

STANOVENÍ AMINŮ POMOCÍ HPLC S FLUORESCENČNÍ DETEKČÍ

PETERKA ONDŘEJ, BAJEROVÁ PETRA, ADAM MARTIN a EISNER ALEŠ*

Katedra analytické chemie

* *Garant*

ÚVOD

Aminy jsou dusíkaté látky odvozené od amoniaku a podle počtu nahrazených vodíků se dělí na primární, sekundární a terciární ¹. Aminosloučeniny mohou být jak přírodního tak syntetického původu. Mezi nejznámější přírodní skupiny aminů patří alkaloidy, aminokyseliny, neurotransmitery, koenzymy, proteiny a biogenní aminy. Z biologického materiálu jsou poté aminy uvolňovány do přírody při rozkladných procesech. Syntetické aminy jsou vyráběny ve velkém měřítku a v dnešní době jsou téměř nepostradatelné. Využívané jsou zejména pro výrobu léčiv, barviv, výbušnin, syntetických vláken, pryskyřic atd ².

Aminosloučeniny se řadí do hořavin, výbušnin a látek s nízkým bodem vzplanutí. Tyto vlastnosti umožňují jejich využití jako výbušniny nebo jako jejich příměsí ³. Jako výbušniny se využívají spíše cyklické aminy, například hexogen (1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin) nebo oktogen (1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazokan). Právě oktogen je v dnešní době považován za jednu z nejvýkonnějších trhavin. Jednoduší aminy mohou být využity jako palivo pro zvýšení brzance ⁴.

Kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí je vysoce citlivá nedestruktivní metoda pro látky emitující fluorescenční záření. Touto vlastností nedisponují všechny látky, proto je nutná jejich derivatizace za použití vhodného činidla. Při těchto reakcích je nutné nastavit vhodné reakční podmínky. Mezi nejdůležitější patří vhodné pH a teplota. Požadované pH je upraveno pomocí tlumivých roztoků a správná reakční teplota je zajištěna termostaty ⁵.

Jako derivatizační činidla pro aminosloučeniny lze využít velké množství látek. Jednou z nejstarších je dansyl chlorid, který je vhodný jak pro primární tak i sekundární aminy. Nevýhodou je však vyšší reakční teplota, dlouhá reakční doba a reakce s alkoholy a fenoly ^{5,6}. Dalším činidlem užívaným pro primární aminy je *o*-ftaldialdehyd (OPA), který je vhodný pro předkolonovou i postkolonovou derivatizaci. Reakce probíhá rychle a při laboratorní teplotě. Při derivatizaci OPA je nutná přítomnost thiolu, nejčastěji 2-merkaptoethanolu, 2-ethanthiolu, 3-merkaptopropanové kyseliny nebo acetylcysteinu ^{5,7}. Fluoreskamin je také vhodný pro primární aminy a samotné činidlo nefluoreskuje. Derivatizace probíhá za laboratorní teploty, avšak produkty jsou málo stabilní ve vodném prostředí ⁸. Činidlo 9-(fluorenyl) ethylchloromravenčan, označováno zkratkou Fmoc, se využívá pro derivatizace primárních i sekundárních aminů. Produkty jsou stabilní karbamáty, které vznikají rychle za laboratorní teploty ⁵. Nevýhodou je fluorescence samotného činidla, proto je nutné nadbytek činidla odstranit. Nejčastěji se eliminace provádí extrakcí do vhodného rozpouštědla, kterými jsou pentan, hexan, dichlormethan nebo chloroform ⁹. Druhou variantou je derivatizace na pevné fázi, kdy je vzniklý derivát zachycen na sorbentu. Desorpce se provádí pomocí polárního rozpouštědla, nejčastěji acetonitrilem ¹⁰.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Derivatizační činidlo o koncentraci 15 mM bylo připraveno rozpuštěním pevného Fmoc v acetonitrilu. Borátový pufr byl připraven rozpuštěním kyseliny borité v redestilované vodě a pomocí hydroxidu sodného bylo pH upraveno na hodnotu 8. Derivatizace diethylaminu (DEA) byla prováděna v 5 ml nádobkách se šroubovacím víčkem. V nádobce bylo smícháno 400 μ l aminu, 500 μ l 15 mM 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčanu a 100 μ l 1M borátového pufru. Směs byla míchána pomocí elektrické míchačky (YELLOW LINE) intenzitou 2 200 ot./min po dobu 120 sekund. Poté bylo k roztoku přidáno 10 μ l kyseliny octové a 2 ml hexanu. Směs byla poté míchána 40 sekund. Do kapalinového chromatografu bylo pomocí autosampleru (SIL – 10 ADVP) dávkováno 20 μ l vodné fáze.

Pro separaci byla vybrána kolona KINETEX EVO - C18 (150 mm \times 4,6 mm, 2,6 μ m) s ochranou předkolumnou. Mobilní fáze byla složena ze směsi 0,03M acetátový pufr (A) a acetonitril (B). Pro separaci byla nastavena gradientová eluce 0 – 25 min 50% (V/V) MF B, do 30 min 85% (V/V) MF B, 30 - 38 min 85% (V/V) MF B, do 40 min 50% (V/V) MF B, 40 - 41 min 50% (V/V) MF B. Průtok mobilní fáze byl nastavený na 0,8 ml \cdot min⁻¹. Prostor kolony byl vyhříván pomocí termostatu (CTO – 10 ASVP) na teplotu 25 °C. Pro detekci bylo nastaveno na fluorescenčním detektoru (RF – 20 AXS) excitační vlnová délka 265 nm a emisní vlnová délka 310 nm.

Chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí programu LabSolutions, kde byly odečteny plochy píku. Data byla zadána do programu MS Excel, kde byla vykreslena křivka. Z její lineární části byl vypočten limit detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ).

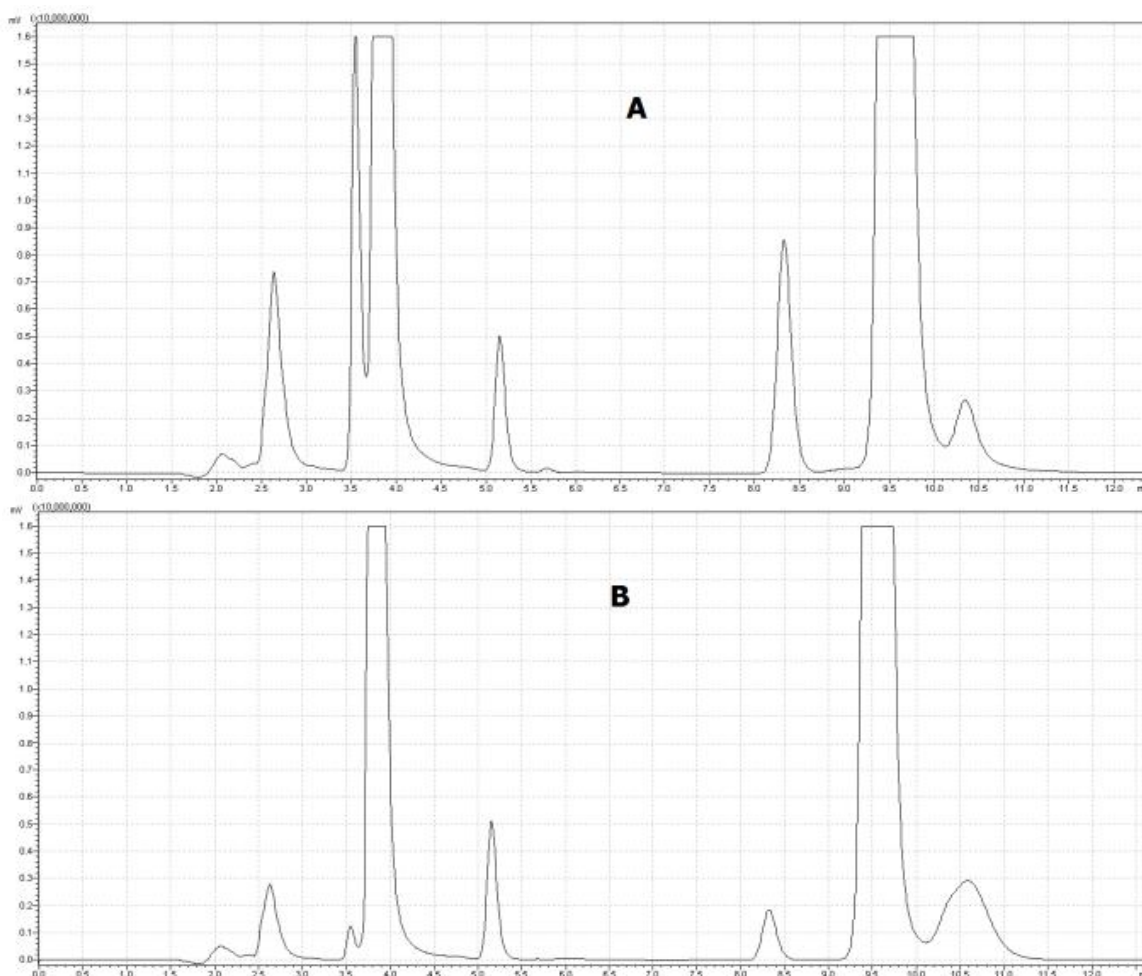
VÝSLEDKY A DISKUZE

Derivatizace a stabilita derivátu

Vznik derivátu je závislý na pH derivatizačního prostředí. Dle literatury ¹¹ je vhodné pH 8-12. V této práci bylo pH 8 zajištěno pomocí borátového pufru. Hodnota pH byla vhodná, protože vzniklé deriváty vznikaly rychle a byly stabilní. Vzniklé deriváty byly uchovávány v lednici při 4 °C. Při těchto podmínkách byly deriváty stabilní několik dní. Při naředění derivátu vodou došlo k rozkladu derivátu do 24 hodin.

Extrakce nadbytku činidla

K extrakci nadbytku derivatizačního činidla je vhodných více látek. Chlorované látky, jako dichlormethan nebo chloroform nebyly z bezpečnostního a ekologického důvodu k extrakci používány. Z tohoto důvodu byly k extrakci testovány pouze pentan a hexan. U obou látek proběhla extrakce za stejných podmínek a separace na koloně LiChrosper 100 RP-18e (250 mm \times 4 mm, 5 μ m). Chromatogramy po jednotlivých extrakcích jsou znázorněny na obrázku 1. Hexan odstraňuje větší množství derivatizačního činidla, proto je vhodnější než pentan. Je nutné použít vhodné množství extrakčního činidla, protože při nadbytečném množství dochází i k extrakci vzniklého derivátu.



Obrázek 1: Chromatogram po extrakci v pentanu (A) a hexanu (B).

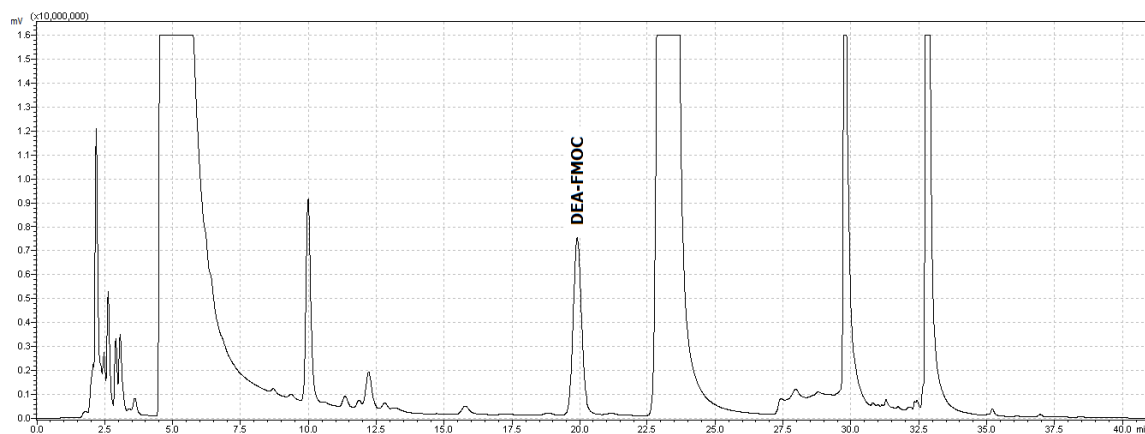
Chromatografická separace

K separaci derivátu diethylaminu byla použita chromatografie s obrácenými fázemi. Jako stacionární fáze byla zvolena kolona C18. Testovány však byly tři typy kolony o různé délce a velikosti náplně. U každé kolony byla zařazena ochranná předkolonka. Jako první byla testována kolona LiChrosper 100 RP-18e (125 mm × 4 mm, 5 μm). Separace na této koloně nebyla dostačující, proto byla kolona vyměněna za delší kolonu LiChrosper 100 RP-18e (250 mm × 4 mm, 5 μm). Druhá kolona poskytovala výrazně lepší separaci, avšak stále nebyla dostačující a nepodařilo se identifikovat derivát. Jako třetí kolona byla testována kolona KINETEX EVO - C18 (150 mm × 4,6 mm, 2,6 μm). Tato kolona byla vyhodnocena jako nejvhodnější z důvodu nejlepšího rozseparování látek.

Pro zjištění správného složení mobilní fáze bylo testováno několik variant. Nejprve bylo zkoušeno složení acetonitril (ACN) – voda v objemovém poměru 60:40, 70:30 a 80:20. V těchto případech docházelo k brzké eluci všech látek a nebyla možná jejich identifikace. Proto bylo složení mobilní fáze změněno na acetonitril – 0,03M acetátový pufr, kdy acetátový pufr výrazně zvýšil účinnost separace. Separace byla testována s objemovými koncentracemi acetonitril – acetátový pufr 80:20, 70:30, 60:40 a 50:50. Nejvhodnější složení mobilní fáze

bylo v poměru 50:50. Pro zkrácení doby analýzy byl zvolen gradient eluce 0 – 25 min 50% (V/V) MF B, do 30 min 85% (V/V) MF B, 30 - 38 min 85% (V/V) MF B, do 40 min 50% (V/V) MF B, 40 - 41 min 50% (V/V) MF B.

Jako nejvhodnější rychlost průtoku mobilní fáze byl vyhodnocen $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Testovány byly ještě průtoky $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, které však nebyly tolik vhodné. Po nastavení optimálních podmínek separace došlo k vhodnému rozdělení látek, které je znázorněné na obrázku 2. Derivát diethylaminu byl na koloně KINETEX EVO - C18 eluován při retenčním čase 19,89 min. Další eluované látky byly produkty degradace nadbytku činidla.

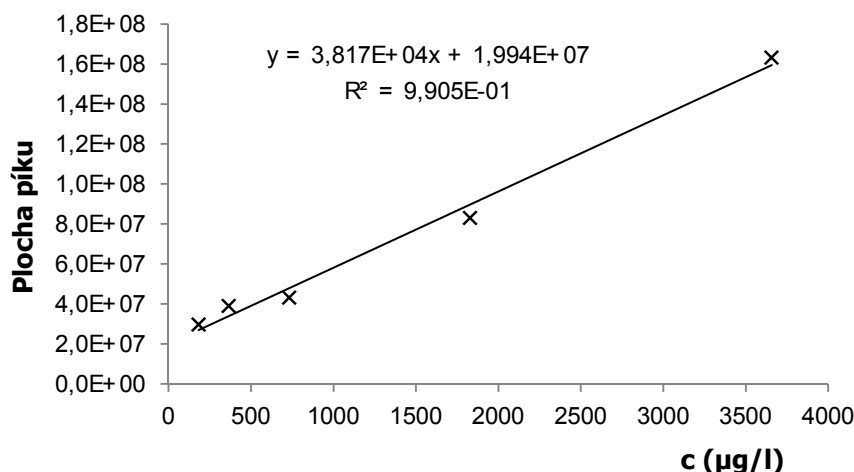


Obrázek 2: Chromatogram extraktu s koncentrací DEA $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

Kalibrace

Zásobní roztoky diethylaminu pro kalibrační řadu byly připraveny v koncentračním rozmezí třech řádů ($1 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$). U všech koncentrací byla provedena derivatizace s extrakcí. Deriváty byly následně proměřeny. U derivátů s koncentrací $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ a vyšší byl naměřený signál větší než rozsah detektoru, proto tyto hodnoty nebyly zahrnuty do kalibračního hodnocení a sloužily pouze k potvrzení eluce DEA-FMOC v daném čase.

Lineární část křivky byla vyhodnocena v rozmezí od $1 \cdot 10^{-6}$ až $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Pro zvýšení správnosti kalibrační křivky byly přidány koncentrace $2,5 \cdot 10^{-6}$ a $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Každá koncentrace byla proměřena třikrát. Byla provedena validace kalibrační závislosti. Podmínkou úspěšné validace je maximální odchylka nejnižšího do 20 % a ostatních do 15 %. Tento požadavek byl splněn.



Obrázek 3: Kalibrační graf pro diethylamin.

Linearita byla zhodnocena pomocí koeficientu determinace R^2 , který měl hodnotu 0,9905. Jako limit kvantifikace byla určena hodnota s nejnižší koncentrací. Limit detekce byl poté vypočten jako jedna třetina z limitu kvantifikace. Pro tuto metodu byl limit detekce stanovený na 61 $\mu\text{g/l}$ a limit kvantifikace na 183 $\mu\text{g/l}$.

ZÁVĚR

Derivatizační činidlo 9-(fluorenyl)ethylchloromravenčan bylo potvrzeno jako vhodné pro stanovení diethylaminu pomocí HPLC-FLD. Bylo však nutné odstranit nadbytek činidla. K odstranění byla využita extrakce kapalina-kapalina a jako extrakční činidlo byl vybrán hexan. Jako nejvhodnější stacionární fáze byla vybrána kolona KINETEX EVO - C18. Mobilní fáze byla složena ze směsi acetonitril – 0,03M acetátový pufr (pH 4), kdy pro vhodné dělení byla nastavena gradientová eluce. Z naměřených hodnot byla určena lineární část křivky, která měla rozsah přes dva koncentrační řády. Pomocí kalibrační křivky byl určen limit detekce a kvantifikace. Limit detekce byl 61 $\mu\text{g/l}$ a limit kvantifikace na 183 $\mu\text{g/l}$.

Tento projekt byl realizován za finanční podpory z prostředků státního rozpočtu prostřednictvím Ministerstva vnitra ČR a ve spolupráci s Kriminologickým ústavem Praha PČR – projekt VI20152020004.

LITERATURA

1. Daintith J.: *A dictionary of chemistry*. 6th ed., Oxford University Press, New York 2008.
2. Block E., Smith P.A.S.: *Amine*. Encyclopaedia Britannica Inc., 2016. Dostupné z: <http://academic.eb.com/EBchecked/topic/20665/amine>.
3. Fire F.L.: *The common sense approach to hazardous materials*. 3rd ed., PennWell Corporation, Tulsa 2009.
4. Zeman S., Vávra P.: Chem. Listy 104, 791 (2010).
5. Fanali S.: *Liquid chromatography - Applications*. Elsevier, Amsterdam 2013.

6. Lawrence J.F.: *Organic trace analysis by liquid chromatography*. Academic Press, Orlando 1981.
7. Stroka J., Capelletti C., Papadopoulou-Bouraoui A., Pallaroni L., Anklam E.: *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 25, 1821 (2002).
8. Creighton T.E.: *The biophysical chemistry of nucleic acids & proteins*. Helvetian Press, Milverton 2010.
9. Goodman M., Felix A., Moroder L., Toniolo C.: *Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry: Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*. George Thieme Verlag, Stuttgart 2004.
10. Verdú-Andrés J., Campíns-Falcó P., Herráez-Hernández R.: *Chromatographia* 55, 129 (2002).
11. Rodríguez López M., González Alvarez M.J., Miranda Ordieres A.J., Tuñón Blanco P.: *J. Chromatogr. A* 721, 231 (1996).