

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 305 127

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2010-845**  
(22) Přihlášeno: **16.11.2010**  
(40) Zveřejněno: **23.05.2012**  
**(Věstník č. 21/2012)**  
(47) Uděleno: **01.04.2015**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **13.05.2015**  
**(Věstník č. 19/2015)**

*G01N 21/01* (2006.01)  
*G01N 21/25* (2006.01)  
*G01N 21/75* (2006.01)  
*G01N 30/74* (2006.01)  
*G01N 30/88* (2006.01)  
*G01J 3/42* (2006.01)  
*C01G 3/00* (2006.01)  
*C01G 3/02* (2006.01)  
*C01G 3/12* (2006.01)  
*C07C 211/00* (2006.01)  
*C07C 229/00* (2006.01)  
*C07K 2/00* (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:  
Irth H. et al.: "Metallic copper-containing post-column reactor for the detection of thiram and disulfiram in liquid chromatography" J. Chrom. 1986, vol. 370, 439-447 (celý dokument); Irth H. et al.: "Determination of disulfiram and two of its metabolites in urine by reversed-phase liquid chromatography and spectrophotometric detection after post-column complexation" J. Chrom. 1988, vol. 424, str. 95-102 (celý dokument); Emara S. et al.: "Utility of copper(II) oxide as a packed reactor in flow injection assembly for rapid analysis of some angiotensin converting enzyme inhibitors" Anal. Chim. Acta 2003, vol. 489, str. 115-123 (celý dokument); Beisler A. T. et al.: "Analysis of the performance of a flow reactor for use with microcolumn HPLC" Anal. Chem. 2004, vol. 76, no. 3, str. 639-645 (celý dokument).

(73) Majitel patentu:  
Univerzita Karlova v Praze, Praha 1, CZ

(72) Původce:  
doc. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D., Praha 6, CZ  
Mgr. Anna Kubíčková, Praha 8, CZ  
RNDr. Vojtěch Kubíček, Ph.D., Praha 8, CZ  
Mgr. Martin Franc, Praha 6, CZ  
Mgr. Jiří Vojta, Praha 8, CZ  
doc. RNDr. Eva Tesařová, CSc., Praha 5, CZ  
doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc., Praha 6, CZ

(74) Zástupce:  
Hák Janeček & Švestka, Patentová a známková  
kancelář, RNDr. Roman Hák, U Průhonu 5, 170 00  
Praha 7

(54) Název vynálezu:  
**Postkolonová derivatizace tuhým  
derivatizačním činidlem v HPLC nebo CLC**

(57) Anotace:  
Řešení se týká detekce dusíkatých látek (aminokyseliny, peptidy, aminy a jejich deriváty) pomocí "on-line" postkolonové derivatizace tuhým derivatizačním činidlem (měď anebo nerozpustné sloučeniny mědi) pro spektrofotometrickou detekci v ultrafialové a viditelné (UV-VIS) oblasti spektra. Derivatizace tuhým činidlem a následná spektrofotometrická detekce je využitelná ve vysoce účinných separačních metodách, jako je vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapilární kapalinová chromatografie (CLC).

CZ 305127 B6

## Postkolonová derivatizace tuhým derivatizačním činidlem v HPLC nebo CLC

### Oblast techniky

5

Vynález se týká postkolonové derivatizace analytů tuhým derivatizačním činidlem pro spektrofotometrickou detekci v ultrafialové a viditelné (UV–VIS) oblasti spektra. Derivatizace tuhým činidlem a následná spektrofotometrická detekce je využitelná ve vysoce účinných separačních metodách, jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapilární kapalinová chromatografie (CLC).

10

### Dosavadní stav techniky

15

Vysoce účinné separační techniky, jako jsou HPLC a CLC, patří mezi nejrozšířenější metody analýzy látek v roztoku. Pro detekci látek byla vyvinuta řada metod. K často používaným typům detektorů patří spektrofotometrický UV–VIS detektor, hmotnostní (MS) detektor, fluorescenční (LIF) detektor, refraktometrický detektor, vodivostní detektor nebo detektor elektrochemický. Nejběžnějším a nejčastěji používaným detektorem v HPLC a CLC je spektrofotometrický detektor pracující v UV–VIS oblasti spektra, jehož výhodou je především univerzálnost a nízké pořizovací a provozní náklady. Dostatečnou citlivost však vykazuje pouze pro analyty, jejichž molekuly obsahují vhodné absorbující skupiny. Pro mnohé analyty, které neobsahují skupiny absorbující v dané oblasti spektra, je však tato metoda zcela nevhodná, popř. vyžaduje derivatizaci analytu, která bývá běžně spojena se ztrátou účinnosti a změnou selektivity separačního kroku. Ve spojení s HPLC lze použít jak předkolonovou derivatizaci (reakce analytu s derivatizačním činidlem před vlastní separací), tak postkolonovou derivatizaci (reakce s derivatizačním činidlem mezi výstupem z kolony a vstupem do detektoru). Derivatizace analytů se většinou provádí zařazením přídatné pumpy a reakční smyčky do HPLC systému, které slouží k dodávání derivatizačního činidla a jeho mísení s derivatizovanými analyty v HPLC systému. Obecným problémem derivatizace je zbytečné zředění a rozmytí zóny analytu, které vede ke snížení účinnosti separace a snížení rozlišení píků analyzovaných látek.

20

25

30

35

40

Látky ze skupiny aminokyselin a peptidů jsou významné díky své roli v živých systémech. Mnohé z těchto látek patří mezi ty, které jsou obtížně detekovatelné pomocí spektrofotometrického UV–VIS detektoru. Proto jsou pro jejich citlivou detekci využívány metody založené na nákladné instrumentaci (např. MS detekce), nebo je nutná jejich derivatizace (např. pro UV–VIS a LIF detekci). Další skupinou látek podobného typu, u nichž vznikají stejné problémy při detekci, jsou lineární a cyklické monoaminy a polyaminy a jejich deriváty. Tyto látky jsou významné díky svým koordinačním vlastnostem – schopností vazby iontů kovů (pro zjednodušení dalšího textu bude nadále tato skupina látek označována jako „aminy a jejich deriváty“).

45

Derivatizace aminokyselin popsané v patentových dokumentech byly zaměřeny dvěma směry. Dokument US 2008/0 050 827 A1 popisuje derivatizaci za účelem změny chování analyzovaných látek např. chromatografického chování nebo ionizovatelnosti, zatímco dokument US 6 800 486 B1 se týká derivatizace za účelem citlivější detekce. V obou uvedených případech se však jednalo pouze o „off–line“ předkolonovou derivatizaci, při níž derivatizační reakce probíhala před vlastní separací a detekcí, tedy mimo HPLC systém.

50

55

Vhodnou alternativou derivatizace v homogenní fázi může být pro mnohé aplikace využití tzv. „solid–state“ reaktorů, které byly dosud použity v průtokové injekční analýze (FIA). V takovém případě prochází analyt zónou s derivatizačním činidlem pevně ukotveným na tuhém nosiči v reaktoru. Využitím těchto reaktorů s tuhými derivatizačními činidly jsou výrazně potlačeny nevýhody derivatizace analytů pomocí derivatizačních činidel v roztoku, které byly zmíněny a popsány výše. Nejčastějším příkladem „solid–state“ reaktorů pro FIA jsou reaktory založené na enzymatické reakci. V několika případech speciálních aplikací, avšak pouze ve FIA a nikoliv

v HPLC, bylo též publikováno použití „solid–state“ reaktorů naplněných oxidem měďnatým (S. Emará, A. El–Gindy, A.–N. El–Shorbagi, G. Hadad, *Analytica Chimica Acta*, 489 (2003) 115–123) anebo ionty kovů a sloučeninami kovů složitě zachycených na různých podpůrných nosičích (V. G. Bonifacio, L. H. Marcolino–Junior, O. Fatibello–Filho, *Analytical Letters*, 37 (2004) 2111–2124, Y. F. Mestre, L. L. Zamora, J. M. Calatayud, *Analytica Chimica Acta*, 438 (2001) 93–102).

Pro HPLC aplikace doposud existuje jen málo publikovaných případů využití „solid–state“ reaktoru založeného na bázi sloučenin kovů, Irth et al. (H. Irth, G. J. De Jong, U. A. Th. Brinkman, R. W. Frei, *Journal of Chromatography*, 370 (1986) 439–447, Irth et al., *Journal of Chromatography*, 424 (1988) 95–102) použití „solid–state“ reaktoru plněný kovovou mědí pro HPLC analýzu, avšak pouze látek obsahujících síru. Tento reaktor se potýkal s výraznými problémy týkajícími se oxidace mědi. Z hlediska HPLC aplikace byla současně metoda silně limitována maximálním použitelným průtokem mobilní fáze (0,4 ml/min), což je pro moderní HPLC separace nedostatečné.

„On–line“ postkolonová derivatizace aminokyselin a dalších dusíkatých látek v HPLC pomocí „solid–state“ reaktoru naplněného kovovou mědí, oxidem měďnatým nebo jinými nerozpustnými sloučeninami mědi zatím nebyla v literatuře popsána.

#### Podstata vynálezu

Původci našli překvapivě výhodné řešení postkolonové derivatizace pro dusíkaté sloučeniny (např. aminokyseliny, peptidy, lineární a cyklické polyaminy a jejich deriváty, popřípadě další analyty, které vytvářejí komplexy s měďnatými kationy), které je jednoduché, levné a přitom poskytuje mimořádně vysokou citlivost detekce.

Podstatou vynálezu je nový způsob postkolonové derivatizace pomocí mědi a nerozpustných sloučenin mědi, jako je např. oxid měďnatý (CuO) nebo soli mědi, jako je např. sulfid měďnatý (CuS) a uhličitán měďnatý (CuCO<sub>3</sub>). Mnoho organických látek je díky přítomnosti donorových skupin schopno koordinovat měďnaté ionty. Při průchodu těchto látek „solid–state“ reaktorem obsahujícím měď nebo nerozpustnou sloučeninu mědi dochází k vytrhávání iontů kovu analyty z tuhé fáze a vzniku komplexů analytů s měďnatými ionty. Tyto komplexy pak vykazují výraznou absorpci v UV–VIS oblasti spektra, čímž se stávají v této oblasti spektra viditelnými, a tím je umožněna jejich účinná spektrofotometrická UV–VIS detekce s výrazně vyšší citlivostí. Tento způsob derivatizace analytů poskytuje reprodukovatelné výsledky umožňující citlivou detekci bez zhoršení parametrů separace jako je selektivita a účinnost.

Provedení způsobu podle vynálezu spočívá v derivatizaci separovaných analytů na tuhé fázi v postkolonovém reaktoru, který je naplněn nerozpustnou sloučeninou mědi. Postkolonový reaktor může být naplněn i jakoukoliv jejich směsí, tzn. směsí dvou či více nerozpustných sloučenin mědi. Termín „postkolonový“ znamená, že při analýze/měření je reaktor umístěn „on–line“ mezi separační kolonou s UV–VIS detektorem. V systému HPLC se výhodně jako postkolonový reaktor může užít například komerčně dostupná předkolona, případně jiná kolona vhodných vlastností. Takové předkolony, kolony a reaktory jsou odborníkům obecně známy. V systému CLC je tuhé derivatizační činidlo umístěno přímo uvnitř kapilární separační kolony na jejím výstupním konci za stacionární fází. V tomto provedení v jediné kapiláře lože derivatizačního činidla vytváří „on–line“ reaktor a současně zbývající část kapiláry naplněná stacionární fází tvoří separační kolonu. Obdobně je možné i v případě HPLC kolony vytvořit na jejím výstupním konci on–line reaktor jakožto lože derivatizačního činidla a zbývající objem kolony naplnit stacionární fází.

V případě využití solid-state postkolonové derivatizace v HPLC (CLC) musí mít reaktor dostatečně malý objem, aby bylo zajištěno, že nebude příliš přispívat k tlaku na výstupu z kolony, a bude tudíž možno používat běžné průtoky mobilní fáze (0,5 až 1 ml/min).

5 Výhodně se užije tuhé derivatizační činidlo ve formě granulátu. Obecně platí, že granulát s menším průměrem zrn může klást vyšší hydrodynamický odpor, zatímco granulát s větším průměrem zrn může negativně rozmývat zóny analyzovaných látek a snižovat tak separační účinnost. Rozsah použitelných velikostí částic granulátu je omezen nárůstem tlaku v separačním systému při použití příliš malých částic ( $d < 0,001$  mm,  $d$  je průměrná velikost částic, tj. průměru částic),  
10 zatímco použití velkých částic ( $d > 0,1$  mm) negativně přispívá k rozmývání zón analytů. V optimálním případě by velikost zrn granulátu měla být srovnatelná s velikostí zrn použité stacionární fáze. Při způsobu podle vynálezu je derivatizační činidlo vhodně ve formě granulátu o průměrné velikosti částic/zrn 0,001 až 0,030 mm, výhodně 0,003 až 0,010 mm.

15 Výhodou derivatizační metody podle vynálezu je především jednoduchost jejího provedení, neboť pro její realizaci není potřeba zapojovat do separačního systému další pumpu s reakční smyčkou. Při způsobu podle vynálezu k úspěšné derivatizaci postačuje využít reaktor o velmi malém vnitřním objemu, který téměř nepřispívá k rozmývání zón analytů a nepřispívá významně ke zvýšení tlaku a v celém separačním systému.

20 Předmětem předloženého vynálezu tedy je zejména způsob detekce dusíkatých látek vybraných ze skupiny, kterou tvoří aminokyseliny, peptidy a aminy UV-VIS spektrofotometrií v HPLC nebo CLC systému, spočívající v tom, že se dusíkatá látka derivatizuje „on-line“ v postkolonovém reaktoru obsahujícím tuhé derivatizační činidlo, kterým je oxid měďnatý, sulfid měďnatý,  
25 uhličitán měďnatý nebo jakákoliv jejich směs, a vzniklý derivát se následně detekuje UV-VIS spektrofotometrem.

Při způsobu podle vynálezu je derivatizační činidlo ve formě granulátu o průměrné velikosti zrn 0,001 až 0,030 mm, výhodně 0,003 až 0,010 mm.

30 Ve výhodném provedení způsobu podle vynálezu se jako postkolonový reaktor užije HPLC předkolona nebo jiná HPLC kolona, která se naplní derivatizačním činidlem.

35 V jiném výhodném provedení způsobu podle vynálezu se jako postkolonový reaktor užije výstupní konec CLC kapilární separační kolony, do kterého se za separační stacionární fází umístí lože derivatizačního činidla, které vymezuje postkolonový reaktor.

40 Dalším předmětem předloženého vynálezu je reaktor pro „on-line“ postkolonovou derivatizaci v HPLC nebo CLC systému při UV-VIS spektrofotometrické detekci dusíkatých látek vybraných ze skupiny, kterou tvoří aminokyseliny, peptidy a aminy, kde reaktorem je HPLC předkolona nebo jiná HPLC kolona, která je naplněna tuhým derivatizačním činidlem, nebo výstupní konec CLC kapilární separační kolony, ve kterém je za separační stacionární fází umístěno lože tuhého derivatizačního činidla, přičemž derivatizačním činidlem je oxid měďnatý, sulfid měďnatý, uhličitán měďnatý nebo jakákoliv jejich směs.

45 Reaktor ve výhodném provedení obsahuje derivatizační činidlo ve formě granulátu o průměrné velikosti zrn 0,001 až 0,030 mm, výhodně 0,003 až 0,010 mm.

## 50 Objasnění výkresů

Obr. 1: HPLC kolona 1 se „solid-state“ reaktorem 2, kterým je v tomto provedení předkolona naplněná tuhým derivatizačním činidlem, zařazená mezi HPLC kolonu (šipka znázorňuje směr průtoku kolonou) a UV-VIS detektor (není znázorněn na obrázku).

55

Obr. 2: CLC kolona (kapilára) 1 se „solid–state“ reaktorem 2, kterým je koncová (výstupní) část kolony naplněná tuhým derivatizačním činidlem (šipka znázorňuje směr průtoku kolonou).

Obr. 3: Eluční křivky aminokyseliny valinu nadávkované do HPLC systému a detekované UV–VIS detektorem bez použití postkolonové derivatizace (graf A) a s použitím postkolonové derivatizace oxidem měďnatým (graf B).

Obr. 4: HPLC kalibrační závislosti pro aminokyselinu valin z experimentálních bodů získaných bez použití postkolonové derivatizace (body  $\diamond$ ), s použitím postkolonové derivatizace mědí (body  $\square$ ) a s použitím postkolonové derivatizace oxidem měďnatým (body  $\Delta$ ).

### Příklady uskutečnění vynálezu

Derivatizace byla realizována s mědí a jejími nerozpustnými sloučeninami ( $\text{CuO}$ ,  $\text{CuS}$  a  $\text{CuCO}_3$ ), a to jak při použití HPLC, tak i CLC. Použitá derivatizační činidla byla ve formě granulátu o průměrné velikosti zrn 0,005 až 0,030 mm. Aby byl zajištěn definovaný povrch derivatizačního činidla, byla použita měď připravená redukcí měďnatých solí hliníkem a uchovávána pod inertní atmosférou. Nerozpustné sloučeniny mědi byly získány z komerčních zdrojů (Merk, Německo nebo Sigma Aldrich, USA).

K ověření účinnosti způsobu podle vynálezu byly použity aminokyseliny L–valin, L–leucin, L–serin, L–fenylalanin, dále dipeptid Gly–Gly jako zástupce peptidů. Dále byl vynález testován pro detekci nejběžnějších chelatačních činidel využívaných mj. pro medicínské aplikace – kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), a tzv. polydentálních ligandů – kyselina 1,4,7,10–tetraazacyklododekan–1,4,7,10–tetraoctová (DOTA) a kyselina–1,4,7,10–tetraazacyklododekan–1,4,7–trioctová (DO3A). Všechny použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Merck (Německo) nebo Sigma Aldrich (USA) v čistotě min. 98%, pouze DOTA a DO3A byly syntetizovány podle postupů popsanych v literatuře na pracovišti původců.

Použité analyty představují typické zástupce jednotlivých skupin látek (aminokyseliny, peptidy, aminy a jejich deriváty), jejichž koordinační vlastnosti byly již dříve rozsáhle studovány a které vykazují (v rámci dané skupiny látek) srovnatelné konstanty stability komplexů s měďnatými ionty. Proto lze s jistotou tvrdit, že pozorovaný jev je obecného charakteru, a tudíž lze oprávněně očekávat, že ostatní zástupci těchto skupin látek budou vykazovat srovnatelné chování.

Pro snazší orientaci uvádíme přehled zkratk sloučenin použitých v příkladech:

Val: L–valin,

Leu: L–leucin,

Ser: L–serin,

Phe: L–fenylalanin

Gly–Gly: dipeptid glycylglycin

EDTA: kyselina ethylendiamintetraoctová

DOTA: kyselina 1,4,7,10–tetraazacyklododekan–1,4,7,10–tetraoctová

DO3A: kyselina–1,4,7,10–tetraazacyklododekan–1,4,7–trioctová

### Příklad 1

HPLC

V HPLC systému byla ve funkci „solid–state“ derivatizačního reaktoru užita komerčně dostupná předkolona 2 (Merck nebo Supelco, vnitřní průměr 4 mm, délka 4 mm) naplněná derivatizačním činidlem  $\text{CuO}$  nebo mědí nebo směsí mědi a  $\text{CuO}$  nebo směsí mědi a inertního materiálu (HPLC sorbent) a byla připojena k výstupními konci separační kolony 1 před spektrofotometrický detek-

tor, jak je naznačeno na obr. 1. Suché derivatizační činidlo bylo nasypáno do prázdné předkolony a upěchováno pomocí skleněné tyčinky tak, aby jím byl vyplněn celý objem předkolony.

Měření byla prováděna na kapalinovém chromatografu, který se skládal z gradientového čerpadla Beta 10 (Ecom, ČR), on-line degaseru, mixovací komory (Knauer, Německo) a dávkovacího ventilu s 0,010 ml smyčkou (Ecom, ČR). Detekce byla prováděna spektrofotometrickým UV detektorem LCD 2084 (Ecom, ČR) při vlnové délce 230 nm. K měření byla použita separační kolona 1 LiChroCART Lichrospher C18e column, 150x 4,6 mm délka a vnitřní průměr, průměr částic 0,005 mm, Merck (Darmstadt, Německo). Mobilní fázi tvořila směs methanolu v čistotě pro HPLC (Supelco, USA) a deionizované vody v poměru 10/90 objemových dílů. Testován byl průtok mobilní fáze v rozmezí 0,5 až 0,8 cm<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup>. Získaná data byla zpracována softwarem CSW 1.7 (DataApex, ČR).

Systém HPLC s tuhým derivatizačním činidlem CuO nebo mědi byl testován pro analýzu základní aminokyseliny L-valinu a bylo zjištěno, že derivatizace tuhým CuO nebo mědi významně zvyšuje odezvu aminokyselin ve spektrofotometrickém detektoru, čímž se tento detektor stává vůči těmto analytům výrazně citlivějším. Aminokyseliny, peptidy a uvedená chelatační činidla vytvářejí s měďnatými ionty komplexy s přenosem náboje (tzv. charge-transfer komplexy), které vykazují intenzivnější absorpční pásy v US-VIS oblasti spektra než samotné nekomplexované ligandy, čímž obecně dochází ke zvýšení citlivosti jejich detekce UV-VIS detektorem.

Na obrázku 3 jsou znázorněny eluční křivky L-valinu o koncentraci 1 mmol.dm<sup>-3</sup> získané v HPLC systému bez postkolonové derivatizace (panel A) a s postkolonovou derivatizací CuO (panel B). Z porovnání výšek obou píků je patrný výrazný nárůst citlivosti detekce UV-VIS pro valin (koncentrace 1 mmol.dm<sup>-3</sup>) při 230 nm získaný postkolonovou derivatizací valinu v „solid-state“ reaktoru naplněném CuO.

Na obrázku 4 jsou vyneseny kalibrační závislosti pro L-valin změřené v HPLC systému při 230 nm bez použití (◇, kosočtverce) postkolonové derivatizace a za použití „on-line“ postkolonové derivatizace v „solid-state“ reaktoru naplněném CuO (Δ, trojúhelníky) nebo mědi (□, čtverce). Směrnice kalibrační závislosti bez použití postkolonové derivatizace je 3 mV.s.dm<sup>-3</sup>.mmol<sup>-1</sup>. Směrnice kalibrační závislosti s použitím postkolonové derivatizace činí 216 mV.s.dm<sup>3</sup>.mmol<sup>-1</sup> pro CuO a 187 mV.s.dm<sup>3</sup>.mmol<sup>-1</sup> pro měď. Pro L-valin při 230 nm je tedy detekce s postkolonovou derivatizací CuO 72krát citlivější než detekce realizovaná bez použití postkolonové derivatizace. Postkolonová derivatizace práškovou mědí (granulát o velikosti zrn r = 0,005 až 0,030 mm) je sice méně citlivá než derivatizace pomocí CuO, ale i tak je citlivost detekce 62krát větší než bez použití derivatizačního činidla.

V HPLC systému bylo s jednou naplněnou předkolonou provedeno 100 analýz bez znatelného poklesu citlivosti detekce, což svědčí o značně vysoké derivatizační kapacitě „solid-state“ reaktoru pro derivatizaci dusíkatých látek. Relativní směrodatná odchylka plochy píku deseti po sobě jdoucích měření se pohybovala kolem 3 %, což je hodnota srovnatelná s relativní směrodatnou odchylkou detekce bez derivatizačního kroku.

45

## Příklad 2

V HPLC systému dle příkladu 1 bylo testováno chování aminokyselin (L-valin, L-leucin, L-serin, L-fenylalanin) a dalších dusíkatých látek (dipeptidu Gly-Gly, chelatačních činidel EDTA, DOTA, DO3A) a bylo zjištěno, že derivatizace tuhým CuO nebo mědi významně zvyšuje odezvu všech uvedených analytů ve spektrofotometrickém detektoru, čímž se tento detektor stává vůči těmto analytům výrazně citlivějším. Vysvětlení jevu a jeho detailní popis je shodný jako v příkladu 1. Nárůst citlivosti metody pro jednotlivé analyty je shrnut v tabulce 1.

50

Tabulka 1. Citlivost metody pro jednotlivé analyty. Hodnoty udávají nárůst signálu analytu při použití derivatizačního činidla vyjádřený jako poměr ploch píků měření s derivatizačním činidlem a bez derivatizačního činidla.

Analyt	Cu	CuO
Val	39	110
Leu	44	89
Phe	14	29
Ser	40	75
Gly–Gly	62	138
DOTA	15	31
DO3A	22	33
EDTA	83	166

### Příklad 3

V HPLC systému popsaném v příkladu 1 byla použita další derivatizační činidla: CuS a CuCO<sub>3</sub>, s nimiž byla provedena analogická měření a detekce pomocí UV–VIS. Experimenty ukázaly, že signál získaný pro testované analyty z příkladu 2 je při použití CuCO<sub>3</sub> jako derivatizačního činidla srovnatelný se signálem získaným postkolonovou derivatizací CuO. Při použití CuS došlo k dalšímu nárůstu signálu ve srovnání s CuCO<sub>3</sub>. Citlivost metody pro jednotlivá derivatizační činidla je shrnuta v Tabulce 2.

Tabulka 2. Citlivost metody pro jednotlivá derivatizační činidla. Hodnoty udávají nárůst signálu analytu při použití derivatizačního činidla vyjádřený jako poměr ploch píků (viz tab. 1).

Analyt	Cu	CuO	CuCO <sub>3</sub>	CuS
Val	39	110	105	132
Ser	40	75	74	99
Gly–Gly	62	138	125	143
DOTA	15	31	36	48
EDTA	83	166	182	225

### Příklad 4

#### CLC

V CLC systému bylo lože 2 tuhého CuO o délce 1 až 2 mm s funkcí „solid–state“ reaktoru umístěno do výstupního konce kapilární separační kolony 1 za stacionární fází, jak ukazuje obr. 2.

Měření byla prováděna na mikrokapalinovém chromatografu, který se skládal z lineárního čerpadla Pump MHPP20 (Laboratorní přístroje Praha, ČR), dávkovacího ventilu Valco C14W (Vici AG, Švýcarsko) o objemu 60 nl a spektrofotometrického detektoru Spectra 100 (Thermo Separation Products, USA). Získaná data byla zpracována softwarem Clarity verze 2.3.0 (Data Apex, ČR). Měření se prováděla na křemenné kapilární koloně 1 (0,320 mm vnitřní průměr, Supelco, USA), která byla naplněna metodou „slurry–packing“ stacionární fází Nucleosil C18 (Macherey – Nagel, Německo) o velikosti částic 0,005 mm. Na konci kapiláry bylo vytvořeno lože 2 z CuO o výšce sloupce 1 až 2 mm. Mobilní fází tvořila směs methanolu v čistotě pro HPLC (Supelco, USA) a deionizované vody v poměru 5/95 objemových dílů. Průtok mobilní fáze byl 0,004 cm<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup>.

5 Systém CLC s tuhým derivatizačním činidlem byl testován pro analýzu několika základních aminokyselin (L–valin, L–leucin, L–serin, L–fenylalanin), peptidu Gly–Gly a polydentálních ligandů DOTA a DO3A a bylo zjištěno, že derivatizace tuhým CuO významně zvyšuje odezvu všech situovaných látek z Příkladu 2 ve spektrofotometrickém detektoru. V CLC systému bylo s jedním  
10 ložem CuO provedeno 100 analýz bez znatelného poklesu citlivosti detekce, což svědčí o značně vysoké derivatizační kapacitě „solid–state“ reaktoru pro derivatizaci dusíkatých látek. Relativní směrodatná odchylka plochy píku deseti po sobě jdoucích měření se pohybovala kolem 3 %, což je hodnota srovnatelná s relativní směrodatnou odchylkou detekce bez derivatizačního kroku.

#### 10 Příklad 5

V CLC systému podle příkladu 3 byla použita další derivatizační činidla – nerozpustné soli mědi CuS a CuCO<sub>3</sub>. Experimenty jednoznačně prokázaly výrazné zvýšení citlivosti detekce srovnatelné s odpovídajícími hodnotami v příkladu 3.  
15

#### Průmyslová využitelnost

20 Popsaný způsob „on–line“ postkolonové derivatizace tuhým derivatizačním činidlem reprezentuje díky jednoduchosti provedení a nízkým finančním nákladům vhodnou metodu detekce při analýze mnoha dusíkatých látek pomocí HPLC a CLC v kombinaci se spektrofotometrickým UV–VIS detektorem. Způsob je vhodný pro všechny obtížně detekovatelné dusíkaté látky vytvářející komplexy s měďnatými ionty, neboť tyto komplexy jsou obecně detekovatelné s větší citlivostí  
25 spektrofotometrickým UV–VIS detektorem. Popsaný způsob detekce byl experimentálně ověřen pro aminokyseliny (L–valin, L–leucin, L–tyrosin, L–fenylalanin), peptidy (Gly–Gly) a pro aminy (EDTA, DOTA, DO3A). Vzhledem k rozšíření HPLC v komerčních analytických laboratořích a vzhledem k jednoduchosti provedení, nízkým nákladům a široké paletě analytů, pro něž lze navržený způsob derivatizace použít, lze předpokládat též široké využití předkládaného vynálezu.  
30

## 35 PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob detekce dusíkatých látek vybraných ze skupiny, kterou tvoří aminokyseliny, peptidy a aminy, UV–VIS spektrofotometrií v HPLC nebo CLC systému, **vyznačující se tím**, že se dusíkatá látka derivatizuje „on–line“ v postkolonovém reaktoru obsahujícím tuhé derivatizační činidlo, kterým je oxid měďnatý, sulfid měďnatý, uhličitán měďnatý nebo jakákoliv jejich směs, a vzniklý derivát se následně detekuje UV–VIS spektrofotometrem.  
40

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že derivatizační činidlo je ve formě granulátu o průměrné velikosti zrn 0,001 až 0,030 mm, výhodně 0,003 až 0,010 mm.  
45

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že se jako postkolonový reaktor užije HPLC předkolona nebo jiná HPLC kolona, která se naplní derivatizačním činidlem.

4. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že se jako postkolonový reaktor užije výstupní konec CLC kapilární separační kolony, do kterého se za separační stacionární fázi umístí lože derivatizačního činidla, které vymezuje postkolonový reaktor.  
50

5. Reaktor pro „on–line“ postkolonovou derivatizaci v HPLC nebo CLC systému při UV–VIS spektrofotometrické detekci dusíkatých látek vybraných ze skupiny, kterou tvoří aminokyseliny, peptidy a aminy, **vyznačující se tím**, že reaktorem je HPLC předkolona nebo jiná  
55



HPLC kolona, která je naplněna tuhým derivatizačním činidlem, nebo výstupní konec CLC kapilární separační kolony, ve kterém je za separační stacionární fází umístěno lože tuhého derivatizačního činidla, přičemž derivatizačním činidlem je oxid měďnatý, sulfid měďnatý, uhličitan měďnatý nebo jakákoliv jejich směs.

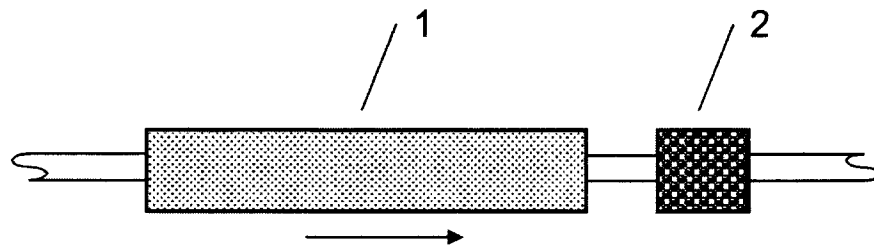
5

**6.** Reaktor podle nároku 5, **v y z n a ě u j í í s e t í m**, že derivatizační činidlo je ve formě granulátu o průměrné velikosti zrn 0,001 až 0,030 mm, výhodně 0,003 až 0,010 mm.

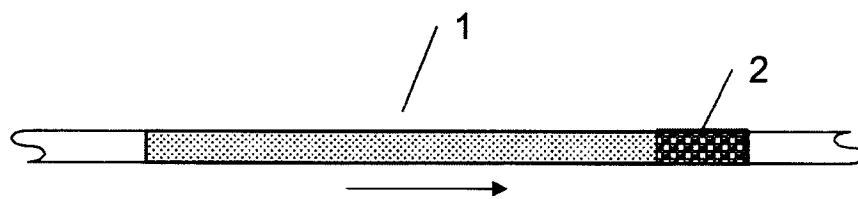
10

2 výkresy

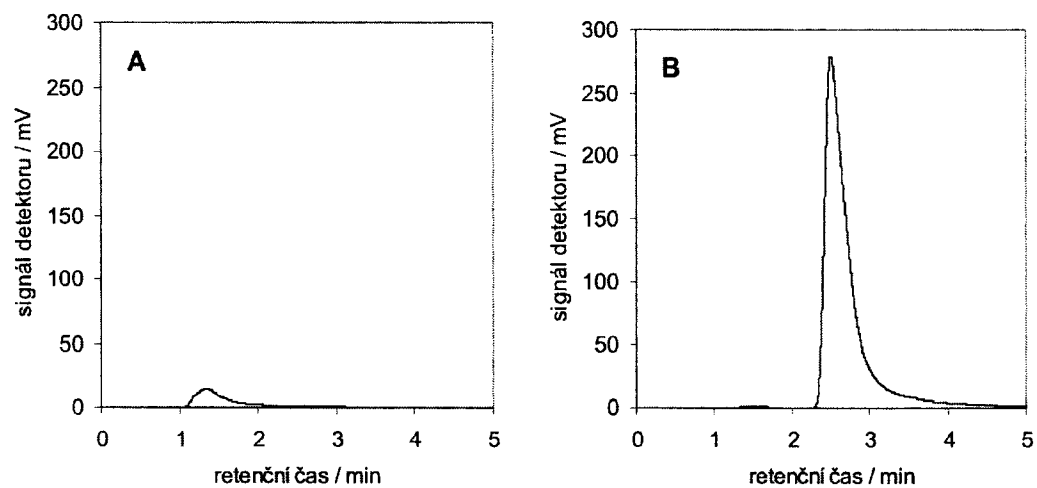
**Obr. 1**



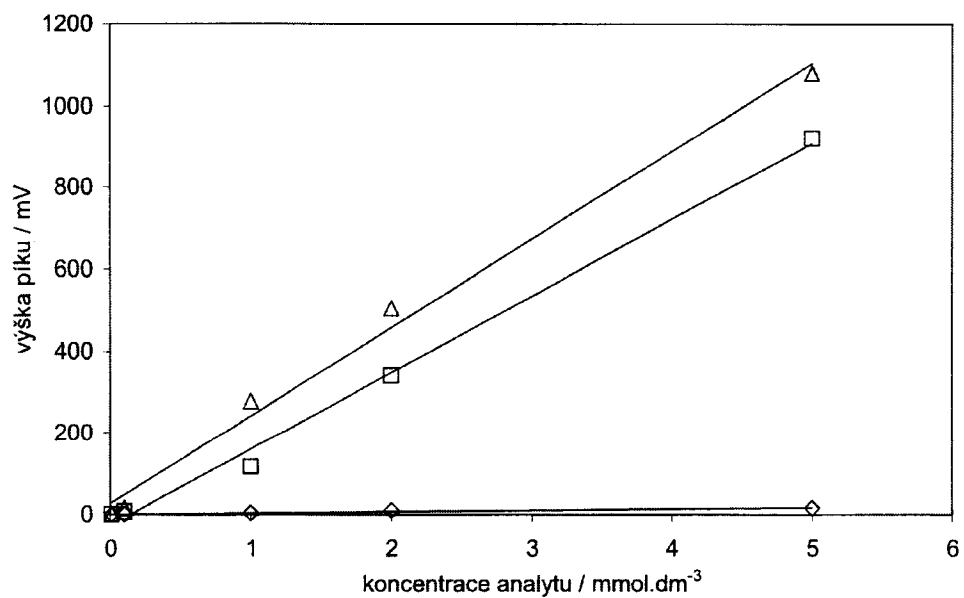
**Obr. 2**



Obr. 3



Obr. 4



---

Konec dokumentu

---