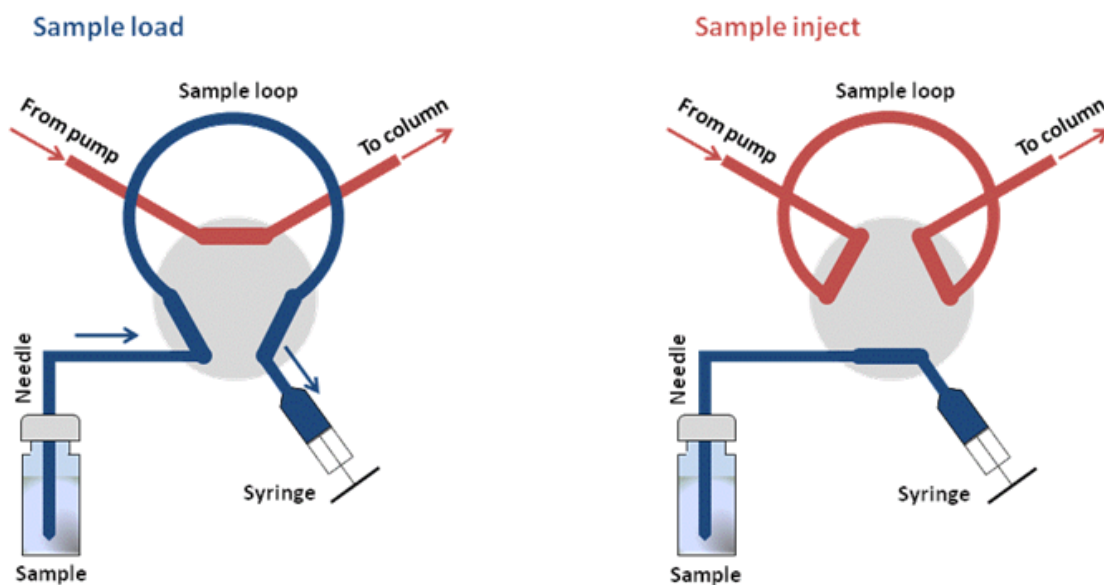
Názov	Selektivita	Minimálna detekovateľná hladina (g / ml)	Lineárny dynamický rozsah
UV – VIS detektor	Pre väčšie organické molekuly a zlúčeniny prechodného kovu, ktoré absorbujú UV - VIS svetlo. V časovom rozlíšení UV-VIS spektier je možné rozseparovať nerozdelené píky.	$5 \cdot 10^{-10}$	$5 \cdot 10^4$
Fluorescenčný detektor	Detekuje fluorescenčné žiarenie emitovaných vzorových zlúčenín. Špecifická pri vysoko kondenzovaných organických molekúl.	$10^{-10} \dots 10^{-9}$	$\sim 10^3$
Refraktometrický detektor	Meria rozdiely medzi indexom lomu eluátu a čistej mobilnej fáze, nie je príliš citlivý ale veľmi univerzálny.	$4 \cdot 10^{-7}$	10^4
Detektor elektrickej vodivosti	Špecifický detektor s nízkymi nákladmi na zlúčeniny disociujúce na ióny (napríklad anorganické a organické soli, tenzidy, aminokyseliny)	10^{-8}	10^3
Hmotnostne selektívny detektor	Najviac selektívny detektor pre HPLC. Silné požiadavky na rozhranie (prechod z vysokého tlaku stĺpca na podtlak vnútri MSD).	-	10^5

2.2.2. Dávkovacie zariadenie

Nástrikovým zariadením môže byť šesťcestný dávkovací ventil so smyčkou alebo voliteľným objemom a jeho podobu môžeme vidieť na obrázku číslo 4. Objem, ktorý nasťikujeme sa riadi rozmermy kolóny. U analytických aplikácií sa toto rozmedzie pohybuje od 5 – 100 μl . Na semipreparatívne a preparatívne účely 200 μl – 10 ml. Nasávanie vzorku za atmosférického tlaku prebieha tak, že vzorka je vstreknutá zo striekačky do smyčky. Mobilná fáza sa pohybuje od pumpy do kolony. Nástriek vzorku za vysokého tlaku konáme tak, že ventil sa prepne z "load" do "inject" pozície. Mobilná fáza prechádza smyčkou a vnáša vzorku do kolóny (Garaj et al., 1987).

HPLC systém

Injektor – šesticestný ventil



Obrázok 4 – Šesťcestný ventil (<http://slideplayer.cz/slide/3160943/>)

2.2.3. Chromatografická kolóna

Chromatografická kolóna je zariadenie používané v chromatografii na separáciu chemických zlúčenín. Chromatografická kolóna obsahuje stacionárnu fázu, čo umožňuje mobilnej fázy

prejsť skrz. Chromatografické kolóny rôznych typov sa používajú ako v plynovej tak v kvapalinovej chromatografii.

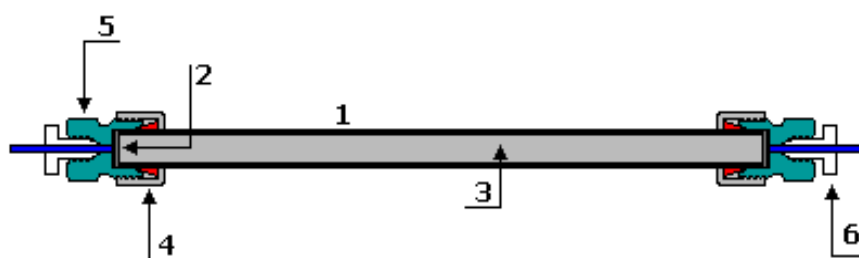
Úlohou plášťa kolóny je udržať pohromade stacionárnu fázu, pričom na kolónu sú kladené určité požiadavky, ktoré treba dodržiavať:

- musí byť chemicky inertný
- musí odolávať pomerne vysokým tlakom
- vnútorný povrch plášťa kolóny musí byť dostatočne hladký

(Holzbecher et al.,1987)

Tradičné kolóny chromatografie boli vyrobené zo skla. Moderné kolóny sú väčšinou vyrobené z borosilikátového skla, akrylového skla alebo nerezovej ocele. Aby sa zabránilo úniku stacionárnej fázy z kolóny je interiér zhotovený z polyméru, z nerezovej ocele alebo keramickej siete obvykle aplikovaný. V závislosti na aplikácii materiálovo a veľkostné požiadavky sa môžu meniť (Neue U.D., 1997).

Vlastná kolóna HPLC sa skladá z kovového plášťa (1), ktorý je uzavretý poréznou kovovou fritou (2), ktorá zabraňuje uvoľňovaniu stacionárnej fázy (3) z kolóny a súčasne umožňuje plynulý prietok mobilnej fázy. Oba konce kolóny sú ukončené ochranným krúžkom (4) a koncovou hlavicou (5), v ktorej je navítaný vstup pre kapiláru so skrutkou (6). Zloženie kolóny môžeme vidieť na obrázku číslo 5 (Guillaume and Guinchard, 1995).



Obrázok 5 – Chromatografická kolóna (<http://www.hplc.cz/>)

3.3. Druhy stanovenia

3.3.1. Kvalitatívne stanovenie

Na identifikáciu látok v HPLC sa používa retenčného času alebo retenčných objemov. Na účely identifikácie sa stupnica retencie kalibruje pomocou tzv. retenčných indexov (metóda štandardov). Tento spôsob kalibrácie bol navrhnutý pre plynovú chromatografiu pre kalibračné štandardy n-alkánov, v kvapalinovej chromatografii sa tieto štandardy nepoužívajú (Cazes, 2005).

3.3.2. Kvantitatívne stanovenie

Úlohou kvantitatívneho stanovenie je nájdenie vzťahu medzi plochou alebo výškou píku a množstvom eluovanej látky. Oblasti vrcholov možno najpresnejšie vyhodnotiť pomocou digitálnych integrátorov alebo riadiacou datastanicou, použitie planimetrie a triangulácia je už históriou. Najväčšia chyba vyhodnotenia chromatografického píku spočíva v presnom určení základnej línie na chromatograme (Churáček et al., 1990).

Medzi kvantitatívne stanovenia patria metódy:

- Metóda vonkajšieho štandardu (napoužívaným spôsobom je metóda kalibračnej krivky – analyzujeme sériu štandardov o známej ale aj rôznej koncentrácii a hľadá sa závislosť kalibračnej funkcie)
- Metóda štandardného prídavku (k vzorke pridáme presné množstvo tej istej látky, u ktorej sa má stanoviť neznáma koncentrácia. Vždy sa musia urobiť najmenej dva nástreky vzorky - pri prvom sa dávkuje presné množstvo vzorky, pri druhom sa dávkuje presné množstvo zmesi)
- Metóda jedného štandardného prídavku (dve analýzy: prvou analýzou známeho objemu vzorky o neznámej koncentrácii látky, kde dostaneme plochu píku. Druhá analýza, že k vzorke pridáme známy objem štandardu a známu koncentráciu a dostaneme druhú plochu píku (Worsfold et al., 2005).
- Metóda viacerých štandardných prídavkov (meriame plochu vrcholu pred a po prídavku dvoch a viacerých štandardných prídavkov k analyzovanej vzorke a to nám umožňuje stanoviť koncentráciu stanovovanej zložky. Použijeme extrapoláciu

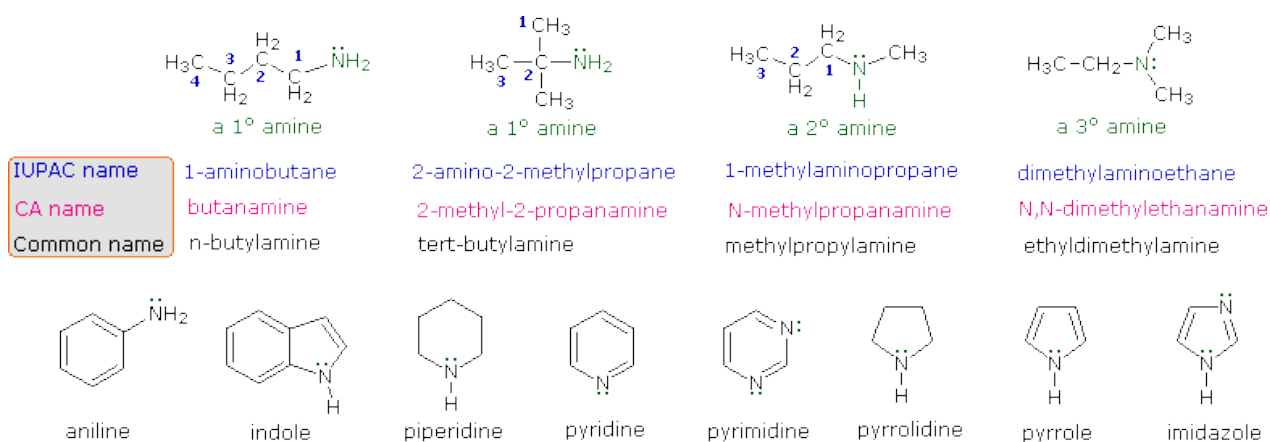
regresnej priamky v závislosti meranej plochy a zmien koncentrácie, musí však spĺňať podmienku linearity)

- Metóda vnútorného štandardu (prednosť tejto techniky je v tom, že sa celá analýza uskutoční v jedinom nástreku a dávkovaný objem vzorky nie je potrebné presne odmeriavať. Princíp metódy je daný tým, že sa nariedi vzorka vzorkou štandardu pričom pôvodná koncentrácia štandardu musí byť známa. Uvedená technika má dve varianty a to metóda priameho porovnania a metóda kalibračnej krivky (Nováková and Douša, 2013).

4. Amíny

V organickej chémii, amíny sú zlúčeniny a funkčné skupiny, ktoré obsahujú bázičný atóm dusíka s osamoteným párom. Amíny sú formálne deriváty amoniaku, v ktorých jeden alebo viac atómov vodíka boli nahradené alkylovou alebo arylovou skupinou. Na obrázku číslo 6, môžeme vidieť štruktúru primárnych, sekundárnych, terciárnych a heterocyklických zlúčenín.

Alifatický amín nemá aromatický kruh pripojený priamo k atómu dusíka. Aromatické amíny majú atóm dusíka pripojený k aromatickému kruhu, ako u rôznych anilínov. Aromatický kruh znižuje alkalitu amínu, v závislosti na jeho substituentoch. Prítomnosť aminoskupiny silno zvyšuje reaktivitu aromatického kruhu, vzhľadom k účinku darovaného elektrónu (McMurry, 1992).



Obrázok 6 – Štruktúra primárnych, sekundárnych, terciárnych a heterocyklických zlúčenín (<https://www2.chemistry.msu.edu>)

4.1. Usporiadanie amínov

Primárne amíny - primárne amíny vznikajú, keď jeden z troch atómov vodíka vo čpavku je nahradený alkylovou skupinou (R-NH₂) alebo aromatickou. Dôležité primárne alkylamíny zahŕňajú metylamín, etanolamín (2-etanolamín), zatiaľ čo primárne aromatické amíny zahŕňajú anilín.

Sekundárne amíny - dva organické substituenti, (alkyl, aryl, alebo oboje) viazané na dusík spoločne s jedným vodíkom (alebo žiadny vodík v prípade, že jedna z väzieb substituentov je

dvojitá). Medzi významných zástupcov patrí dimetylamín a methylethanolamin, zatiaľ čo príklad aromatického amínu je difenylamín.

Terciárne amíny - U terciálnych amínov, všetky tri atómy vodíka sú nahradené organickými substituentami. Príklady môže byť trimetylamín, ktorý má výrazne rybí zápach alebo trifenylamín.

Cyklické amíny - cyklické amíny sú buď sekundárne alebo terciárne amíny. Príklady cyklických amínov zahŕňajú 3-členný kruh aziridíny a šesťčlenný kruh piperidín. N-methylpiperidín a N-fenylpiperidín sú príklady cyklických terciárnych amínov.

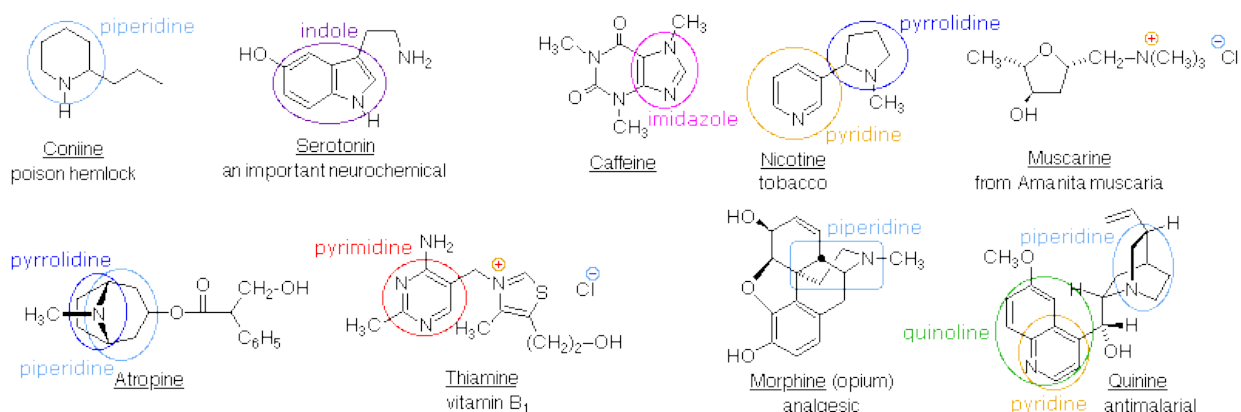
Je tiež možné, aby boli štyri organické substituenty na dusíku. Tieto druhy nie sú amíny, ale sú kvartérne amóniové kationy a majú nabitú centrum dusíku. Kvartérne amóniové soli existujú s mnohými druhmi aniónov (<http://www.chemguide.co.uk>).

4.2. Výskyt amínov

Amíny sú hojne sa vyskytujúce prírodné látky. Môžu byť produkty (močovina), medziprodukty metabolických dejov (ornitín), stavebné prvky organických zlúčenín (aminokyseliny) alebo vznikajú rozkladom látok, príkladom je hnitie bielkovín (trimetylamín). U rastlín z aminokyselín vznikajú alkaloidy ako odpadné produkty. Medzi deriváty amínov patri aj nukleové kyseliny a niektoré vitamíny (Townshend, 1995).

4.3. Prírodné zlúčeniny dusíka

Prírodné zdroje zlúčenín dusíka, z ktorých mnohé sa vyskytujú v rastlinách nazývame alkaloidy. Serotonín a tiamín sú primárne amíny, coniine sekundárny amín, atropín, morfín a chinín sú terciárne amíny a muskarín tetra amóniová soľ. Na obrázku číslo 7 môžeme vidieť štruktúru prírodných zlúčenín dusíka (Townshend, 1995).



Obrázok 7 - Prírodné zlúčeniny dusika (<https://www2.chemistry.msu.edu>)

4.4. Fyzikálne vlastnosti

Prepojenie vodíka významne ovplyvňuje vlastnosti primárnych a sekundárnych amínov. Bod topenia a bod varu amínov je vyšší ako u zodpovedajúcich fosfinov. Je však všeobecne nižší ako u zodpovedajúcich alkoholov a karboxylových kyselín. Body varu niektorých amínov môžeme vidieť v tabuľke číslo 2. Napríklad metylamín a etylamín sú plyny za štandardných podmienok, zatiaľ čo zodpovedajúce alkoholy, metyl a etyl sú kvapaliny. Poradie varu amínov je nasledovné: primárne > sekundárne > terciárne. Plynné amíny majú vlastnú charakteristickú čpavkovú vôňu, kvapalné amíny majú výrazný "rybí" zápach. (Lide, 2005).

Nižšie alifatické amíny sú plynnej povahy s rybím zápachom. Primárne amíny s tromi alebo štyrmi atómami uhlíka, sú kvapaliny pri teplote miestnosti, zatiaľ čo amíny s vyšším počtom uhlík sú pevné látky. Anilín a ďalšie arylamíny sú zvyčajne bezfarebné, ale zafarbenými sa stávajú, ak sú uložené otvorene vzhľadom k atmosférickej oxidácii. Nižšie alifatické amíny môžu tvoriť vodíkové väzby s molekulami vody a preto sú rozpustné vo vode. Zvýšenie veľkosti hydrofóbne alkylovej časti sa zvyšuje molárna hmotnosť amínov, čo má za následok zníženie jeho rozpustnosti vo vode. Vyššie amíny sú nerozpustné vo vode. Organické rozpúšťadlá ako je alkohol, benzén a éter ľahko rozpúšťajú amíny. Alkoholy majú vyššiu polaritu v porovnaní s amínami a preto tvoria pevnejšie intermolekulárne vodíkové väzby (Wójcik et al., 2009).

Tabuľka 2 – Body varu amínov (<http://www.chemguide.co.uk>)

Typ	vzorec	bod varu (°C)
Primárne	CH ₃ NH ₂	-6,3
Primárne	CH ₃ CH ₂ NH ₂	16,6
Primárne	CH ₃ CH ₂ CH ₂ NH ₂	48,6
sekundárne	(CH ₃) ₂ NH	7,4
Terciárne	(CH ₃) ₃ N	3,5

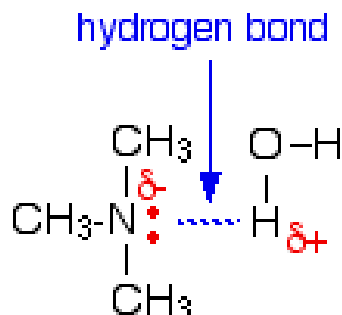
4.5. Chemické vlastnosti

Prítomnosť neväzbného elektrónového páru na atóme dusíka určuje zásaditý charakter amínu. Na zásaditosť má vplyv charakter uhl'ovodíkových zvyškov. Všeobecne platí, ak sú na dusíku viazané alkyly, je ich zásaditosť vyššia než u amoniaku, a ak sú na dusíku viazané aryly, je ich zásaditosť nižšia než u amoniaku. Teda metylamín je zásaditejší než anilín (Lawrence, 2004).

4.6. Rozpustnosť vo vode

Malé amíny všetkých typov sú veľmi dobre rozpustné vo vode. Amíny sú rozpustné v organických rozpúšťadlách, ako je éter, benzén, alkohol a iných. V skutočnosti tie, ktoré by normálne boli nájdené ako plyny pri izbovej teplote sú obvykle predávané ako roztoky vo vode - v podstate rovnakým spôsobom ako amoniak, ten je obvykle dodávaný ako roztok

čpavku. Všetky amíny môžu tvoriť vodíkové väzby s vodou - aj tie terciárne. Vznik vodíkovej väzby môžeme vidieť na obrázku číslo 8. Aj keď terciárne amíny nemajú atóm vodíka naviazaný na atóm dusíka a tak nemôžu tvoriť vodíkové väzby so sebou, môžu tvoriť vodíkové väzby s molekulami vody len pomocou samostatného páru na dusíku (Lawrence, 2004).



Obrázok 8 – Vodíková väzba (<http://www.chemguide.co.uk>)

Rozpustnosť klesá s nárastom počtu atómov uhlíka. Alifatické amíny sú dobre rozpustné v organických rozpúšťadlách, predovšetkým v polárnych organických rozpúšťadlách. Primárne amíny reagujú s ketónmi ako je napríklad acetón. Aromatické amíny, ako anilín, majú svoj osamotený pár elektrónov konjugovaný na benzénovo jadre a tak ich tendencia zapojiť sa do vodíkovej väzby sa znižuje. Ich body varu sú vysoké a ich rozpustnosť vo vode je nízka (Lide, 2005).

4.7. Aromatické amíny

Aromatický amín je organická zlúčenina pozostávajúca z aromatického kruhu pripojeného na amín. Je to široká trieda zlúčenín, ktorá zahŕňa anilín ale aj mnoho zlúčenín so zložitejšími aromatickými kruhmi a mnoho amínov so substituentami mimo NH_2 . Všeobecne vyskytujúce sa zlúčeniny môžeme vidieť v tabuľke číslo 3 (Vogt and Gerulis, 2005).

Aromatické amíny sú trieda chemických látok nájdených v plastovom a chemickom priemysle ako vedľajšie produkty pri výrobe zlúčenín, ako sú polyuretánové peny, farbív, pesticídov, liečiv a polovodičov. Tiež ich môžeme nájsť v znečisťovaní životného prostredia, ako sú výfukové plyny vznetrového motora, spaľovanie drevnej štiepky a gummy, tabakového dymu (DeBruin, 1999, 2002). Existujú tri typy aromatických amínov: monocyklické, polycyklické a heterocyklické.

Tabuľka 3 – Reprezentatívne aromatické uhľovodíky (prevzaté a upravené podľa Vogt and Gerulis, 2005)

Aromatický kruh	Názov pôvodného amínu	Príklad
benzén	anilín	substituované anilíny
benzén	fenylendiamin	antioxidačný p-fenylendiamin
toluén	o-toluidín	farmaceutický prilokain
toluén	diaminotoluen	vlasy- farbiaca prísada 2,5-diaminotoluen
naftalén	1-Aminonaftalen	Victoria modrej farby
pyridín	2-Aminopyridín	droga tenoxicam
pyrimidín	2-Aminopyrimidín	nukleobáza cytozín
chinolín	8-Aminochinolín	droga primachinu
purín	2-Aminopurín	nukleobáza guanín a vitamín kyselina listová
akridín	9-Aminoakridín	fluorescenčné farbivá

4.7.1. Monocyklické amíny

Monocyklické aromatické amíny alebo deriváty anilínu, sú medziprodukty pri výrobe gummy, plastu, polyuretánovej peny, farbív, pesticídov a liečiv. Ľahko sa vstrebávajú do tkaniva v podobe lipofilných látok a tak poškodzujú membránu bunky. Vdychovanie väčšieho množstva toluénu pôsobí hepatotoxicky-neurotoxicky. Z hľadiska potenciálu karcinogénneho je z nich najzávažnejší benzén. V tejto časti sú opísané monocyklické aromatické amíny, vrátane anilínu, aminofenolov, antranilátu, metylanilínu a chloranilín (Perera, 1996).

➤ Anilín

Anilín sa ako organická báza používa na výrobu farbív, drog, výbušnín, plastov a vo forme fotografických a gumárenských chemikálií. Prvý anilín sa získal v roku 1826 deštruktívne destiláciou indigo. Jeho názov je prevzatý z špecifického názvu rastliny Indigofera Anil, indigo(dávať). Anilín sa pripraví komerčne hydrogenizáciou nitrobenzénu alebo pôsobením a moniaku na chlórbenzén. Primárny aromatický amín, anilín je slabá báza a tvorí soli s minerálnymi kyselinami. V kyslom roztoku s kyselinou dusitou sa prevedie anilín na diazóniovú soľ, ktorá je medziproduktom pri príprave veľkého množstva farbív a iných organických zlúčenín komerčného záujmu. Keď sa anilín zahrieva s organickými kyselinami, poskytuje amidy nazývané anilidy ako je napríklad acetanilid z anilínu a kyseliny octovej. Čistý anilín je bezfarebná látka, vysoko jedovatá olejovitej konzistencie s charakteristickým zápachom (<https://www.britannica.com>).

➤ Aminofenoly

Aminofenol sa môže odkazovať na jednu z troch izomerických chemických zlúčenín:

2-Aminophenol

3-Aminophenol

4-Aminophenol

2-aminofenol je organická zlúčenina a spolu s jeho izomérom 4-aminofenol sú to amfotérne molekuly a redukčné činidlá. Je to užitočné činidlo pre syntézu farbív a heterocyklických zlúčenín. 2-aminofenol je biely prášok, hydrofilného charakteru, je mierne rozpustný v alkoholoch a môže byť rekryštalizovaný z horúcej vody. Má celú radu využití. Ako redukčné činidlo, ktoré je predávané pod názvom Atomal a Ortol na rozvíjanie černo-bielych fotografií. (Mitchell and Waring, 2002).

2-aminofenol je medziproduktom pri syntéze farbív, čo je užitočné najmä pri získavaní kovokomplexných azofarbív pri diazotácii. Farbivá s použitím medi alebo chrómu sú bežne používané na výrobu matných farieb (Grychtol and Mennicke, 2002).

4-aminofenolu (nebo para-aminofenol nebo p-aminofenol) je organická zlúčenina so vzorcom $\text{H}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OH}$. Obvykle je k dispozícii vo forme bieleho prášku. Bežne sa používa ako vyvíjač pre čierno-biely film.

Je mierne rozpustný v alkoholoch, hydrofilného charakteru a môže byť rekryštalizovaný z horúcej vody. V prítomnosti báze sa rýchlo oxiduje (Mitchel and Waring, 2002).

➤ Antranilová kyseliny

Antranilová kyseliny (o-amino-benzoová kyselina, 2-aminobenzoová kyselina) (Hardy, 1997) je aromatická kyselina so vzorcom $\text{C}_6\text{H}_4(\text{NH}_2)(\text{CO}_2\text{H})$. Molekula sa skladá zo substituovaného benzenového jadra, a preto je klasifikovaná ako aromatická s dvomi susednými buď "orto" funkčnými skupinami, karboxylovou kyselinou alebo amínom. Zlúčenina je teda amfotérneho charakteru. Kyselina antranilová je biela pevná látka aj keď obchodné vzorky sa môžu objaviť žlté. Niekedy je označovaná ako vitamín L1 a má sladkastú chuť. Kyselina antranilová je v priemyselnej výrobe medziproduktom pri výrobe azofarbív a sacharinu. Jeho estery sa používajú pri výrobe parfumov s imitáciou vône jasmínu a pomaranča (Logullo et al., 1976).

➤ N - methylanilín

N-methylanilín je derivátom anilínu. Je to organická zlúčenina s chemickým vzorcom $\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}(\text{CH}_3)$. Látka existuje ako bezfarebná alebo slabo nažltla viskózna kvapalina a hnedne, keď je vystavená vzduchu. Chemická látka nerozpustná vo vode. Používa sa ako latentné a spojovacie rozpúšťadlo a je tiež používaný ako medziprodukt pre farbivá, agrochemikálií a pri iných výrobkoch organických produktov. NMA je toxický a môže dôjsť k poškodeniu centrálného nervového systému, a môže tiež spôsobiť zlyhanie pečene a obličiek.

➤ 4 - Chlórnilín

4 – chlórnilín je pevná, organochlórová zlúčenina svetložltej farby. Nepripravuje sa z anilínu ale hydrogenáciou 4 – nitrochlórbenzenu, kedy sa pripravuje nitráciou chlórbenzenu. 4-chlórnilín je dôležitým stavebným prvkom, používaním v chemickom priemysle na výrobu pesticídov, liečiv a farbív (Booth, 2005).

4.7.2 Polycyklické aromatické uhľovodíky

Polycyklické aromatické uhľovodíky tvoria veľkú skupinu organických zlúčenín obsahujúcich dva alebo viac spojených aromatických cyklov tvorených atómami uhlíka a vodíka. PAH sú pevné za izbovej teploty, majú relatívne vysoké teploty topenia a varu a nízke tlaky nasýtených par. PAH sú rozpustné v mnohých organických rozpúšťadlách a sú v podstate nerozpustné vo vodných systémoch. Väčšina PAH majú fluorescenčné vlastnosti. Tuhé nečistoty a kyslík môžu znižovať kvantový výťažok fluorescencie. PAH sú pomerne chemicky inertné zlúčeniny. Niektoré zlúčeniny sa degradujú počas zahrievania (Nollet and Toldfá, 2012).

Najjednoduchšie chemikálie sú naftalín, ktorý má dva aromatické kruhy a tri aromatické kruhy majú zlúčeniny antracén a fenantrén (Moss, 1998).

4.7.3. Heterocyklické amíny

Heterocyklické amíny sú skupinou veľmi škodlivých látok, ktoré sú genotoxické a majú schopnosť mutagénnu aj karcinogénnu (preukázané u hlodavcov krýs a myši). Z potravy bolo izolované najmenej 23 heterocyklických amínov. Najvýznamnejšiu skupinu HA tvoria heterocyklické aromatické amíny s tromi cyklami. Sú to veľmi silné mutageny a karcinogeny (mnohonásobne silnejšie než do ich objavenia najsilnejší známy karcinogén, hepatokarcinogen aflatoxín). Pre ich mutagénnosť je rozhodujúca substitučná skupina NH_2 na dusíkatom aromatickom petčlennom alebo šesťčlennom heterocykle a poloha NH_2 k nemu, prípadne substitúcia methylskupiny (Sugimura et al., 1996).

HA vznikajú tepelným rozkladom proteínov alebo jednotlivých aminokyselín, najmä tryptofánu, fenylalanínu a kyseliny glutámovej. Vytvárajú sa počas tepelnej prípravy potravín dvoma spôsobmi a to pyrolytickou reakciou pri zvýšenej teplote (nad 300°C). Pri nižších teplotách (do 300°C), vznikajú zlúčeniny, ktoré sú silnejšie mutageny než zlúčeniny, ktoré sa vytvárajú pri vyššej teplote. Každá aminokyselina dáva vznik jednému alebo viac unikátnym HA. Ich vznikajúce množstvo je úmerné výške teploty a času jej pôsobenia na potravinu (Nagao et al., 1996).

5. Derivatizácia

Derivatizácia je extra krokom v analýze vzorky. Iba v tom prípade je vhodný, ak uľahčuje izoláciu, separáciu alebo detekciu látky, alebo vedie k silnejším (lepším) výsledkom zlepšením stability látky, redukovaním interferencie zostieňovania, zlepšením reprodukovateľnosti metódy, alebo zjednodušuje kroky výroby v danej metóde. Veľa zlúčenín postráda vhodný chromofór (zistiteľné UV-VIS), fluorofór (zistiteľné fluorescenciou a chemiluminiscenciou), elektrofór (zistiteľné elektrochemicky), alebo majú nízku ionizačnú účinnosť (zistiteľné hmotnostnou spektrometriou) k tomu, aby sa dali detekovať v očakávaných koncentráciách (Knapp, 1979).

5.1. Derivatizácia v HPLC

5.1.1. Spôsoby derivatizácie

- Postkolonová derivatizácia (reakcia prebieha za kolónou) – nenastávajú zmeny v chromatografickom systéme
- Predkolonová derivatizácia (reakcia prebieha pred kolónou) – umožní nám zmeny v chromatografickom procese

K postkolónnym reakciám dochádza v reaktore s kontinuálnym prietokom a nemusia byť kvantitatívne, kým sú reprodukovateľné. Reakčné časy sú obvykle obmedzené dizajnom reaktora a mali by byť dostatočne rýchle, aby kolónne rozlíšenie nebolo zničené difúziou v zariadení reaktora. Ako činidlo, tak vedľajšie produkty (ak sú) nemusia byť detekované pri podmienkach pre detekciu analytov alebo musia byť jednoducho separované od analytov po derivatizácii a pred detekciou. Nasledujúca operácia môže byť vykonaná extrakciou v prúde segmentovaných rozpúšťadiel (zmiešavanie nemiešateľných rozpúšťadiel), ale zvyšuje zložitosť konštrukcie reaktora. Aj keď postkolónna derivatizácia umožňuje nezávislú optimalizáciu podmienok pre separáciu a detekciu, nie je neobvyklé pre optimálnu kompozíciu rozpúšťadiel na separáciu, aby boli nekompatibilné s požiadavkami derivatizačnej reakcie. Toto môže obmedziť niektoré aplikácie postkolónnej derivatizácie (Lunn and Hellwing, 1998).

Pri predkolónnej derivatizácii musí byť zvolená reakcia kvantitatívna, aspoň približne, a bez obsahu vedľajších produktov. Reakčné podmienky sa môžu optimalizovať bez časových obmedzení. Ak je to možné, vzorky sa spracovávajú v sériách, a to s vysokou mierou automatizácie a kontroly reakčných podmienok. Avšak, môžu sa spracovávať aj manuálne alebo pre jednotlivé vzorky. Všeobecne platí, že musí byť k dispozícii jednoduchá metóda na rozdelenie nadbytočného činidla a iných produktov z derivátov, ak by interferovali v separácii alebo pri detekcii derivátov. To je celkom pravdepodobné, ak činidlo a derivatív zdieľajú vzájomnú základnú štruktúru, ktorá ovplyvňuje odozvu detektoru (Blau and Halket, 1993).

5.1.2. Dôvody použitia derivatizácie v HPLC

- Zvýšenie citlivosti alebo k umožnení detekcie vôbec
- Zvýšenie rozlíšenia alebo k umožnení separácie vôbec
- Zamedzeniu nežiaducej sorpcie látok na kolónu

5.1.3 Aplikácia derivatizácie

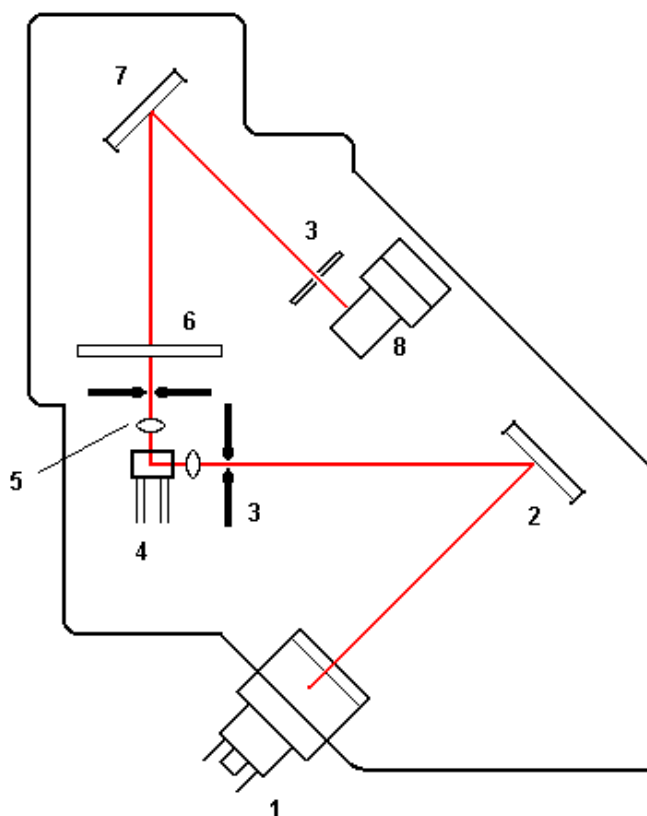
K tvorbe detekovateľných derivátov vedú rôzne aplikované derivatizačné reakcie. V HPLC ich máme niekoľko skupín:

- K detekcii derivátov vhodných v oblasti UV-VIS spektra
- K detekcii derivátov vhodnou fluorometrickou
- K detekcii derivátov vhodnou rádiochemickou
- K detekcii derivátov vhodnou elektrochemickou
- K detekcii derivátov vhodnou atomovou absorpčnou spektrofotometriou (Townshend, 1995)

5.2. Fluorescenčný HPLC detektor

Fluorescencia je svetelný jav, ktorý sa prejavuje schopnosťou niektorých látok absorbovať svetlo určitej farby (kratšej vlnovej dĺžky) a následne emitovať svetlo inej farby (dlhšej vlnovej dĺžky). Fluorometrické detektory sú založené na princípe fluorescencie a meraní sekundárneho žiarenia, ktoré inak nazývame emisné. Je to žiarenie, ktoré látka vydá po absorpcii primárneho elektromagnetického žiarenia, inak nazývané excitačné žiarenie. U fotoluminiscencie, býva doba trvania u fluorescencie 10^{-8} až 10^{-5} sekundy. Absorbanciou

elektromagnetického žiarenia prechádzajú valenčné elektróny zo základného singletového elektrónového stavu do rôznych vibračných hladín excitovaného singletového stavu. Energiu, ktorú absorbovaná excitovaná molekula prijala, môže znovu vyžiariť ako fluorescenciu alebo ju môže premeniť úplne iným spôsobom mechanizmu na energiu vibračnú alebo ju predá iným molekulám. Ak stratí vibračnú energiu, prejde molekula najprv do základného vibračného stavu a potom emituje fluorescenčné žiarenie, ktoré má rovnakú vlnovú dĺžku ako absorbované žiarenie. Častejšie je vlnová dĺžka emitovaného žiarenia väčšia v dôsledku vibračnej relaxácie. Na obrázku číslo 9 môžeme vidieť fluorescenčný detektor, ktorý sa skladá: 1. výbojka (rtuťová alebo xenonová), 2. excitačná mriežka (monochromátor), 3. štrbina, 4. prietoková cela, 5. mikročočky, 6. cut-off filter, 7. emisná mriežka (monochromátor), 8. Fotonásobič (Wilson and Poole, 2009).



Obrázok 9 – Fluorescenčný HPLC detektor (<http://www.hplc.cz>)

5.3. Deriváty pre fluorometrickú detekciu

Účelom tejto detekcie je zaviesť do molekuly takú skupinu, ktorá vykazuje fluorescenčné vlastnosti a umožní nám tak detekciu týchto látok. Tieto deriváty vykazujú detekčný limit až

o tri stupne nižšie ako deriváty detekované v ultrafialovej a viditeľnej oblasti spektra. Pre praktické použitie fluoroderivátov by mali platiť určité predpoklady:

- a) Rýchla a kvantitatívna reakcia za miernych podmienok (laboratórna teplota)
- b) Tvorba nepolárnych derivátov dovoľujúce ich extrakciu do nepolárnych rozpúšťadiel
- c) Špecifickosť pre danú funkčnú skupinu
- d) Nadbytok derivatizačného činidla musí byť ľahko separovateľný od jeho produktu
- e) Deriváty by mali mať uspokojivé chromatografické vlastnosti a mali by byť dostatočne stabilné (Dong, 2016).

5.3. Výber derivatizačného činidla

Derivatizačné činidlo môže obsahovať dve časti: reaktívnu funkčnú skupinu, ktorá kontroluje rýchlosť, rozsah a selektivitu chemickej reakcie (tvorba derivátu), ďalej obsahuje konštrukčnú jednotku, ktorá sa stará o dobrú odozvu derivátu na detektore a v predkolónnych reakciach modifikuje izolačné a separačné vlastnosti analytov. Pri výbere činidla sú dôležité podmienky potrebné k reakcii a či dané podmienky ovplyvňujú stabilitu analytov, stabilitu derivátov a jednoduchosť, s ktorou je možné nadbytočné činidlo oddeliť od derivátov. V závislosti na type vzorku, či reakcia vyžaduje kompletne bezvodé podmienky alebo či sa vyskytuje vo vodnom roztoku, môže byť dôležitým faktorom. Túžba po využití rýchlych a kvantitatívnych reakcií kladie obmedzenie na počet činidiel, ktoré sa obvykle používajú a na typy funkčných skupín analytov, ktoré je možné jednoducho derivatizovať (Toyo'oka, 1999).

5.4. Činidlá pre detekciu fluorescencie a chemiluminiscencie

Detekcia fluorescencie sa používa pre tie metódy, ktoré vyžadujú buď nízke detekčné limity alebo vyššiu selektivitu. Niekoľko organických zlúčenín prirodzene fluoreskuje a nešpecifické interferencie v determinácii fluorescenčných zlúčenín sú znížené v porovnaní s UV-VIS absorpčnými metódami. Okrem toho, fluorescenčný proces vyžaduje excitáciu pri jednej vlnovej dĺžke a emisiu pri inej (dlhšej) vlnovej dĺžke, čo ďalej zvyšuje selektivitu a detekovateľnosť. Voľba excitačných a emisných vlnových dĺžok poskytuje možný mechanizmus k rozlišovaniu fluorescenčných zlúčenín v zmesi a zlepšenie selektivity. Dlhšie vlnové dĺžky emisného signálu minimalizujú podiel rozptýleného svetla od excitačnej vlnovej dĺžky, čo má za následok nízku úroveň šumu pozadia a možnosť zosilnenia signálu. Toto

v kombinácii s vyššou excitačnou energiou zdrojov fluorescence je do značnej miery zodpovedné za zosilnenie signálu o dva alebo viac rádov a umožňuje tak detekciu fluorescenčných látok pri nízkych, pikogramových, množstvách. Fluorescenčný signál podlieha množstvu interferencií matice, čo môže ovplyvniť intenzitu signálu a emisnú vlnovú dĺžku (Poole, 2003).

Fluoreskamin reaguje s vodou, alkoholmi a amínmi, ale stabilný fluorescenčný produkt tvorí len s primárnymi amínmi. Kvantitatívne reakcie vo vodno-organickom rozpúšťadle pufrovanom na pH 8-9,5 prebiehajú za menej ako minútu. Uľahčujú postkolónnu stratégiu detekcie a k hydrolyze činidla dochádza súčasne. o-ftalaldehyd reaguje rýchlo, 1 až 2 minúty, s amínmi vo vodnom roztoku pufrovanom na pH 10 v prítomnosti thiolu (2-merkptoetanol, etántiol, atď.) a vedie k tvorbe vysoko fluorescenčného 1-2-alkylisoidolu (Rammouz, 2007).

Ak je dôležitá stabilita derivátov, tak sú vhodnou alternatívou amidové deriváty obsahujúce akridín alebo fluorofór karbazolu (Salvatore, 2013).

Dajú sa jednoducho pripraviť využívajúc činidlá s reaktívnou skupinou acetyl chloridovu. Fluorenylmetoxykarbonyl chlorid reaguje s amínmi v zásaditom roztoku za menej ako jednu minútu. Deriváty sa dajú skladovať, ale musia byť ochránené voči nadbytočnému činidlu, pretože deriváty a činidlo majú podobné fluorescenčné vlastnosti. Alternatívne môže byť reakcia ukončená prídavkom nadbytku amínu, ktorý je možné jednoducho separovať od dôležitých derivátov. 4-Chlóro-7-nitrobenzofurazan tvorí vysoko fluorescenčné deriváty s amínmi, ale len slabé či nefluorescenčné produkty s anilínami, fenolmi a tiolmi v zlom výťažku (Santa et al., 2008)

Aj v prípade, že je činidlo nefluoreskujúce, interferuje s fluorescenciou derivátov, a preto by malo byť nadbytočné činidlo odseparované. 4-fluóro-7-nitrobenzofurazan analóg je reaktívnejší a nahradil 4-chlóro-7-nitrobenzofurazan v mnohých z jeho bežných aplikácií (Mukherjee and Karnes, 1996).

5.5. Činidlá pre amíny

Amíny sa obvykle derivatizujú kyselinou chloridu k vytvoreniu fenolom substituovaných amidov alebo sulfoamidov. Sangerovo činidlo, 2,4-dinitro-1-fluorbenzén, pôvodne vložené k identifikácii N-terminálnych zvyškov amino kyselín v proteínoch, je často používaným

derivatizátorom amínov. Karbamátne a fenylctanové činidlá sa môžu použiť pre derivatizáciu amínov za miernych podmienok bez katalyzátora. Fenyl isokyanát je bežne používaný pre predkolónnu derivatizáciu aminokyselín (deriváty fenylthiokarbamylu) pre rozdelenie spätno-fázovou kvapalnou chromatografiou (Palego et al., 2010)

5.5.1. Sulfonylchloridy

5-N, N'-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid

Dansylchlorid je reakčné činidlo, ktoré reaguje s primárnymi aminoskupinami ako v alifatických tak aj v aromatických amínoch za vzniku modro- alebo modro-zelených fluorescenčných sulfónamidových aduktov. V miernom alkalickom prostredí prebiehajú reakcie s primárnymi a sekundárnymi amínmi a aminokyselinami ale vo vodno-acetónovom prostredí nám reakcia bude prebiehať za niekoľkonásobného nadbytku činidla. U dansylačnej reakcie nám vzrastá nielen pH prostredia ale aj rýchlosť hydrolýzy derivátov. Optimálne pH prostredie sa nám pohybuje od 9,5 do 10 (Walker, 1994).

Jeho deriváty sú žlté kryštalické látky, ktoré sú rozpustné v organických rozpúšťadlách ale iba mierne rozpustné vo vode. Ich rozpustnosť vo vode závisí od pH roztoku. Na molekulárnej štruktúre závisia nielen spektrálne vlastnosti ale aj na vlastnosti rozpúšťadla a pH. Absorpčné hodnoty dansylderivátov koeficientov sa pohybujú $\epsilon_{252} = 1,3 \times 10^4$, $\epsilon_{333} = 4,3 \times 10^3$ v metanole (Seiler, 1970).

5-N, N'-dibutylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid

Bansylchlorid je síce analógom dansylchloridu ale jeho deriváty sú stabilnejšie a reakcie s amínmi sú pomalejšie. U týchto derivátov sú výťažky fluorescencie asi o 10% vyššie ako u dansylchloridu. Deriváty sú menej polárne a sú teda lepšie extrahovateľné.

6-N-methylanilinonaftalen-2-sulfonylchlorid

Obdobne jako u dansylchloridu tak aj mansylchlorid reaguje ako s primárnymi tak aj so sekundárnymi amínmi. Mansylchlorid bol taktiež navrhnutý ako činidlo na určenie N-terminálnych aminokyselín. Jeho deriváty v porovnaní s dansylchloridom majú vyšší absorpčný koeficient $\epsilon_{231} = 4,2 \times 10^4$, $\epsilon_{321} = 2,3 \times 10^4$ v propanole. Fluoreskuje pri hodnotách vlnovej dĺžky 450 nm s excitačným živením 321 až 324 nm.

2-p-chlorosulfofenyl-3-fenylidon

2-p-chlorosulfofenyl-3-fenylidon inak nazývaný disylchlorid reaguje s amínmi, imidazolmi, fenolmi a alkoholmi na príslušné amidy respektíve estery. Jeho deriváty majú oranžovú alebo červenú farbu a zároveň, môžu tieto deriváty byť prevedené na vysoko fluoreskujúce deriváty 1-fenyl-3-p-sulfofenylisobenzofurany reakciou s alkoholickým hydroxidom draselným alebo ethoxydem sodným (<http://www.hplc.cz>).

1,2-naftoylbenzimidazol-6-sulfochlorid

1,2-naftoylbenzimidazol-6-sulfochlorid reaguje s alifatickými, aromatickými amínmi ale dobre reaguje aj s imidazolmi a jeho reakcia prebieha v acetonitrile za prídavku vodného roztoku uhličitanu draselného pri teplote 40 až 45 ° C. Jeho detekčný limit sa pohybuje od 0,1 pmol až 50 fmol (Tocksteinová et al., 1983).

5.5.2. Karbonylchloridy

9-fluorenyl-methyloxycarbonyl chlorid

Všeobecne ich môžeme nazývať chloroformáty (oxycarbonylchloridy) a z nich 9-Fluorenyl-methyloxycarbonyl chlorid (FMOC-Cl) reaguje ako s primárnymi tak aj so sekundárnymi aminokyselinami. Pri reakcii vznikajú fluoreskujúce deriváty s excitačným maximom pri 263 nm a emisným maximom 313 nm. FMOC-Cl sa používa výhradne na derivatizáciu pred kolónou (Wróblewski, 2017).

Aby nedochádzalo k reakcii s fenoly alebo alkoholy, tak reakcia prebieha v boritanovom pufrí pri pH 7,7. FMOC-Cl sa používa vo veľkom nadbytku, čož je značnou nevýhodou, ktorá musí byť odstránená. Chybu odstránime v následnom extrakčnom kroku pentánom alebo musíme nadbytok odstrániť reakciou s hydrofóbnym (nepolárnymi) amínom, ako napríklad adamantamin alebo octylamin. Faktom je, že pri použití pentánu ako extrakčného média v niekoľkostupňovej extrakcii nadbytku činidla zavádime do reakcie ďalšie chyby, ale naproti tomu odstránenie nadbytku činidla nepolárnymi amínmi zavádza do derivatizujúcej procedúry jediný krok navyše a nepredlžuje podstatne dobu analýzy. Problematickou reakciou je reakcia histidínu, ktorý môže poskytovať mono- alebo disubstituované deriváty (Gustavsson and Betnér, 1990).

2-naftyloxycarbonylchlorid

NCF-Cl reaguje za prítomnosti uhličitanu draselného v benzénu v uzatvorenej vialke pri teplote 100°C po dobu 1 hodiny s terciárlymi amínmi. Za týchto podmienok, amíny podliehajú dealkylácii. Vznikajú tak fluorescenčné deriváty vo vysokom výťažku, ktoré sú vhodné pre chromatografickú separáciu. Excitačná vlnová dĺžka derivátov je 275 nm, emisná vlnová dĺžka 335 nm s detekčným limitom rádovo pmol (Gübitz et al., 1981).

6. Záver

Prvá časť práce nám popisuje základné poznatkami o chromatografii, kde jej podstatou je rozdeľovanie zložiek zmesi medzi dvoma fázami. Jednou z techník je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, ktorá je mimoriadne vhodná na separáciu materiálov s vysokou molekulárnou hmotnosťou, ktorých prchavosť je veľmi nízka a nedajú sa separovať pomocou plynovej chromatografie.

Druhá časť práce sa zaoberá amínmi. Najprv nám približuje všeobecné amíny. Amíny sú organické zlúčeniny a tiež druh funkčnej skupiny, ktoré obsahujú dusík ako kľúčový atóm. Vo svojej štruktúre amíny pripomínajú amoniak, kde jeden alebo viac vodíkových atómov je nahradených organickými substituentami. Ďalej sú v tejto časti kapitoly popísané aromatické amíny, ktoré majú amínovú skupinu naviazanú na aromatickom jadre. Najznámejším zástupcom týchto zlúčenín je anilín.

V tretej časti sa zaoberá derivatizáciou a výberom vhodného derivatizačného činidla. Výber derivatizačného činidla je založený na funkčnej skupine požadovanej derivatizácie, chovaní ostatných funkčných skupín v molekule a dôvod vykonania derivatizácie.

Cieľom práce bolo stanovenie konkrétnych aromatických amínov, ktoré majú schopnosť fluorescencie. V bakalárskej práci som spomenula najznámejších zástupcov ako sú dansylchlorid, bansylchlorid, mansylchlorid, 2-p-chlorosulfofenyl-3-fenylidon, 1,2-naftoylbenzimidazol-6-sulfochlorid, 9-fluorenyl-methyloxycarbonylchlorid, 2-naftyloxycarbonylchlorid.

Použitá literatura

McMurry, J. *Organic chemistry with biological applications* 2nd Edition. Belmont, Calif.: Brooks/Cole Cengage Learning, 2011, ISBN 9780495391470

Hostettmann, K., Marston A., Hostettmann M. *Preparative Chromatography Techniques Applications in Natural Product Isolation*. Second, Completely rev. and enlarged edition. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998, ISBN 9783662036310

Cazes, J. *Encyclopedia of chromatography* 2nd Edition. Boca Raton, FL: Taylor & Francis, 2005, ISBN 9780824727871

Vondrák D., Vulterin J. *Analytická chemie*, Praha: SNTL, 1985

Gerber, F., Krummen M., Potgeter H., Roth A., Siffrin Ch., Spöndlin Ch. *Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3 μ m particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice: Lecture Notes from the 2nd ERCOFTAC Summerschool held in Stockholm, 10-16 June, 1998* [online]. [cit. 2017-03-21]. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.02.056., ISBN 10.1016/j.chroma.2004.02.056. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967304003139>

Holzbecher Z., Churáček J., Hejtmánek M., Kostrlý S., Ksandr Z., Vlácil F. Vrbský J. *Analytická chemie*, Praha: SNTL, 1987

Karger B.L. HPLC: Early and Recent Perspectives. *Journal of Chemical Education* [online]. 1997, **74**(1), 45- [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1021/ed074p45. ISSN 0021-9584. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed074p45>

Dolan J.W., Kirkland J.J., Snyder L.R. *Introduction to modern liquid chromatography*. Hoboken, N.J: Wiley, 2013, ISBN 1118210395

Garaj J., Bustin D., Hladký Z. *Analytická chemie*, ALFA/SNTL, Bratislava/Praha, 1987

Neue U.D. *HPLC columns: theory, technology, and practice*. New York: Wiley-VCH, 1997, ISBN 978-0471190370

Guillaume Y., Guinhard C. A New Method to Study Column Efficiency and the Separation of Seven Compounds in Reversed-Phase Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 1995, 33(4), 204-210 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1093/chromsci/33.4.204, ISSN 00219665. Dostupné z: <https://academic.oup.com/chromsci/article/lookup/doi/10.1093/chromsci/33.4.204>

Churáček, J. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990, ISBN 80-03-00569-8

Worsfold P., Townshend A., Poole C. F. *Encyclopedia of analytical science*. 2nd Edition Boston: Elsevier Academic Press, 2005, ISBN 0-12-764100-9

Nováková L., Douša M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013, ISBN 978-80-260-4243-3

McMurry, J. *Organic chemistry*. 3rd Edition. Pacific Grove, Calif.: Brooks/Cole Pub., 1992, ISBN 0-534-16218-5

Townshend A. *Encyclopedia of analytical science* (Volume 6) London: Academic Pr, 1995, ISBN 0122267060

Lide D.R. *CRC Handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data*. 86th ed. Boca Raton, Fla. [u.a.]: Taylor & Francis, 2005, ISBN 0849304865

Wójcik G.M. Structural Chemistry of Anilines. *PATAI'S Chemistry of Functional Groups* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2009 [cit. 2017-06-16]. DOI: 10.1002/9780470682531.pat0385. ISBN 9780470682531. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470682531.pat0385>

Vogt P.F., Gerulis J.J. Amines, Aromatic. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2000, s. 1 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1002/14356007.a02_037. ISBN 9783527306732. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a02_037

Lawrence Stephen A. *Amines: synthesis, properties, and applications*. New York: Cambridge University Press, 2004, ISBN 0521782848.

Gibreel A., Tracz D.M., Nonaka L., Ngo T.M., Connell S.R., Taylor D.E. (2004) Incidence of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with special reference to tet(O)-mediated tetracycline resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(9):3442-3450

Perera F.P. Molecular Epidemiology: Insights Into Cancer Susceptibility, Risk Assessment, and Prevention. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* [online]. 1996, 88(8), 496-509 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1093/jnci/88.8.496. ISSN 0027-8874. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/88.8.496>

Mitchell S.C., Waring R.H. Aminophenols. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2000 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1002/14356007.a02_099. ISBN 3527306730. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a02_099

Grychtol K., Mennicke W. Metal-Complex Dyes. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2000, [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1002/14356007.a16_299. ISBN 3527306730. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a16_299

Hunger K., Mischke P., Rieper W., Raue R., Kunde K., Engel A. Azo Dyes. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2000 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1002/14356007.a03_245. ISBN 3527306730. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a03_245

Benzenediazponium-2-carboxylate and biphenylene. *Organic Syntheses* [online]. 1968, 48, 12-[cit. 2017-05-09]. DOI: 10.15227/orgsyn.048.0012. ISSN 00786209. Dostupné z: <http://orgsyn.org/demo.aspx?prep=CV5P0054>

Kato, K. Impact of the next generation DNA sequencers, *International journal of clinical and experimental medicine*, 2009, 2(2):193–202

Booth G. Nitro Compounds, Aromatic. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*

[online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2000 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1002/14356007.a17_411. ISBN 3527306730. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a17_411

Nollet Leo M. L., Toldrá F. *Food analysis by HPLC*. 3rd Edition Boca Raton, FL: CRC Press, 2013, ISBN 9781439830840

Moss G. P. Nomenclature of fused and bridged fused ring systems (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry* [online]. 1998, **70**(1), - [cit. 2017-06-12]. DOI: 10.1351/pac199870010143. ISSN 1365-3075. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/view/j/pac.1998.70.issue1/pac199870010143/pac199870010143.xml>

Feng X., Pisula W., Müllen K. Large polycyclic aromatic hydrocarbons: Synthesis and discotic organization. *Pure and Applied Chemistry* [online]. 2009, 81(12), - [cit. 2017-06-07]. DOI: 10.1351/PAC-CON-09-07-07. ISSN 1365-3075. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/view/j/pac.2009.81.issue-12/pac-con-09-07-07/pac-con-09-07-07.xml>

Clar, E. Polycyclic Hydrocarbons. New York: Academic Press. LCCN 63012392, 1964, (<http://lcn.loc.gov/63012392>)

Sugimura T, Nagao M, Wakabayashi K. Carcinogenicity of food mutagens. *Environmental Health Perspectives*. 1996;104(Suppl 3):429-433. *Environmental health perspectives: journal of the National Institute of Environmental Health Sciences*. Research Triangle Park (North Carolina): National Institute of Environmental Health Sciences, 1972-.

Nagao M, Wakabayashi K, Ushijima T, Toyota M, Totsuka Y, Sugimura T. Human exposure to carcinogenic heterocyclic amines and their mutational fingerprints in experimental animals. *Environmental Health Perspectives*. 1996;104(Suppl 3):497-501.

Knapp, Daniel R. *Handbook of analytical derivatization reactions*. New York: Wiley, 1979, ISBN 047103469x.

Lunn G., HELLWIG L.C. *Handbook of derivatization reactions for HPLC*. New York: Wiley, c1998. ISBN 978-0-471-23888-1.

Blau K., HALKET M.J. *Handbook of derivatives for chromatography*. 2nd ed. /. New York: Wiley, c1993. ISBN 978-0-471-92699-3

Townshend A. *Encyclopedia of analytical science* (Volume 3) London: Academic Pr, 1995, ISBN 0122267036

Wilson I.D., Poole C.F. *Handbook of methods and instrumentation in separation science.* Boston: Elsevier, 2009, ISBN 0123757274

Dong Michael W. *Modern HPLC for Practicing Scientists.* 2016, ISBN 9781119293606.

Toyo'oka T. *Modern derivatization methods for separation sciences.* New York: Wiley, 1999, ISBN 978-0-471-98364-4.

Poole C. F. *The essence of chromatography.* Boston: Elsevier, 2003, ISBN 0444501991.

Rammouz G, Lacroix M, Garrigues J.C, Poinsot V., Coudere F.O. The use of naphthalene2,3-dicarboxaldehyde for the analysis of primary amines using high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Biomed Chromatogr* 2007;21:1223e39.

Santa T, Fukushima T, Ichibangase T, Imai K. Recent progress in the development of derivatization reagents having a benzofurazan structure. *Biomed Chromatogr* 2008;22:343e53.

Mukherjee P.S., Karnes H.T. Ultraviolet and fluorescence derivatization reagents for carboxylic acids suitable for high performance liquid chromatography: a review. *Biomed Chromatogr* 1996;10:193e204.

Palego L, Giannaccini G, Saccomanni G, Ross A, Lucchesi V, Mascia G. Modified RP-LC of phenylthiocarbamyl amino acid adducts in plasma acetonitrile extracts using multiple internal standards and phot-diode UV detection. *Chromatographia* 2010;71:291e7

Walker J.M. *Basic protein and peptide protocols.* Totowa, N.J.: Humana Press, 1994, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), v. 32. ISBN 0-89603-268-x.

Schmidt G.J., Olson D.C., Slavin W. Determination of phenylalanine in serum using reversed-phase liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1979, **164**(3), 355-362 [cit. 2017-06-12]. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)81236-0. ISSN 03784347. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378434700812360>

Seiler N. Identification and quantitation of amines by thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 1971, **63**, 97-112 [cit. 2017-06-12]. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)85620-X. ISSN 00219673. Dostupné z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730185620X>

Rosmus J., Deyl Z. Chromatographic methods in the analysis of protein structure. *Chromatographic Reviews* [online]. 1971, **13**(3), 163-302 [cit. 2017-06-13]. DOI: 10.1016/0009-5907(71)80001-7. ISSN 00095907. Dostupné z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009590771800017>

Tocksteinová D., Novák A., Horáková H., Nepraš M., CHURÁČEK J. 7-Oxo-7H-benzimidazo[2,1-a]benz[d,e]isoquinoline-9-sulphonyl chloride as a new fluorescence reagent for identification and determination of aliphatic amines. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* [online]. 1983, **48**(8), 2249-2254 [cit. 2017-06-13]. DOI: 10.1135/cccc1983229 ISSN 0010-0765. Dostupné z: <http://cccc.uochb.cas.cz/48/8/2249/>

Wróblewski K., Petruczynik A., Radzik I., Czuczwar S. J., Waksmundzka-Hajnos M. Determination of selected antiepileptic drugs in mouse brain homogenates by HPLC—DAD. *Acta Chromatographica* [online]. 2017, **29**(2), 219-234 [cit. 2017-06-13]. DOI: 10.1556/1326.2017.29.2.6. ISSN 1233-2356. Dostupné z:

<http://www.akademai.com/doi/abs/10.1556/1326.2017.29.2.6>

Gustavsson B., Betnér I. Fully automated amino acid analysis for protein and peptide hydrolysates by precolumn derivatization with 9-fluorenyl methylchloroformate and 1-aminoadamantane. *Journal of Chromatography A* [online]. 1990, **507**, 67-77 [cit. 2017-06-13]. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)84182-0. ISSN 00219673. Dostupné z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301841820>

Gübitz G., Wintersteiger R., Hartinger A. Fluorescence derivatization of tertiary amines with 2-naphthyl chloroformate. *Journal of Chromatography A* [online]. 1981, **218**, 51-56 [cit. 2017-06-13]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)82045-2. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300820452>

Internetové zdroje

<http://www.chemguide.co.uk/organicprops/amines/background.html>

<http://www.se-source.com/agilent1200.htm>

<http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>

<http://slideplayer.cz/slide/3160943/>

http://www.hplc.cz/Teorie/hplc_column.html

<https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/amine1.htm>

<https://www.britannica.com/science/aniline>

<http://academic.eb.com/levels/collegiate/article/7634>

http://www.hplc.cz/Der/amin_FL.htm