

G01N 30/88 (2006.01)
B01D 15/38 (2006.01)
B01J 20/32 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2017-193
(22) Přihlášeno: 06.04.2017
(40) Zveřejněno: 13.06.2018
(Věstník č. 24/2018)
(47) Uděleno: 02.05.2018
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 13.06.2018
(Věstník č. 24/2018)

(56) Relevantní dokumenty:

US 2016-0 122 368 A1; US 2006/0 054 559 A1.

(73) Majitel patentu:
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Praha 6, Dejvice, CZ
Universität Wien, Vienna 1010, AT

(72) Původce:
Ing. Michal Kohout, Ph.D., Praha 10, Strašnice, CZ
Denise Wolrab, 1030 Vienna, AT

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Na bělidle 64/3, 150 00 Praha 5,
Smíchov

(54) Název vynálezu:
**Multimodální stacionární fáze pro
kapalinovou chromatografii, způsob jejich
přípravy a jejich použití**

(57) Anotace:
Předkládané řešení se týká multimodální stacionární fáze pro kapalinovou chromatografii obecného vzorce I a nosič stacionární fáze je vybrán ze skupiny sestávající z komerčně dostupných nebo laboratorně připravených anorganických částicových materiálů o velikosti částic od 1,5 do 10 µm a velikosti pórů od 9 do 20 nm, standardně používaných jako inertní nosiče v kapalinové chromatografii pro chemické ukotvení selektoru. Předkládané řešení se dále týká způsobu přípravy multimodální stacionární fáze a jejího použití.

Multimodální stacionární fáze pro kapalinovou chromatografii, způsob jejich přípravy a jejich použití

5 Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká multimodálních stacionárních fází pro kapalinovou chromatografii, způsobu jejich přípravy a jejich použití v různých chromatografických módech a jako sorbentu pro extrakci na pevné fázi. Jejich struktura zajišťuje různou kvalitu hydrofobních interakcí selektorů a charakter selektoru (silný katex, zwitteriontový ionex). Stacionární fáze lze použít ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) i superkritické fluidní chromatografii (SFC) a jejich variantách, v širokém rozsahu chromatografických módů.

15 Dosavadní stav techniky

Jednou z nejvýznamnějších aplikačních oblastí HPLC je díky širokému aplikačnímu rozsahu chromatografie na reverzní fázi (Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography; RP-HPLC). Tento chromatografický mód je vhodný pro široké spektrum analytů, od malých organických molekul přes biologicky aktivní látky a jejich metabolity až po peptidy (T. Zhang, D. G. Watson, *Current Metabolomics* 1 (2013) 58). V tomto případě je separace založena na hydrofobních interakcích analytů s nepolární stacionární fází. Z toho důvodu jsou však polární nebo ionizované analyty buď velmi špatně (anebo vůbec) separovány (M. Lämmerhofer, M. Richter, J. Wu, R. Nogueira, W. Bicker, W. Lindner, *Journal of Separation Science* 31 (2008) 2572). Alternativou v případě polárních analytů je použití chromatografie hydrofilních interakcí (Hydrophilic Interaction Chromatography; HILIC), kdy je použita polární stacionární fáze a pufrovaná mobilní fáze bohatá na organickou složku (zpravidla acetonitril) s malým množstvím vody. Separace analytů je pak založena na partičním mechanismu, tj. migraci analytu z mobilní fáze do povrchové vrstvy vody adsorbované na polárním povrchu stacionární fáze, následné interakci se stacionární fází a migraci zpět do mobilní fáze (M.R. Gama, R.G. da Costa Silva, C.H. Collins, C.B.G. Bottoli, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 37 (2012) 48). Je zřejmé, že HILIC mód je velmi obtížně použitelný pro látky nepolární, které nejsou na HILIC fázích zadrženy a jsou zpravidla eluovány v mrtvém čase kolony. Nabité analyty lze pak s výhodou separovat v polárním organickém módu, tj. za použití polární mobilní fáze (např. methanolu, směsi methanolu s acetonitrem, atd.) s odpovídajícím pufrem na stacionárních fázích iontové povahy (ionexech; IEX). V tomto případě se využívá komplementarity funkčních skupin selektoru stacionární fáze s funkčními skupinami analytu, kdy primární interakcí zodpovědnou za retenci analytu je přitažlivá síla mezi opačně nabitými funkčními skupinami selektoru a analytu (M. Lämmerhofer, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 814; M. Lämmerhofer, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (2014) 6095). Ionexy lze zpravidla použít i v reverzní fázi, avšak nepolární a neionizující látky jsou na tomto typu stacionárních fází jen velmi obtížně separovatelné.

Pro separaci směsi různě polárních, nepolárních a iontových analytů je tak nutné použít postupně několik různých stacionárních fází a separačních metod, což je příčinou zdlouhavého procesu separace analytů a velké spotřeby mobilních fází, čímž vzrůstá časová i finanční nákladnost separace.

Proto byly, na rozdíl od stacionárních fází typu RP, HILIC či IEX, které využívají hydrofobní, hydrofilní či elektrostatické interakce, vyvinuty tzv. multimodální stacionární fáze, kombinující alespoň dva tyto interakční módy. Multimodální chromatografie tedy umožňuje separaci látek, které nejsou na výše uvedených stacionárních fázích separovány anebo vůbec zadrženy. Díky těmto vlastnostem popularita multimodálních fází neustále vzrůstá, a to zejména v oblasti separace polárních a nabitých analytů či purifikace komplexních maticí. Základní typy multimodálních stacionárních fází (RP-HILIC, RP-IEX, HILIC-IEX, atd.), přístupy k jejich

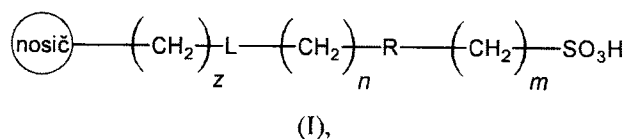
syntéze a chromatografické použití jsou sumarizovány v recentních přehledných člancích (L. Wang, W. Wei, Z. Xia, X. Jie, Z.Z. Xia, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 80 (2016) 495; K. Zhang, X. Liu, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 128 (2016) 73; L. Zhang, Q. Dai, X. Qiao, C. Yu, X. Qin, H. Yan, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 82 (2016) 143).

5 Převážná většina těchto materiálů je však určena pro HPLC separace v módu reverzní fáze a jejich využití v jiných chromatografických módech či superkritické fluidní chromatografii (Supercritical Fluid Chromatography; SFC) může být problematické.

10 Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká multimodální stacionární fáze, obsahující nosič a selektor, přičemž selektor kombinuje dva segmenty tvořené alifatickými řetězci a oddělené heteroatomem, s terminální polární (sulfonovou) skupinou. Ionizovatelná polární skupina a ionizovatelný heteroatom ve struktuře selektoru multimodální stacionární fáze umožňuje její použití v polárním organickém módu. V závislosti na délce alifatických řetězců je charakter stacionární fáze posouván více do oblasti HILIC módu (kratší řetězce) nebo RP módu (delší řetězce). Přesná hranice však není stanovena a jednotlivé stacionární fáze lze používat bez omezení v obou chromatografických módech, v závislosti na použité mobilní fázi. Je-li heteroatomem dusík či substituovaný dusík, nabývají stacionární fáze zwitteriontové povahy s anoxovým centrem na atomu dusíku a katexovým centrem tvořeným sulfonovou skupinou. Je-li heteroatomem kyslík či síra (i oxidovaná ve formě sulfoxidu či sulfonu), mají stacionární fáze povahu katexu. Příprava stacionární fáze vychází z nukleofilního otevírání sulfonového kruhu vhodným alkoholátem či thiolátem (alkoholem či thiolem), aminem případně jeho vhodnou solí za tvorby základní struktury s dvěma alkylovými řetězci, terminální sulfonovou skupinou na straně jedné a terminální trojnou vazbou na straně druhé. Následuje reakce mezi azidovými jednotkami nosiče a terminální trojnou vazbou. Nosičem, na kterém je selektor imobilizován, je s výhodou silikagel, modifikovaný azidovými skupinami. Výslednou multimodální stacionární fázi podle předkládaného vynálezu lze následně plnit do chromatografických kolon libovolné délky a průměru a použít při vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) a/nebo superkritické fluidní chromatografii (SFC) a jejích variantách, a to v širokém rozsahu chromatografických módů. Materiál lze rovněž využít jako sorbent pro solid phase extraction (SPE), a to jak imobilizovaný na silikagel, tak na polystyren a jiné nosiče.

35 Předmětem předkládaného vynálezu je multimodální stacionární fáze pro kapalinovou chromatografii obecného vzorce I



40 kde

R je $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, sulfoxid ($-\text{SO}-$), sulfon ($-\text{SO}_2-$) nebo $-\text{N}(\text{R}^1)-$;

přičemž R^1 je vybrané ze skupiny sestávající z H, (C1 až C6)alkylu, (C2 až C6)alkenylu, (C2 až C6)alkynylu, (C6 až C8)arylu, s výhodou je R^1 vybrané ze skupiny sestávající z H, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, allylu, propargylu, benzylu a fenylu;

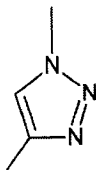
n je celé číslo v rozmezí od 3 do 11;

m je celé číslo v rozmezí od 2 do 5;

z je celé číslo v rozmezí od 2 do 5;

L je triazolová skupina vzorce II

50

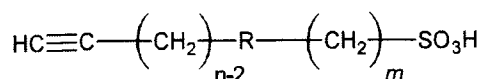


(II);

a nosič stacionární fáze je vybráný ze skupiny sestávající z komerčně dostupných nebo laboratorně připravených anorganických částicových materiálů o velikosti částic od 1,5 do 10 μm a velikosti pórů od 9 nm do 20 nm, nejvýhodněji 12 nm, standardně používaných jako inertní nosiče v kapalinové chromatografii pro chemické ukotvení selektoru, s výhodou je nosičem silikagel (SiO₂), alumina (Al₂O₃), ZrO₂, TiO₂, a zeolity, zejména MCM-48, polystyrénové částice, částice s povrchově porézní vrstvou s pevným jádrem (v dané oblasti techniky běžně nazývané "core-shell" částice) o velikosti od 1,6 do 5 μm s různou tloušťkou povrchově porézní vrstvy a velikostí pórů (R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang, *Journal of Chromatography A* 1357 (2014) 36). Nejvýhodněji je nosičem silikagel.

Předmětem předkládaného vynálezu je rovněž způsob přípravy multimodální stacionární fáze pro kapalinovou chromatografii podle předkládaného vynálezu, který obsahuje následující kroky:

a) připraví se selektor obecného vzorce III



(III),

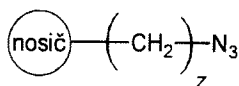
obsahující ve své struktuře terminální trojnou vazbu, kde n je celé číslo v rozmezí od 3 do 11, m je celé číslo v rozmezí od 2 do 5 a R je -O-, -S-, -SO-, -SO₂- nebo -N(R¹)-;

příčemž R¹ je vybráné ze skupiny sestávající z H, (C1 až C6)alkylu, (C2 až C6)alkenylu, (C2 až C6)alkynylu, (C6 až C8)arylu, s výhodou je R¹ vybráné ze skupiny sestávající z H, -CH₃-, -CH₂CH₃, allylu, propargylu, benzylu a fenylu;

tak, že se (C3 až C11)alkenolát nebo (C3 až C11)alkynolát nebo (C3 až C11)alkenthionolát nebo (C3 až C11)alkynthionolát nebo (C3 až C11)alkenylamin nebo (C3 až C11)alkynylamin, který má násobnou vazbu na opačném konci uhlíkového řetězce než heteroatom, podrobí reakci s (C2 až C5)sultonem, případně se výsledný selektor, který obsahuje R = -S-, dále oxiduje prostou nebo katalyzovanou oxidací vzdušným kyslíkem nebo peroxidem vodíku na R = -SO- a/nebo -SO₂-; příčemž katalyzátorem pro oxidaci na sulfoxid (-SO-) je s výhodou flavinový katalyzátor (R. Cibulka, *European Journal of Organic Chemistry* 2015, 915), oxidace na sulfon (-SO₂-) se provede peroxidem vodíku ve vodném prostředí;

b) selektor obecného vzorce III se imobilizuje na nosič, vybráný ze skupiny sestávající z anorganických částicových materiálů o velikosti částic od 1,5 do 10 μm a velikosti pórů od 9 nm do 20 nm, nejvýhodněji 12 nm, standardně používaných jako inertní nosiče v kapalinové chromatografii pro chemické ukotvení selektoru, tak, že nosič, který je modifikovaný azidoalkylovými skupinami o počtu uhlíkových atomů v alkylenovém řetězci od 2 do 5, reaguje se selektorem obecného vzorce III za vzniku multimodální stacionární fáze obecného vzorce I. S výhodou je nosič modifikovaný 3-azidopropylovými skupinami. S výhodou je selektor obecného vzorce III imobilizován na povrch nosiče v množství od 100 μmol/g do 600 μmol/g nosiče. S výhodou je nosičem silikagel (SiO₂), alumina (Al₂O₃), ZrO₂, TiO₂, a zeolit, zejména MCM-48, core-shell částice o velikosti 1,6 do 5 μm, nejvýhodněji je nosičem silikagel.

Ve výhodném provedení je krokem b) Huisgenova dipolární cykloadiční reakce mezi terminální trojnou vazbou selektoru obecného vzorce III a azidovou skupinou látky obecného vzorce III,



(IV),

kde z je celé číslo v rozmezí od 2 do 5,

přičemž látka obecného vzorce IV se připraví dle některého z obecně známých postupů (např. K. M. Kacprzak, N. M. Maier, W. Lindner *Tetrahedron Letters* 47 (2006) 8721).

Ve výhodném provedení proběhne reakce (C3 až C11)alkenolátu nebo (C3 až C11)alkynolátu nebo (C3 až C11)alkenthioalátu nebo (C3 až C11)alkynthioalátu nebo (C3 až C11)alkenylaminu nebo (C3 až C11)alkynylaminu, který má násobnou vazbu na opačném konci uhlíkového řetězce než heteroatom, s (C2 až C5)sultonem v kroku a) při teplotě alespoň 50 °C a v atmosféře inertního plynu po dobu alespoň 10 hodin. Výhodněji je teplota v rozmezí od 50 °C do bodu varu použitého rozpouštědla (s výhodou tetrahydrofuran, acetonitril, *N,N*-dimethylformamid), ještě výhodněji je teplota v rozmezí od 60 °C do 80 °C, nejvýhodněji je teplota 60 °C. Inertním plynem je s výhodou N₂ nebo Ar. Doba reakce je s výhodou 12 hodin.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále použití multimodální stacionární fáze podle předkládaného vynálezu pro chromatografickou separaci a purifikaci látek v polárním organickém módu, na reverzní fázi, při chromatografii hydrofilních interakcí a při superkritické fluidní chromatografii.

Předmětem předkládaného vynálezu je rovněž použití multimodální stacionární fáze podle předkládaného vynálezu jako sorbentu pro extrakci na pevné fázi (solid phase extraction, SPE).

Objasnění výkresů

Obr. 1: PCA analýza hodnot log k analytů na testovaných kolonách (SCX 1–3 a ZWIX 1–3) za použití polárního organického módu.

Obr. 2: PCA analýza log k analytů na nových multimodálních stacionárních fázích (SCX 1–3 a ZWIX 1–3) v módu reverzní fáze.

Obr. 3: Výsledky PCA analýzy pro log k testovaných analytů na jednotlivých stacionárních fázích (SCX 1–3 a ZWIX 1–3) v HILIC módu.

Obr. 4: Výsledky PCA analýzy hodnot log k analytů na nových multimodálních stacionárních fázích (SCX 1–3 a ZWIX 1–3) v SFC módu.

Obr. 5: Proložení 15 po sobě jdoucích nástřiků separace standardní směsi metabolitů tryptofanové metabolické dráhy na koloně SCX 3 v SFC–MS/MS módu.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: Syntéza vybraných selektorů

4-Allyloxybutan-1-sulfová kyselina (SCX 1) – není předmětem vynálezu

Do tříhrdlé baňky důkladně promyté inertním plynem byl předložen prop-2-en-1-ol (18,8 mmol) a rozpuštěn v suchém tetrahydrofuranu (30 ml). K roztoku (ochlazenému na 0 °C)

byla po částech přidána suspenze hydridu sodného (60% v minerálním oleji) a reakční směs byla míchána 1 h při laboratorní teplotě. Poté byla reakční směs ochlazená na 0 °C a byl přikapán butan-1,4-sulton (25,4 mmol). Chladicí lázeň byla odstavena a reakční směs zahřívána na 60 °C v atmosféře inertního plynu 12 h. Vyloučená krystalická látka byla odfiltrována, promyta acetone

4-(Pent-4-en-1-yloxy)butan-1-sulfonová kyselina (SCX 2) – není předmětem vynálezu

Shodným postupem jako pro SCX 1 byla z pent-4-en-1-olu (24,4 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (30 ml) přidávkem suspenze hydridu sodného generován příslušný alkoholát. Ke směsi ochlazené na 0 °C byl přidán butan-1,4-sulton a reakční směs byla následně zahřívána 12 h na 60 °C. Vyloučená krystalická látka byla odfiltrována, promyta acetone

4-(Undec-10-en-1-yloxy)butan-1-sulfonová kyselina (SCX 3) – není předmětem vynálezu

Obdobně jako pro SCX 1 byl v inertním, plynem promyté baňce, rozpuštěn alkohol (14,6 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (30 ml) a reakcí s hydridem sodným převeden na odpovídající alkoholát. Ten, stejným způsobem jako v případě kyseliny 1, reagoval s butan-1,4-sultonem a byl zpracován. Bylo získáno 0,46 g (16 %) kyseliny SCX 3. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ: 1,1 (m, 12 H, 6 x -CH₂-); 1,4 (m, 2 H, CH₂); 1,6 (m, 4 H, OCH₂(CH₂)₂CH₂SO₃H); 1,8 (q, 2 H, CH₂=CHCH₂); 2,75 (t, 2 H, CH₂SO₃H); 3,25 (m, 4 H, CH₂OCH₂); 4,75 (m, 2 H, CH₂=CH); 5,6 (m, 1 H, CH₂=CH).

Stejným způsobem jsou připraveny i selektory odvozené od příslušných thiolů a aminů. Výše uvedené reakční podmínky lze aplikovat na alkoholy, thioly a aminy obsahující ve struktuře jak dvojnou tak trojnou vazbu. Reakce rovněž bez problémů probíhá se sultony s větším a menším počtem atomů v cyklu, viz níže.

4-Allylaminobutan-1-sulfonová kyselina (ZWIX 1) – není předmětem vynálezu

K roztoku allylaminu (24,4 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (20 ml) v tříhrdlé reakční nádobě promyté inertním plynem byl přidán butan-1,4-sulton (25,4 mmol) a reakční směs byla míchána a zahřívána na 60 °C v atmosféře inertního plynu po dobu 12 h. Vyloučená krystalická látka byla odfiltrována, promyta tetrahydrofuranem a vysušena. Bylo získáno 0,60 g (13 %) selektoru ZWIX 1. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ: 1,7 (t, 4 H, (CH₂)₂); 2,8 (t, 2 H, CH₂SO₃H); 2,9 (t, 2 H, NHCH₂); 3,5 (d, 2 H, CH₂=CHCH₂NH); 5,35 (m, 2H, CH₂=CH); 5,8 (m, 1 H, CH₂=CH).

4-(Prop-2-yn-1-ylamino)butan-1-sulfonová kyselina (ZWIX2)

K roztoku propargylaminu (25,4 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (20 ml) v tříhrdlé reakční nádobě promyté inertním plynem byl přidán butan-1,4-sulton (25,4 mmol) a reakční směs byla míchána a zahřívána na 60 °C v atmosféře inertního plynu po dobu 12 h. Vyloučená krystalická látka byla odfiltrována, promyta tetrahydrofuranem a vysušena. Bylo získáno 0,94 g (19 %) selektoru ZWIX 2. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ: 1,7 (m, 4 H, (CH₂)₂); 2,1 (s, 3 H, NH, CH≡C, SO₃H); 2,8 (t, 2 H, CH₂SO₃H); 3,0 (t, 2 H, CH₂NH); 3,75 (s, 2H, CH≡CCH₂NH).

3-Allylaminopropan-1-sulfonová kyselina (ZWIX 3) – není předmětem vynálezu

K roztoku allylaminu (17,1 mmol) v suchém acetonitrilu (10 ml) byl v atmosféře inertního plynu přidán propan-1,3-sulton (11,4 mmol) a reakční směs byla zahřívána k varu 12 h. Vyloučená krystalická látka byla odfiltrována, promyta acetonitrem a vysušena za vakua. Bylo získáno 1,6 g (82 %) zwitterionového selektoru 3. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 1,9 (m, 2 H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$); 2,8 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$); 3,0 (t, 2 H, NHCH_2); 3,5 (d, 2 H, $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{NH}$); 5,3 (m, 2H, $\text{CH}_2=\text{CH}$); 5,7 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$).

10 3-Allylthiopropán-1-sulfonová kyselina – není předmětem vynálezu

K 60% suspensi hydridu sodného v minerálním oleji (37,5 mmol) v suchém THF (30 ml) byl v inertní atmosféře argonu při 0 °C (chlazeno zevně ledem) přikapán allylthiol (32,8 mmol). Získaná suspence byla dále míchána 30 min při 0 °C a následně 30 min při laboratorní teplotě. Poté byl přidán propan-1,3-sulton a reakční směs byla míchána a zahřívána v inertní atmosféře 12 h. Rozpouštědlo bylo zfiltrováno, filtrační koláč byl promyt THF (2x 25 ml) a získaný pevný produkt byl po vysušení na vzduchu suspendován ve vodě. Suspence byla okyselena vodnou kyselinou chlorovodíkovou na pH~3 a míchána za laboratorní teploty 30 min. Poté byla zfiltrována, filtrační koláč byl promyt THF (10 ml) a pevný produkt byl vysušen za vakua. Bylo získáno 1,8 g (56 %) bílé krystalické látky. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 1,9 (m, 3 H, $\text{HO}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 2,6 (t, 2 H, $\text{HO}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 2,9 (t, 2 H, $\text{HO}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 3,2 (d, 2 H, SCH_2); 5,1 (m, 2H, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{S}$); 5,8 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{S}$).

4-[N-Methyl(prop-2-yn-1-yl)amino]butan-1-sulfonová kyselina

K roztoku propargylaminu (14,2 mmol) v suchém acetonitrilu (10 ml) v tříhrdlé reakční nádobě promyté inertním plynem byl přidán butan-1,4-sulton (12,7 mmol) a reakční směs byla míchána a zahřívána na 55 °C v atmosféře inertního plynu po dobu 14 h. Vyloučená krystalická látka byla odfiltrována, promyta tetrahydrofuranem a vysušena. Bylo získáno 1,1 g (42 %) selektoru obsahujícího ve struktuře terciární aminoskupinu. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 1,5 (m, 4 H, $(\text{CH}_2)_2$); 2,8 (m, 5 H, CH_3-N , $\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$); 3,0 (t, 1 H, $\text{C}=\text{CH}$); 3,2 (t, 2 H, CH_2N); 4,0 (d, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{CCH}_2\text{N}$).

Shodným způsobem jako u příkladů uvedených výše jsou syntetizovány další homology s délkou alkenylových, resp. alkynylových řetězců $n = 3$ až 11. Zároveň jsou stejným způsobem připraveny i homology s počtem $m = 2$ až 5, optimálně $m = 3$ nebo 4. Je zřejmé, že použití přebytku aminu významným způsobem zvyšuje výtěžek reakce (viz ZWIX 2 a ZWIX 3).

Přebytek některé z výchozích složek není na závadu, neboť lze z produktu snadno odstranit při filtraci opakovaným promytím krystalického produktu. Selektory jsou touto jednoduchou čisticí operací získány ve vysoké čistotě, která umožňuje jejich imobilizaci na nosič bez nutnosti dalších čisticích operací.

45 Příklad 2: Imobilizace selektorů na nosič

Selektory s dvojnou vazbou jsou na nosič stacionární fáze (přednostně silikagel) imobilizovány radikálovou adicí sulfanylové skupiny na řečenou dvojnou vazbu selektoru. Tato radikálová reakce je iniciována radikálovým iniciátorem (azobis(isobutyronitril), dibenzoylperoxid, atd.). Reakce je provedena v běžném organickém rozpouštědle (např. methanol). Selektor je imobilizován v množství od 100 $\mu\text{mol/g}$ do 600 $\mu\text{mol/g}$ nosiče. Radikálová adice sulfanylové skupiny na dvojnou vazbu je odborníkovi v oboru známá včetně vhodných iniciátorů a rozpouštědel.

Selektory s trojnou vazbou mohou být na stacionární fázi (přednostně silikagel) imobilizovány Huisgenovou dipolární cykloadiční reakcí mezi terminální trojnou vazbou a azidovou skupinou, známou též jako *click-reakce*, metodikou popsanou v literatuře (např. H. Hettegger, M. Kohout, V. Mimini, W. Lindner, *Journal of Chromatography A* 1337 (2014) 85). Mohou však být též
 5 imobilizovány radikálovou reakcí sulfanylových skupin na povrchu nosiče s řečenou trojnou vazbou selektoru. Selektor je imobilizován v množství od 100 $\mu\text{mol/g}$ do 600 $\mu\text{mol/g}$ nosiče.

Příklad 3: Chromatografické podmínky v jednotlivých chromatografických módech

Měření v polárním organickém módu jsou provedena v methanolu obsahujícím kyselinu mravenčí a diethylamin v poměru 2:1 jako pufrací směs. V módu reverzní fáze (RP) byla
 10 použita mobilní fází směs acetonitrilu a vody v poměru 1:9 obsahující pufr skládající se z kyseliny mravenčí a diethylaminu v poměru 1:1. Měření v HILIC módu bylo provedeno s
 15 mobilní fází obsahující acetonitril a vodu v poměru 9:1 se shodným pufrém jako v RP módu. SFC experimenty byly provedeny s mobilní fází (superkritický CO_2) obsahující 25 % methanolu, do kterého byl přidán mravenčan amonný a kyselina mravenčí v poměru 2:1 jako pufr.

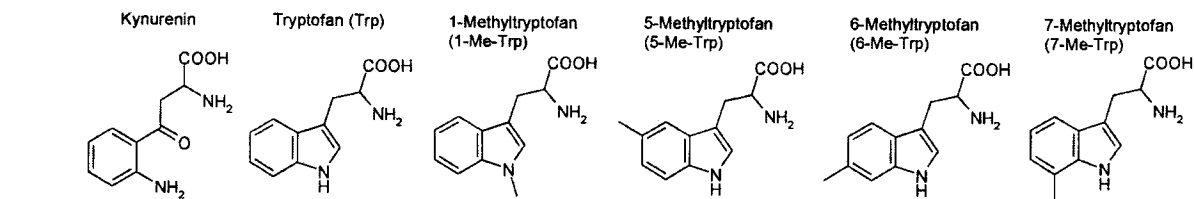
Příklad 4: Chromatografické použití

Multimodální stacionární fáze podle předkládaného vynálezu lze použít pro separaci a purifikaci širokého spektra analytů. Jako příklad použití jsou uvedeny separace vybraných léčiv, metabolitů
 25 a zwitteriontů. Separace byly provedeny ve všech výše zmíněných chromatografických módech (Příklad 3), tj. polárním organickém módu, RP, HILIC a SFC, aby byl zdokumentován multimodální charakter nových stacionárních fází podle předkládaného vynálezu. Pro každý chromatografický mód byla provedena analýza hlavních komponent (principál komponent analysis – PCA) a chromatografické parametry byly porovnány s komerčními kolonami. Separace analytů je diskutována na základě jejich hlavních rysů: primární aminy, amidy,
 30 farmaceutika, zwitterionty. Struktury analytů použitých pro vyhodnocení chromatografických parametrů nových multimodálních kolon jsou uvedeny v následujícím přehledu.

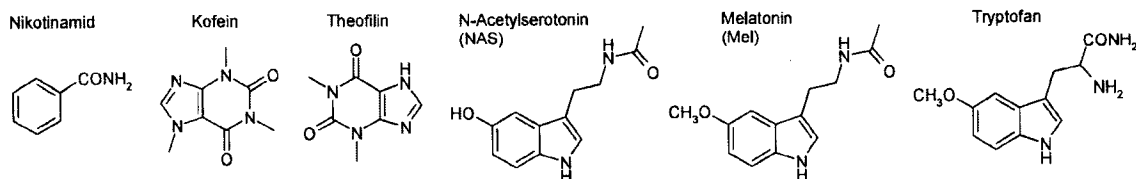
Primární aminy



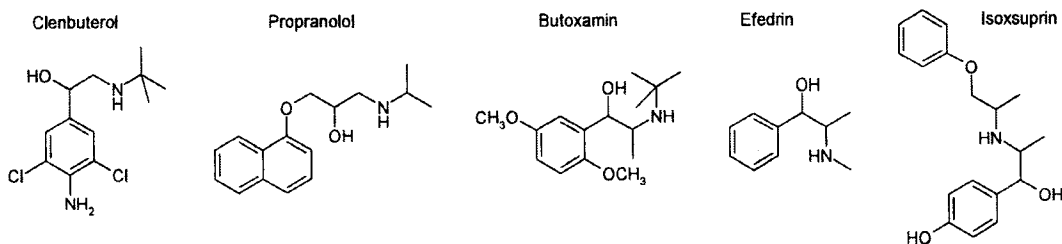
Zwitteriontové analyty



Amidy



5 Farmaceutika



10 Příklad 5: Chromatografie v polárním organickém módu

V polárním organickém módu je hlavním příspěvkem k retenci a následně separaci analytů iontovýměnný proces, neboť hydrofobní interakce a tvorba vodíkových vazeb je potlačena vysokým obsahem methanolu v mobilní fázi. Tomuto předpokladu odpovídají retenční faktory separovaných látek, kdy nejdelsí retenční časy jsou pozorovány pro primární aminy, dále farmaceutika (sekundární aminy), zwitterionty a amidy. Retenční faktory látek bazických jsou vyšší v případě použití SCX 1 až SCX 3, zatímco zwitteriontové analyty jsou více retenovány na kolonách ZWIX 1 až ZWIX 3. Amidy jsou eluovány na obou typech kolon v blízkosti t_0 .

20 Separční vlastnosti nových kolon byly porovnány s komerčními kolonami pro RP a HILIC chromatografií, jmenovitě reverzní fází Phenomenex Eclipse C8 (alkylové řetězce délky C8 vázané na povrchu silikagelu) a Phenomenex Luna HILIC (zesíťované dioly na povrchu silikagelu). V případě reverzní fáze Eclipse C8 byly všechny analyty eluovány s mrtvým objemem kolony, na koloně Luna HILIC v blízkosti t_0 .

25 PCA analýza hodnot $\log k$ analyzovaných látek ukazuje, že analyty jsou seskupeny do klastřů podle podobnosti svých funkčních skupin (Obr. 1). První komponenta odráží eluční pořadí analytů na stacionárních fázích – vlevo nejdříve a vpravo nejpozději eluované analyty. Druhá komponenta je nejvíce ovlivněna hydrofobicitou stacionární fáze.

30 Příklad 6: Chromatografie v módu reverzní fáze

35 Za podmínek isokratické eluce byly v reverzním módu nejvyšší retenční faktory pozorovány u farmaceutik dále primárních aminů, amidů a zwitteriontů. Retenční faktory primárních aminů a farmaceutik byly zjevně navýšeny příspěvkem elektrostatických interakcí, neboť retenční faktory byly vyšší při použití SCX kolon. Na komerční reverzní fázi Phenomenex Eclipse C8 byly dosaženy vyšší retenční faktory pro amidy a zwitterionty. Na koloně Phenomenex Luna HILIC byly za daných podmínek analyty eluovány s t_0 .

40 Při porovnání retenčních faktorů primárních aminů a farmaceutik na kolonách SCX byl zjištěn následující trend retenčních faktorů: $k(\text{SCX } 2) > k(\text{SCX } 1) > k(\text{SCX } 3)$, což značí, že vyjma iontovýměnných interakcí přispívají k retenci analytů i interakce hydrofobní. Je však zřejmé, že v

případě smíšených SCX fází není optimum dosaženo s nejdelším alifatickým řetězcem a oba typy interakcí působí simultánně a vzájemně se ovlivňují. Kolony ZWIX pak více zadržují zwitteriontové analyty, a to díky simultánnímu působení obou ionizovaných center. Retenční časy aminů jsou naopak sníženy působením inherentního protiiontu ZWIX selektoru.

PCA analýza při použití testovaných stacionárních fází neukazuje na žádný trend klastrování analytů podle druhu funkčních skupin (Obr. 2). První hlavní komponentou je opět eluční pořadí analytů s nejrychleji eluovanými analyty vlevo a nejpozději eluovanými vpravo. Hydrofobní příspěvky selektoru jsou viditelné při porovnání elučního pořadí noradrenalinu a oktopaminu či serotoninu a tryptaminu, kdy prvně jmenovaný je vždy eluován před druhým v pořadí. Druhou hlavní komponentu představuje log D analytů (při pH 4 použité mobilní fáze).

Příklad 7: Chromatografie v HILIC módu

Použité multimodální stacionární fáze, především ty s kratšími alkylovými spojovacími řetězci, mohou být považovány za iontové HILIC fáze. Retenční faktory všech stacionárních fází v HILIC módu byly nižší než v módu reverzní fáze. Nejvyšší retenční faktory pak byly dosaženy pro primární aminy a zwitterionty. Pro zwitterionty byly na použitých stacionárních fázích (včetně komerční kolony Phenomenex Luna HILIC) pozorovány retenční faktory v pořadí: $k(\text{ZWIX } 1) > k(\text{ZWIX } 3) > k(\text{ZWIX } 2) > k(\text{Luna HILIC}) > k(\text{SCX } 2) > k(\text{SCX } 1) > k(\text{SCX } 3)$ a pro primární aminy v pořadí $k(\text{ZWIX } 1) > k(\text{ZWIX } 3) > k(\text{SCX } 2) > k(\text{ZWIX } 2) > k(\text{SCX } 1) > k(\text{Luna HILIC}) > k(\text{SCX } 3)$. Retenční faktory farmaceutik byly podobné jako v polárním organickém módu.

Pro posouzení vlivu partičního mechanismu separace typického pro HILIC stacionární fáze byly hodnoty log k vyneseny proti hodnotám log D jednotlivých analytů. Koeficient R^2 získaný lineární regresi pro jednotlivé stacionární fáze ukazuje, že v případě ZWIX materiálů je partiční mechanismus poměrně zásadním příspěvatelem k separaci analytů (Tabulka 1). Avšak i v případě SCX materiálů se partiční mechanismus významně podílí na separaci analytů a i SCX sorbenty tak lze považovat za vhodné materiály pro separace v HILIC módu.

Tabulka 1 Korelační koeficient R^2 získaný vnesením závislosti log k na log D analytů separovaných na testovaných multimodálních stacionárních fázích.

Stacionární fáze	R^2
Luna HILIC	0,74
SCX1	0,55
SCX2	0,42
SCX3	0,49
ZWIX1	0,67
ZWIX2	0,68
ZWIX3	0,66

PCA analýza s využitím hodnot log k jednotlivých analytů a lipofilicity testovaných fází (druhá komponenta) ukazuje, že analyty se seskupují podle svých strukturních charakteristik a lze jednoznačně definovat skupinu primárních aminů, farmaceutik, amidů a zwitteriontů (Obr. 3).

Příklad 8: *Superkritická fluidní chromatografie*

V příkladech provedení bylo dosud ukázáno, že diskutované stacionární fáze jsou vhodné pro separaci různých analytů v různých HPLC chromatografických módech. Další možnou oblastí aplikace je superkritická fluidní chromatografie. Superkritický oxid uhličitý postrádá solvatační sílu potřebnou pro eluci polárních analytů, a proto se zpravidla přidává polární organické rozpouštědlo jako modifikátor mobilní fáze. Výsledná mobilní fáze je pak posunuta mimo superkritickou oblast do tzv. subkritické oblasti. Stále si však zachovává původní parametry, a to vysokou difuzivitu a nízkou viskozitu typickou pro superkritickou oblast, proto je termín SFC obecně přijímán pro všechny oblasti používané v této technice. Pro porovnání s ostatními výše uvedenými chromatografickými technikami byly SFC experimenty provedeny v isokratickém módu.

Na stacionárních fázích podle předkládaného vynálezu byly nejvyšší retenční faktory získány pro primární aminy, zwitterionty, farmaceutika a nejnižší pro amidy. Retenční faktory na jednotlivých stacionárních fázích klesaly v následujícím pořadí: pro zwitterionty $k(\text{ZWIX } 3) > k(\text{ZWIX } 1) > k(\text{SCX } 2) > k(\text{ZWIX } 2) > k(\text{SCX } 1) > k(\text{SCX } 3) > k(\text{Luna HILIC})$; pro primární aminy $k(\text{SCX } 2) > k(\text{SCX } 1) > k(\text{ZWIX } 1) > k(\text{ZWIX } 3) > k(\text{ZWIX } 2) > k(\text{SCX } 3) > k(\text{Luna HILIC})$ a farmaceutika $k(\text{SCX } 2) > k(\text{SCX } 1) > k(\text{SCX } 3) > k(\text{ZWIX } 1) > k(\text{ZWIX } 3) > k(\text{ZWIX } 2) > k(\text{Luna HILIC})$. Z uvedených výsledků lze usuzovat, že hlavním příspěvkem k retenci analytů v SFC módu jsou iontové interakce. PCA analýza hodnot $\log k$ ukazuje, že analyty se seskupují dle svých strukturních rysů (Obr. 4). První komponenta přísluší v tomto případě náboji analytů, druhá komponenta vystihuje lipofilicitu stacionární fáze (polární v horní části, nepolární ve spodní části). Neionizující amidy jsou seskupeny vlevo, ionizující a zwitteriontové analyty jsou pak vpravo mezi více retenovanými analyty.

Příklad 9: *Srovnání chromatografické účinnosti kolon v různých módech*

Jako vhodný parametr pro srovnání účinnosti nových multimodálních kolon byla zvolena selektivita, kdy serotonin slouží jako referenční analyt. Selektivita testovaných kolon vůči analytům byla vztažena k serotoninu, a proto jsou hodnoty této redukované selektivity (Tabulka 2 až 5) pro některé analyty menší než 1.

Tabulka 2: Retenční faktory a redukované selektivity analytů na různých kolonách v polárním organickém módu.

Analyt	SCX1		SCX2		SCX3	
	k	α	k	α	k	α
Niacin	-	-	-	-	-	-
Tryptamin	18,38	1,19	30,51	1,33	5,10	0,99
Serotonin	21,87	1,00	40,69	1,00	5,05	1,00
Oktopamin	12,32	1,78	20,37	2,00	3,44	1,47
Noradrenalin	15,54	1,41	26,38	1,54	3,65	1,38
Kynurenin	0,90	24,26	1,12	36,26	0,32	15,55
Tryptofan	1,17	18,71	1,49	27,39	0,45	11,29
1-Me-Trp	0,88	24,84	1,04	39,10	0,40	12,75
5-Me-Trp	1,06	20,60	1,31	31,07	0,42	12,02
6-Me-Trp	1,10	19,82	1,34	30,35	0,43	11,83
7-Me-Trp	1,06	20,61	1,31	31,16	0,43	11,83
Nikotinamid	0,09	242,25	0,12	345,52	0,03	164,63
Kofein	0,07	305,75	0,08	523,22	0,09	57,81
Theofylin	0,09	256,03	0,10	403,96	0,07	74,25
NAS	0,25	85,81	0,33	123,18	0,09	53,71
Melatonin	0,18	118,39	0,22	184,36	0,11	45,08
Tryptofanamid	14,20	1,54	22,62	1,80	3,86	1,31
Clenbuterol	9,84	2,22	14,10	2,89	4,00	1,26
Propranolol	13,15	1,66	18,72	2,17	5,32	0,95
Butoxamin	6,19	3,53	7,04	5,78	3,16	1,60
Efedrin	9,33	2,34	11,80	3,45	3,74	1,35
Isoxsuprin	9,01	2,43	11,23	3,62	3,64	1,39

Analyt	ZWIX1		ZWIX2		ZWIX3	
	k	α	k	α	k	α
Niacin	0,28	5,42	0,09	14,58	0,29	8,75
Tryptamin	2,16	0,69	1,06	1,18	1,64	1,56
Serotonin	1,50	1,00	1,25	1,00	2,56	1,00
Oktopamin	1,74	0,86	0,85	1,46	1,38	1,85
Noradrenalin	2,52	0,59	1,01	1,23	2,02	1,27
Kynurenin	1,28	1,16	0,70	1,80	1,29	1,98
Tryptofan	1,46	1,02	0,59	2,12	1,35	1,90
1-Me-Trp	1,09	1,37	0,52	2,40	1,02	2,52
5-Me-Trp	1,27	1,18	0,52	2,43	1,16	2,21
6-Me-Trp	1,33	1,12	0,56	2,22	1,23	2,09
7-Me-Trp	-	-	0,58	2,14	1,22	2,10
Nikotinamid	0,12	12,54	0,07	18,09	0,13	20,43
Kofein	0,07	22,83	0,07	18,25	0,09	29,43
Theofylin	0,11	13,99	0,06	20,89	0,12	22,25

NAS	0,28	5,33	0,09	14,07	0,26	9,97
Melatonin	0,18	8,37	0,06	19,67	0,16	15,91
Tryptofanamid	2,34	0,64	0,80	1,56	2,05	1,25
Clenbuterol	1,20	1,25	0,72	1,74	0,87	2,94
Propranolol	1,48	1,01	0,86	1,46	1,10	2,34
Butoxamin	0,81	1,84	0,58	2,17	0,58	4,44
Efedrin	1,16	1,29	0,80	1,57	0,85	3,00
Isoxsuprin	0,80	1,87	0,54	2,33	0,85	3,00

Tabulka 3: Retenční faktory a redukované selektivity analytů na různých kolonách v SFC.

5

Analyt	SCX1		SCX2		SCX3	
	k	α	k	α	k	α
Niacin	1,43	76,94	1,69	105,87	0,94	36,69
Tryptamin	51,22	2,15	67,98	2,62	21,80	1,58
Serotonin	110,26	1,00	178,39	1,00	34,51	1,00
Oktopamin	52,19	2,11	71,13	2,51	18,41	1,87
Noradrenalin	109,66	1,01	168,50	1,06	33,86	1,02
Kynurenin	62,49	1,76	79,50	2,24	19,86	1,74
Tryptofan	74,24	1,49	107,89	1,65	21,92	1,57
1-Me-Trp	36,19	3,05	43,83	4,07	15,22	2,27
5-Me-Trp	63,74	1,73	80,53	2,22	22,98	1,50
6-Me-Trp	66,46	1,66	84,50	2,11	22,73	1,52
7-Me-Trp	66,80	1,65	85,23	2,09	23,62	1,46
Nikotinamid	1,34	82,27	1,58	113,09	0,92	37,66
Kofein	0,23	476,71	0,28	637,12	0,44	78,81
Theofylin	0,55	200,10	0,66	269,27	-	-
NAS	5,02	21,98	6,35	28,09	2,41	14,34
Melatonin	1,98	55,83	2,30	77,48	1,50	22,96
Tryptofanamid	86,01	1,28	152,65	1,17	29,29	1,18
Clenbuterol	17,72	6,22	21,01	8,49	11,60	2,98
Propranolol	18,03	6,11	21,43	8,33	12,44	2,77
Butoxamin	8,72	12,64	9,28	19,23	7,00	4,93
Efedrin	13,42	8,21	16,02	11,14	8,62	4,00
Isoxsuprin	21,89	5,04	25,23	7,07	12,32	2,80

Analyt	ZWIX1		ZWIX2		ZWIX3	
	k	α	k	α	k	α
Niacin	3,27	28,11	2,49	25,57	3,55	23,26
Tryptamin	24,85	3,70	17,18	3,70	23,80	3,47
Serotonin	91,97	1,00	63,57	1,00	82,66	1,00
Oktopamin	34,44	2,67	24,86	2,56	29,78	2,78
Noradrenalin	102,02	0,90	87,86	0,72	96,32	0,86
Kynurenin	78,48	1,17	65,14	0,98	89,49	0,92

Tryptofan	127,33	0,72	95,69	0,66	116,80	0,71
1-Me-Trp	42,41	2,17	34,09	1,86	47,34	1,75
5-Me-Trp	91,01	1,01	70,33	0,90	98,59	0,84
6-Me-Trp	96,41	0,95	72,98	0,87	104,49	0,79
7-Me-Trp	96,84	0,95	72,82	0,87	104,00	0,79
Nikotinamid	1,08	84,99	0,88	72,27	1,20	69,16
Kofein	0,12	774,20	0,13	491,31	0,19	440,13
Theofylin	0,45	205,71	0,41	156,26	0,50	164,51
NAS	8,68	10,59	5,63	11,30	8,10	10,20
Melatonin	2,39	38,53	1,54	41,19	2,27	36,48
Tryptofanamid	67,27	1,37	49,80	1,28	70,17	1,18
Clenbuterol	7,60	12,10	5,57	11,42	6,75	12,25
Propranolol	7,30	12,59	4,97	12,79	6,79	12,17
Butoxamin	3,79	24,29	3,10	20,48	3,60	22,95
Efedrin	5,55	16,57	4,49	14,15	5,48	15,09
Isoxsuprin	12,89	7,14	8,62	7,37	10,60	7,80

Obdobně jako pro výše diskutované retenční faktory byla selektivita obecně vyšší pro SCX fáze než pro ZWIX fáze. Nejvyšší selektivita byla pozorována pro amidy, dále zwitterionty, farmaceutika a aminy (Tabulka 2 a 3).

Tabulka 4: Souhrn retenčních faktorů a selektivit (serotonin jako referenční analyt) v RP módu.

Analyt	SCX1		SCX2		SCX3	
	k	α	k	α	k	α
Niacin	0,18	86,12	0,08	284,62	0,41	17,56
Tryptamin	26,62	0,59	33,04	0,68	9,91	0,72
Serotonin	15,59	1,00	22,49	1,00	7,13	1,00
Oktopamin	3,36	4,64	4,50	4,99	2,45	2,91
Noradrenalin	2,23	6,98	3,23	6,95	2,11	3,38
Kynurenin	0,72	21,74	0,58	38,97	1,24	5,73
Tryptofan	1,00	15,63	0,87	25,76	1,76	4,06
1-Me-Trp	1,31	11,87	1,10	20,53	2,96	2,41
5-Me-Trp	1,44	10,81	1,27	17,77	2,87	2,49
6-Me-Trp	1,45	10,74	1,29	17,46	2,89	2,47
7-Me-Trp	1,41	11,03	1,24	18,12	3,08	2,32
Nikotinamid	1,03	15,10	0,94	23,95	1,29	5,51
Kofein	1,52	10,26	1,19	18,91	2,90	2,46
Theofylin	0,60	26,02	0,49	45,52	1,79	3,99
NAS	3,49	4,46	3,66	6,14	4,61	1,55
Melatonin	6,96	2,24	6,41	3,51	12,54	0,57
Tryptofanamid	3,15	4,95	3,15	7,13	4,74	1,50
Clenbuterol	41,71	0,37	47,23	0,48	31,45	0,23
Propranolol	123,00	0,13	134,00	0,17	-	-

Butoxamin	46,94	0,33	43,41	0,52	-	-
Efedrin	10,57	1,48	12,19	1,84	8,64	0,82
Isoxsuprin	21,45	0,73	17,47	1,29	-	-

Analyt	ZWIX1		ZWIX2		ZWIX3	
	k	α	k	α	k	α
Niacin	0,35	20,64	0,31	21,31	0,30	24,36
Tryptamin	10,24	0,70	6,73	0,98	9,01	0,81
Serotonin	7,21	1,00	6,61	1,00	7,31	1,00
Oktopamin	2,01	3,59	2,16	3,06	2,08	3,51
Noradrenalin	1,99	3,62	2,36	2,81	1,88	3,88
Kynurenin	0,85	8,51	0,63	10,42	0,73	9,97
Tryptofan	1,24	5,83	0,82	8,03	0,96	7,61
1-Me-Trp	1,51	4,77	0,86	7,65	1,14	6,39
5-Me-Trp	1,63	4,43	0,90	7,38	1,18	6,20
6-Me-Trp	1,66	4,34	0,92	7,21	1,20	6,10
7-Me-Trp	1,62	4,45	0,89	7,46	1,17	6,25
Nikotinamid	0,98	7,36	0,86	7,67	0,87	8,45
Kofein	1,32	5,48	0,95	6,99	1,15	6,37
Theofylin	1,10	6,55	0,71	9,35	0,85	8,64
NAS	2,87	2,51	1,47	4,51	2,07	3,53
Melatonin	4,81	1,50	1,71	3,87	3,05	2,40
Tryptofanamid	2,47	2,92	1,30	5,07	1,86	3,93
Clenbuterol	13,48	0,53	6,90	0,96	12,29	0,59
Propranolol	39,00	0,18	13,63	0,48	32,00	0,23
Butoxamin	12,98	0,56	6,02	1,10	10,76	0,68
Efedrin	4,53	1,59	3,90	1,69	4,54	1,61
Isoxsuprin	11,86	0,61	2,87	2,31	6,98	1,05

Tabulka 5: Souhrn retenčních faktorů a selektivit (serotonin jako referenční analyt) v HILIC

5

Analyt	SCX1		SCX2		SCX3	
	k	α	k	α	k	α
Niacin	0,29	10,38	0,38	11,83	0,33	3,54
Tryptamin	2,23	1,36	3,05	1,49	1,19	0,98
Serotonin	3,03	1,00	4,54	1,00	1,16	1,00
Oktopamin	2,44	1,24	3,65	1,24	0,97	1,20
Noradrenalin	3,13	0,97	4,87	0,93	1,12	1,04
Kynurenin	1,09	2,79	1,43	3,17	0,72	1,61
Tryptofan	1,25	2,43	1,69	2,69	0,77	1,51
1-Me-Trp	0,93	3,24	1,20	3,80	0,77	1,52
5-Me-Trp	1,12	2,70	1,48	3,06	0,78	1,49
6-Me-Trp	1,13	2,68	1,50	3,02	0,83	1,41

7-Me-Trp	1,14	2,65	1,51	3,01	0,79	1,48
Nikotinamid	0,25	12,22	0,35	12,96	0,27	4,28
Kofein	0,03	115,20	-0,02	-	0,09	12,99
Theofylin	0,21	14,36	0,29	15,49	0,25	4,61
NAS	0,21	14,63	0,30	14,99	0,20	5,78
Melatonin	0,01	512,00	-0,03	-	0,18	6,39
Tryptofanamid	0,39	7,81	0,53	8,54	0,37	3,15
Clenbuterol	0,92	3,30	1,13	4,02	0,86	1,35
Propranolol	0,98	3,08	1,21	3,76	1,02	1,14
Butoxamin	0,76	4,01	0,84	5,41	0,82	1,42
Efedrin	1,52	1,99	1,95	2,33	1,08	1,08
Isoxsuprin	0,20	14,86	0,29	15,79	0,30	3,81

Analyt	ZWIX1		ZWIX2		ZWIX3	
	k	α	k	α	k	α
Niacin	1,85	2,80	1,38	2,79	1,77	2,61
Tryptamin	2,70	1,92	2,06	1,87	2,44	1,89
Serotonin	5,18	1,00	3,86	1,00	4,60	1,00
Oktopamin	4,54	1,14	3,60	1,07	4,13	1,11
Noradrenalin	7,69	0,67	5,83	0,66	6,58	0,70
Kynurenin	4,32	1,20	3,27	1,18	3,94	1,17
Tryptofan	5,17	1,00	3,65	1,06	4,63	0,99
1-Me-Trp	3,36	1,54	2,52	1,53	3,14	1,46
5-Me-Trp	4,32	1,20	3,08	1,25	3,87	1,19
6-Me-Trp	4,47	1,16	3,26	1,18	3,92	1,18
7-Me-Trp	4,48	1,16	3,15	1,22	3,99	1,15
Nikotinamid	0,56	9,19	0,46	8,39	0,55	8,43
Kofein	0,10	50,12	0,10	36,84	0,11	41,43
Theofylin	0,53	9,74	0,44	8,75	0,55	8,42
NAS	0,54	9,51	0,44	8,77	0,53	8,67
Melatonin	0,11	47,19	0,09	42,70	0,10	46,87
Tryptofanamid	0,76	6,86	0,56	6,86	0,70	6,61
Clenbuterol	0,86	5,99	0,82	4,69	0,90	5,14
Propranolol	0,97	5,34	0,85	4,55	0,97	4,75
Butoxamin	0,70	7,42	0,69	5,56	0,74	6,18
Efedrin	1,65	3,14	1,41	2,73	1,67	2,76
Isoxsuprin	0,13	40,83	0,12	32,02	0,11	41,16

5 V RP módu (Tabulka 4) a HILIC módu (Tabulka 5) byly nejvyšší selektivity dosaženy v pořadí SCX 1 > SCX 2 > ZWIX 2 > ZWIX 3 > ZWIX 1 > SCX 3 > Phenomenex Eclipse C8. Nejvyšší selektivity byly pozorovány pro amidy a zwitterionty.

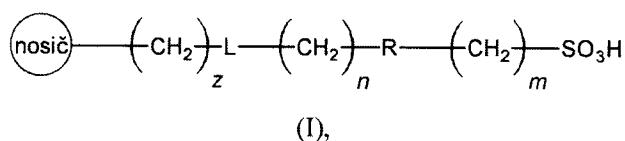
Příklad 10: *Stabilita stacionárních fází a retenčních časů ve spojení s hmotnostní spektrometrií*

- 10 Kompatibilita stacionárních fází podle předkládaného vynálezu s tandemovým uspořádáním kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie byla otestována za použití SFC-MS systému s kolonou SCX 3. Jako analyt posloužila směs metabolitů tryptofanové metabolické dráhy, jmenovitě: melatonin, serotonin, NAS, niacin a tryptofan. Separace byla provedena v

gradientním SFC s methanolem obsahujícím 50 mM mravenčanu amonného jako pufovaným organickým modifikátorem. Analyty byly úspěšně separovány během 10 min. Možné ovlivnění stability signálu uvolňováním selektoru z kolony (column bleeding) bylo ověřeno pomocí 15 následných nástřiků (Obr. 5). Jak retenční čas, tak i detekovaný signál byly konstantní, což značí, že k uvolňování selektoru z kolony za daných podmínek nedochází a stacionární fáze je stabilní a použitelná i v SFC–MS/MS módu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Multimodální stacionární fáze pro kapalinovou chromatografii obecného vzorce I



kde

R je –O–, –S–, –SO–, –SO₂– nebo –N(R¹)–;

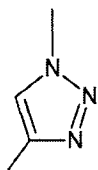
příčemž R¹ je vybrané ze skupiny sestávající z H, (C1 až C6)alkylu, (C2 až C6)alkenylu, (C2 až C6)alkynylu, (C6 až C8)arylu, s výhodou je R¹ vybrané ze skupiny sestávající z H, –CH₃, –CH₂CH₃, allylu, propargylu, benzylu a fenylu;

n je celé číslo v rozmezí od 3 do 11;

m je celé číslo v rozmezí od 2 do 5;

z je celé číslo v rozmezí od 2 do 5;

L je triazolová skupina vzorce II



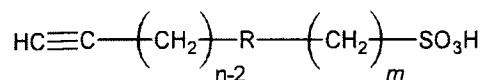
(II);

a nosič stacionární fáze je vybraný ze skupiny sestávající z anorganických částicových materiálů o velikosti částic od 1,5 do 10 μm a velikosti pórů od 9 nm do 20 nm.

2. Multimodální stacionární fáze podle nároku 1, **vyznačená tím**, že nosič je vybraný ze skupiny sestávající ze silikagelu, aluminy, ZrO₂, TiO₂ a zeolitů, zejména MCM–48, a core–shell částic, s pevným jádrem a porézní svrchní vrstvou tvořenou SiO₂, o velikosti od 1,6 do 5 μm.

3. Způsob přípravy multimodální stacionární fáze pro kapalinovou chromatografii podle nároku 1 nebo 2, **vyznačený tím**, že obsahuje následující kroky:

a) připraví se selektor obecného vzorce III



(III),

obsahující ve své struktuře terminální trojnou vazbu,

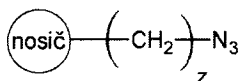
kde n je celé číslo v rozmezí od 3 do 11, m je celé číslo v rozmezí od 2 do 5 a R je $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{SO}-$, $-\text{SO}_2-$ nebo $-\text{N}(\text{R}^1)-$;

příčemž R^1 je vybrané ze skupiny sestávající z H , (C1 až C6)alkylu, (C2 až C6)alkenylu, (C2 až C6)alkynylu, (C6 až C8)arylu, s výhodou je R^1 vybrané ze skupiny sestávající z H , $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, allylu, propargylu, benzylu a fenylu;

tak, že se (C3 až C11)alkenolát nebo (C3 až C11)alkynolát nebo (C3 až C11)alkenthioalát nebo (C3 až C11)alkynthioalát nebo (C3 až C11)alkenylamin nebo (C3 až C11)alkynylamin, který má násobnou vazbu na opačném konci uhlíkového řetězce než heteroatom, podrobí reakci s (C2 až C5)sultonem; případně se výsledný selektor, který obsahuje $\text{R} = -\text{S}-$, dále oxiduje prostou nebo katalyzovanou oxidací vzdušným kyslíkem nebo peroxidem vodíku na selektor obsahující $\text{R} = -\text{SO}-$ a/nebo $-\text{SO}_2-$;

b) selektor obecného vzorce III se imobilizuje na nosič vybraný z anorganických částicových materiálů o velikosti částic od 1,5 do 10 μm a velikosti pórů od 9 nm do 20 nm, používaných jako inertní nosiče v kapalinové chromatografii pro chemické ukotvení selektoru, tak, že nosič, který je modifikovaný azidoalkylovými skupinami o počtu uhlíkových atomů v alkylenovém řetězci od 2 do 5, reaguje se selektorem obecného vzorce III za vzniku multimodální stacionární fáze obecného vzorce I.

4. Způsob podle nároku 3, **vyznačený tím**, že krok b) je Huisgenova dipolární cykloadiční reakce mezi terminální trojnou vazbou selektoru obecného vzorce III a azidovou skupinou látky obecného vzorce IV



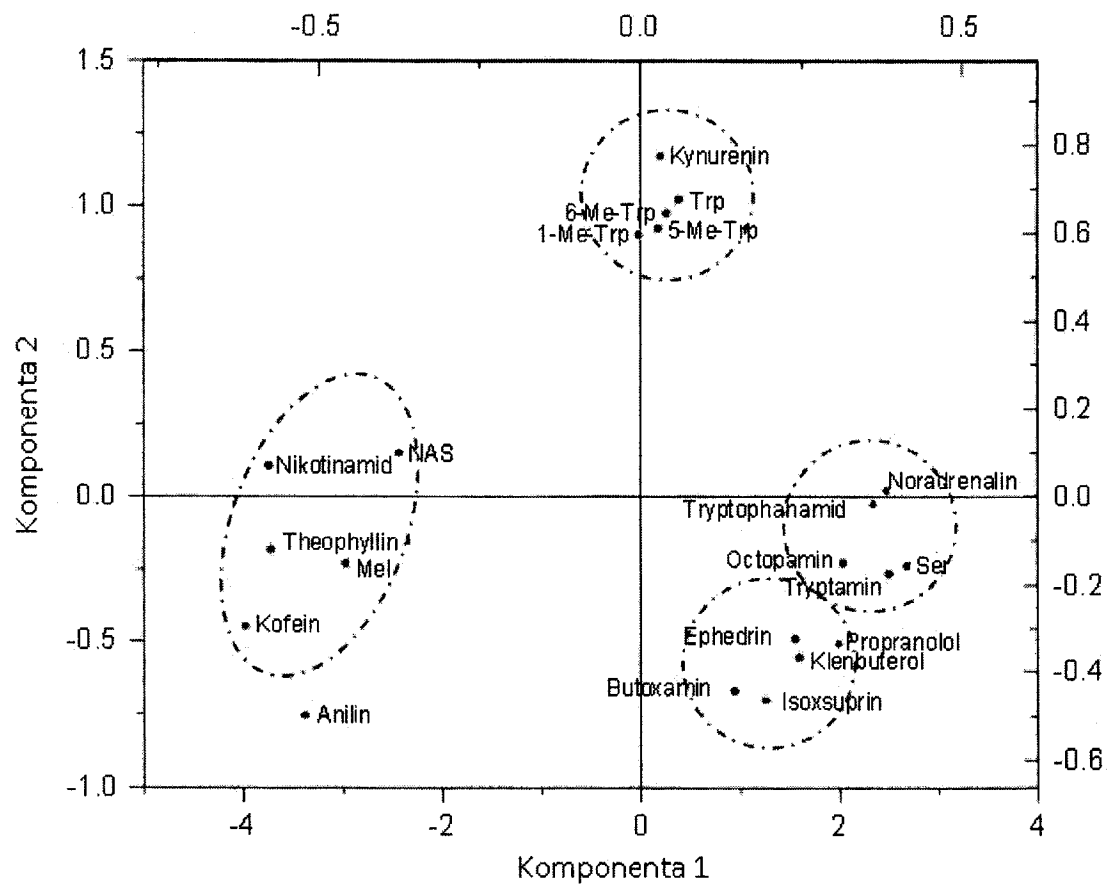
(IV),

kde z je celé číslo v rozmezí od 2 do 5.

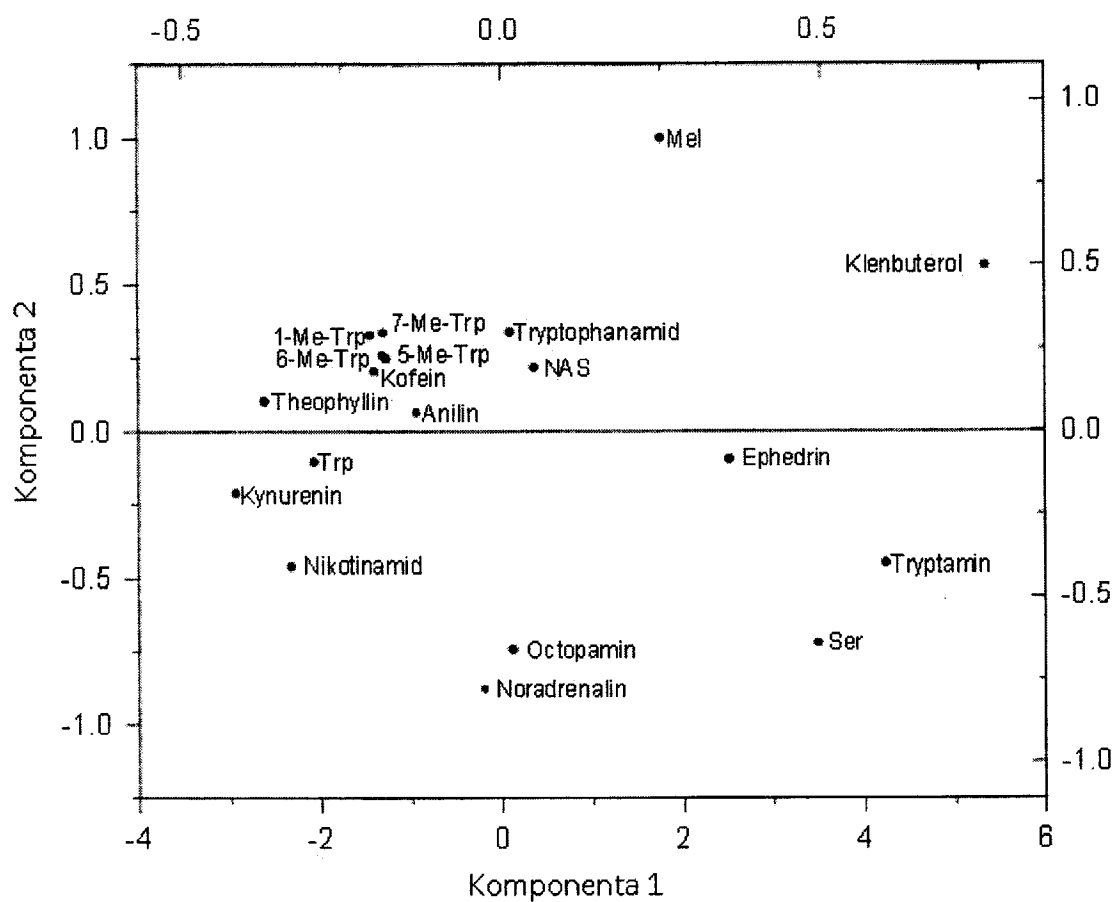
5. Způsob podle nároku 3 nebo 4, **vyznačený tím**, že reakce (C3 až C11)alkenolátu nebo (C3 až C11)alkynolátu nebo (C3 až C11)alkenthioalátu nebo (C3 až C11)alkynthioalátu nebo (C3 až C11)alkenylaminu nebo (C3 až C11)alkynylaminu, který má násobnou vazbu na opačném konci uhlíkového řetězce než heteroatom, s (C2 až C5)sultonem v kroku a) proběhne při teplotě alespoň 50 $^{\circ}\text{C}$ a v atmosféře inertního plynu po dobu alespoň 10 hodin.

6. Použití multimodální stacionární fáze podle nároku 1 nebo 2 pro chromatografickou separaci a purifikaci látek v polárním organickém módu, na reverzní fázi, při chromatografii hydrofilních interakcí a při superkritické fluidní chromatografii.

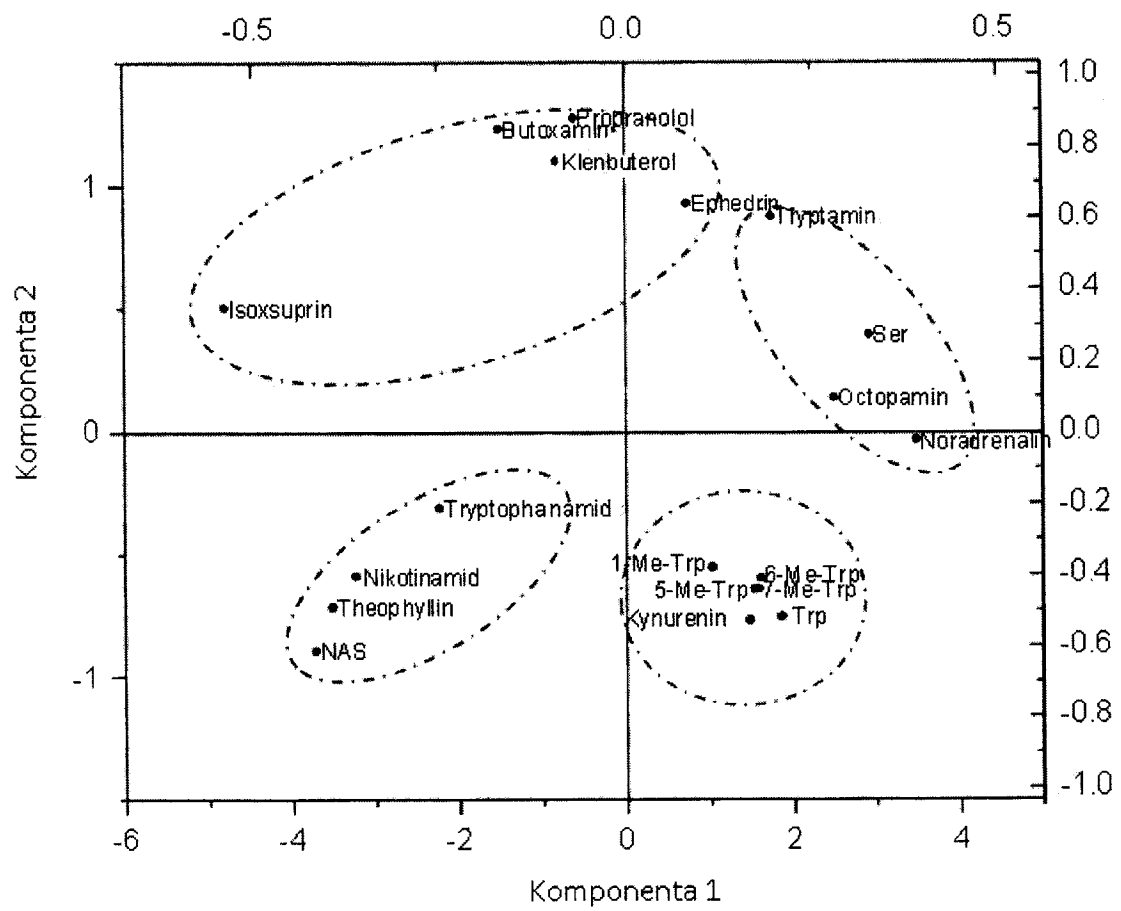
7. Použití multimodální stacionární fáze podle nároku 1 nebo 2 jako sorbent pro extrakci na pevné fázi.



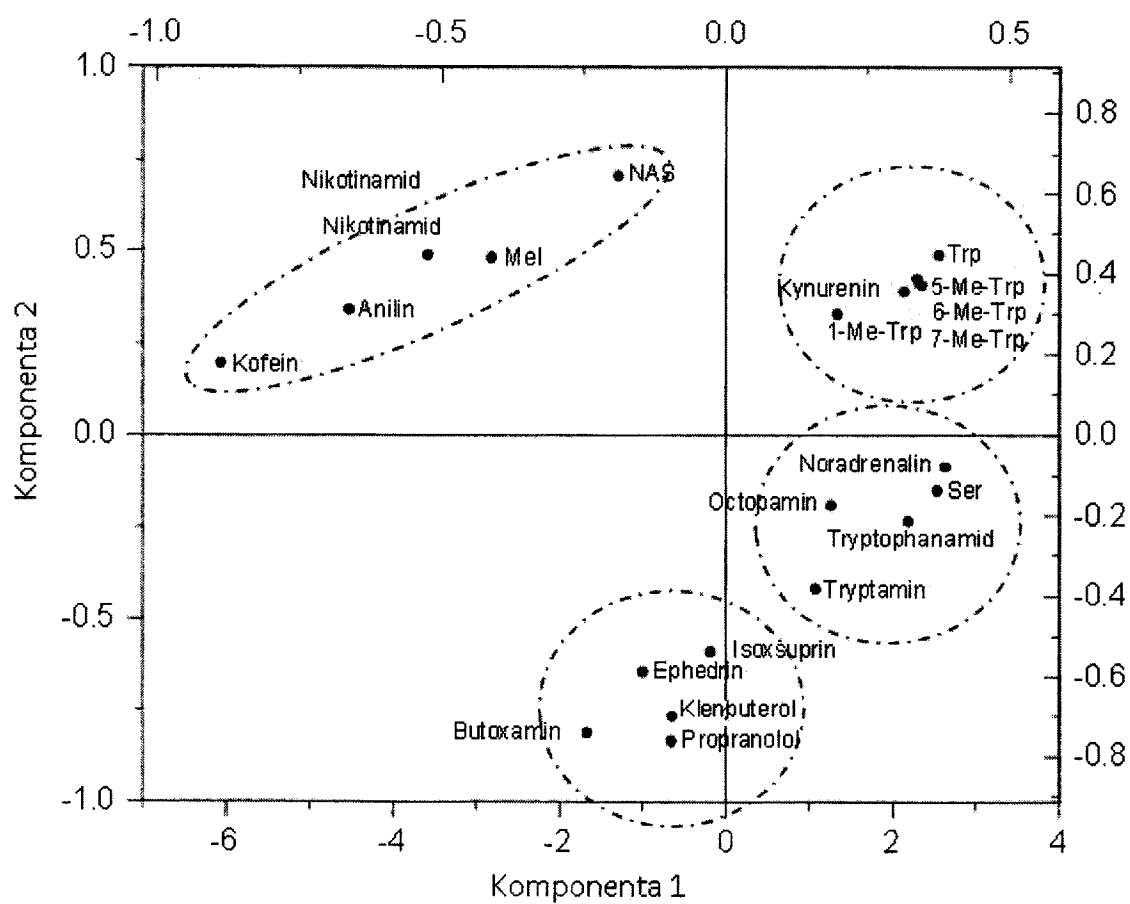
Obr. 1



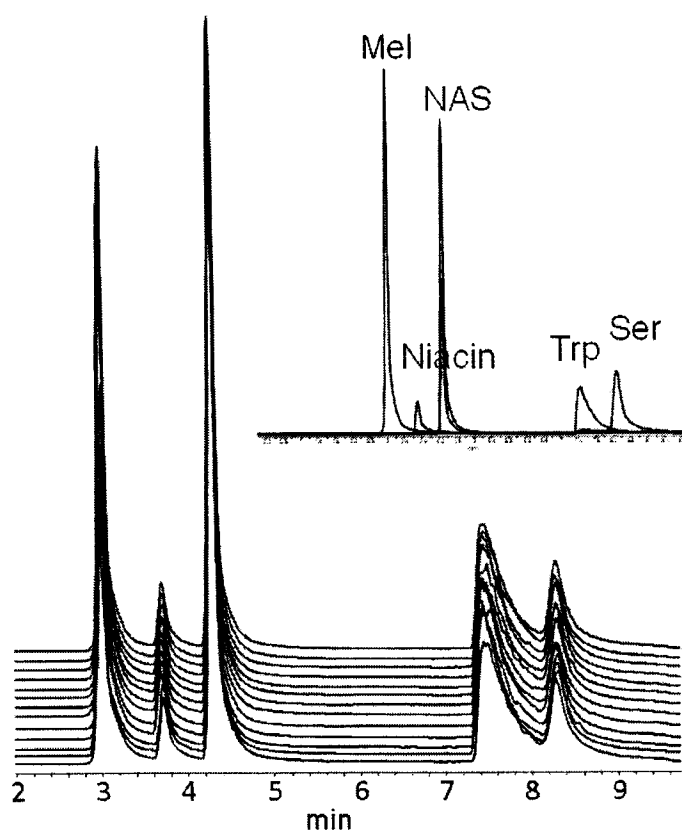
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5

Konec dokumentu
