

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

Separace polykarboxylátových derivátů cyklenu pomocí HPLC

Diplomová práce

Praha 2007

Anna Hamplová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele doc. RNDr. Pavla Coufala, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 15. dubna 2007


Anna Hamplová

Děkuji

Doc. RNDr. Pavlovi Coufalovi, Ph.D. za odborné vedení, zejména všestrannou pomoc a cenné rady, které mi poskytoval v průběhu práce,

Prof. RNDr. Františkovi Opekarovi, CSc. za zapůjčení bezkontaktního vodivostního detektoru a pomoc při řešení technických problémů,

skupině Prof. RNDr. Ivana Lukeše, CSc. a Doc. RNDr. Petra Hermanna, Ph.D. za zájem o tuto práci a podnětné diskuze,

Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky za finanční podporu této práce prostřednictvím výzkumného záměru MSM 0021620857.

Předmětová hesla: analytická chemie
separační metody

Klíčová slova: vysokoučinná kapalinová chromatografie
bezkontaktní vodivostní detekce
deriváty cyklenu

OBSAH

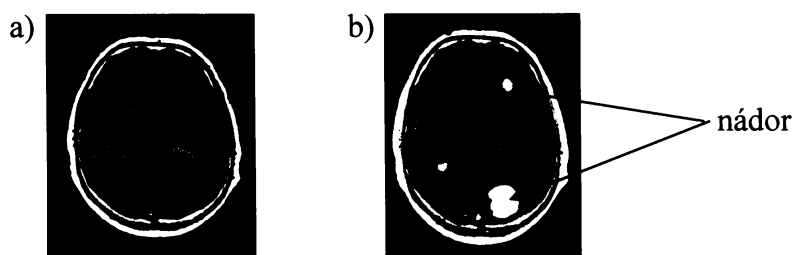
1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Magnetic Resonance Imaging (MRI)	9
2.2	Polykarboxylátové deriváty cyklenu	10
	2.2.1 Přehled studovaných polykarboxylátových derivátů cyklenu	10
	2.2.2 Vlastnosti polykarboxylátových derivátů cyklenu důležité pro HPLC separaci	12
2.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	14
	2.3.1 Chromatografie s obrácenými fázemi (RP-HPLC)	14
	2.3.2 Vybrané typy stacionárních fází	15
2.4	Detekce v HPLC	18
	2.4.1 Bezkontaktní vodivostní detektor (CCD)	18
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1	Přístrojové vybavení	20
3.2	Použité chemikálie	20
	3.2.1 Příprava mobilních fází a vzorků pro analýzu	21
3.3	Experimentální podmínky	21
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	25
4.1	Kolona RP Select B	25
	4.1.1 Jednoduché mobilní fáze	25
	4.1.2 Mobilní fáze s přídavkem kyseliny nebo pufru	28
	4.1.3 Dělení esterových derivátů cyklenu	30
4.2	Kolona Biospher 200 NH	33
	4.2.1 Mobilní fáze s methanolem	34
	4.2.2 Mobilní fáze s acetonitrilem	34

4.3	Kolona Ascentis RP-Amide	35
4.3.1	Jednoduché mobilní fáze	36
4.3.2	Mobilní fáze obsahující pufr	37
4.4	Kolona Discovery HSF5	38
4.4.1	Jednoduché mobilní fáze	38
4.4.2	Mobilní fáze obsahující pufr	40
4.5	Detekce	41
4.5.1	UV detekce	41
4.5.2	Bezkontaktní vodivostní detekce (CCD)	42
4.5.3	Srovnání UV a CCD detekce	43
5	ZÁVĚR	45
6	SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	47
7	LITERATURA	48
	PŘÍLOHA: PŘEHLED STRUKTUR STUDOVANÝCH LÁTEK	51

1 ÚVOD

Jedním z velkých problémů současné civilizace je rychle rostoucí počet nádorových onemocnění, v České republice jsou dokonce druhou nejčastější příčinou úmrtí. Ačkoli bylo vyvinuto mnoho účinných léků a technik boje s rakovinou, nejdůležitější podmínkou pro úspěšnou léčbu nádoru je jeho včasné odhalení. Současná medicína má naštěstí k dispozici řadu zobrazovacích metod, např. radiodiagnostické metody PET (Positron Emission Tomography) a SPECT (Single Photon Emission Computer Tomography) [1] nebo tomografii MRI (Magnetic Resonance Imaging) [2]. Právě MRI se v posledních dvaceti letech stala jednou z nejúčinnějších neinvazivních diagnostických metod.

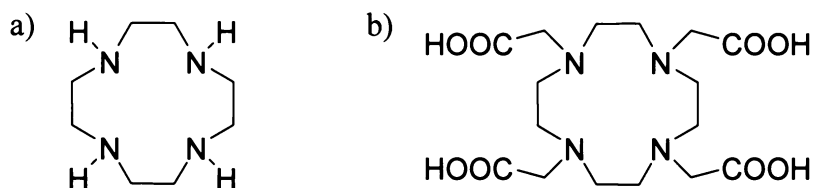
K dosažení lepšího zobrazení nádoru (Obr.1) se u všech těchto metod používají kontrastní látky, jejichž základem jsou sloučeniny přechodných kovů a lanthanoidů. Pro použití v klinické praxi musí být tyto pro člověka značně toxické ionty kovů aplikovány ve formě komplexu, který je dostatečně stabilní jak z hlediska termodynamického (stabilita v přítomnosti konkurenčních biogenních ligandů), tak z hlediska kinetického.



Obr. 1: Snímky mozku pořízené pomocí MRI bez použití kontrastní látky (a) a s použitím kontrastní látky (b).

Mezi nejčastěji používané kontrastní látky v MRI patří komplexy trojmocného gadolinia, ve kterých je ligandem polykarboxylátový derivát cyklenu (1,4,7,10-tetraazacyklododekan – Obr. 2a), např. H_4DOTA (kyselina 1,4,7,10-tetraaza-cyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová – Obr. 2b). Tyto ligandy jsou schopné koordinovat

kation gadolinia až osmi koordinačně-kovalentními vazbami a vytvořit tak velice stabilní komplex.



Obr. 2: Struktura cyklenu (a) a H₄DOTA (b).

Polykarboxylátové deriváty cyklenu se často připravují poměrně složitou několikastupňovou syntézou. Čištění jednotlivých reakčních meziproductů je obtížné, protože vedle žádané látky nelze zabránit vzniku vedlejších produktů s velmi podobnými vlastnostmi (rozpuštnost, těkavost atd.). Ani opakovanou sloupcovou chromatografií nelze dosáhnout čistoty požadované pro použití v klinické praxi. V literatuře zatím nebyla popsána žádná dostatečně účinná metoda separace polykarboxylátových derivátů cyklenu.

Cílem této práce je tedy především zjistit, zda je vysokouúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) vhodná metoda pro separaci polykarboxylátových derivátů cyklenu a dále pak nalezení optimálních podmínek separace v budoucnu využitelných pro preparativní HPLC.

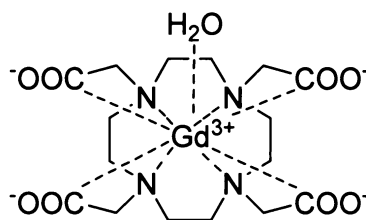
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 MAGNETIC RESONANCE IMAGING (MRI)

MRI tomografie [3] je založena na sledování chování jader s magnetickým momentem ve vnějším magnetickém poli, tedy na stejném principu jako nukleární magnetická rezonance (NMR). Jelikož lidské tělo obsahuje kolem 60 % vody, jako nejvýhodnější se ukázalo měření signálu jader vodíku (^1H) v molekulách vody. Jednotlivé tkáně liší se obsahem vody, např. tkáň postižená rakovinným bujením oproti zdravé, pak poskytují různě intenzivní signál, který může být zpracován do 2D popř. 3D obrázků.

Chování a tedy i signál molekul vody v magnetickém poli zásadním způsobem ovlivňuje přítomnost paramagnetických látek. Proto se pro MRI využívají kontrastní látky založené na gadolinitém iontu (sedm nepárových elektronů, maximální spinový moment). Účinnost kontrastní látky vyjadřuje veličina relaxivity, která závisí na mnoha parametrech, např. teplota, počet molekul vody koordinovaných ke gadolinitému iontu, rychlost výměny koordinované molekuly vody, elektronické parametry Gd^{3+} iontu atd. Vývoj nových vhodných ligandů s lepšími vlastnostmi je jednou z možností, jak zvýšit relaxivitu.

Koordinační číslo gadolinitého iontu je 8 nebo 9 podle objemnosti ligandů. Aby byl ligand vhodný pro tvorbu kontrastní látky, musí být schopný vytvořit s Gd^{3+} dostatečně pevný komplex, ale současně nesmí bránit přenosu magnetické informace mezi kovovým iontem a okolním roztokem. Ideální ligand tedy bude trojmocný kation gadolinia koordinovat osmi donorovými atomy tak, aby deváté místo mohlo být obsazeno molekulou vody, jejíž výměnou dochází k přenosu magnetické informace mezi kontrastní látkou a okolním roztokem. Polykarboxylátové deriváty cyklenu splňují obě podmínky – jsou schopné iont gadolinia koordinovat až osmi donorovými atomy a jsou stericky málo náročné, čímž umožňují obsazení posledního koordinačního místa molekulou vody (Obr. 3).



Obr. 3: Komplex Gd^{3+} -DOTA, deváté koordinační místo obsazeno molekulou vody.

2.2 POLYKARBOXYLÁTOVÉ DERIVÁTY CYKLENU

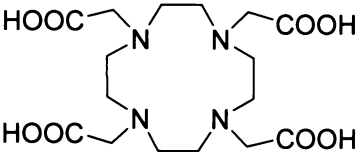
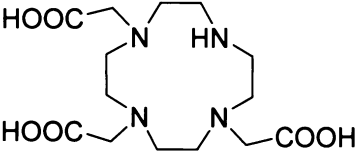
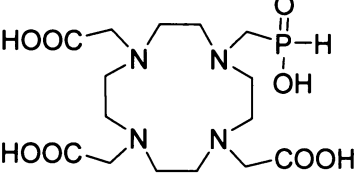
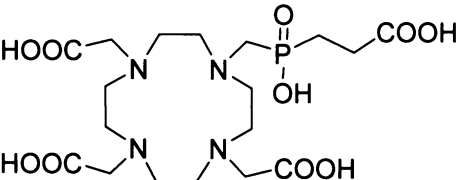
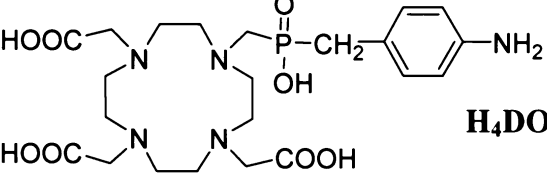
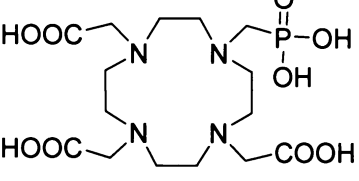
Cyklén (1,4,7,10-tetraazacyklododekan, Obr. 2) je jedním z nejdůležitějších zástupců dnes již velmi široké „rodiny“ polyazamakrocyklů [4]. Ačkoli byly poprvé zmíněny již roku 1937 van Alphenem, největší rozvoj zaznamenaly až ve druhé polovině 20. století [5]. Byla připravena řada derivátů polyazamakrocyklů s širokým uplatněním (katalýza, biomedicína, čištění vody od těžkých kovů atd.) [6-10].

Polykarboxylátové deriváty cyklenu jsou skupinou látek, která zaznamenala obrovský rozvoj zejména v posledních dvaceti letech. Jak již bylo zmíněno výše, lze je využít jako nosiče těžkých kovů a lanthanoidů a jsou proto vhodnými ligandy nových kontrastních látek pro MRI.

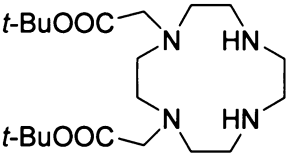
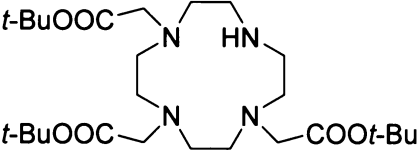
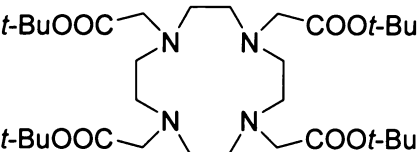
2.2.1 PŘEHLED STUDOVANÝCH POLYKARBOXYLÁTOVÝCH DERIVÁTŮ CYKLENU

Polykarboxylátové deriváty cyklenu studované v této práci je možné rozdělit do dvou základních skupin, které se zásadně liší svými fyzikálními i chemickými vlastnostmi (acidobazické vlastnosti, rozpustnost, schopnost tvořit amfionty atd.). První skupinou jsou tzv. kyselé deriváty cyklenu a patří do ní polykarboxylátové deriváty cyklenu s převažujícím kyselým charakterem. Druhou skupinou jsou tzv. esterové deriváty cyklenu s čistě bazickým charakterem. Esterové deriváty cyklenu jsou prekurzory syntézy kyselých derivátů cyklenu, nicméně jako kontrastní látky pro MRI nejsou vhodné.

KYSELÉ DERIVÁTY CYKLENU

Struktura	Označení	Systematický název
	H₄DOTA	kyselina 1,4,7,10- -tetraazacyklododekan- -1,4,7,10-tetraoctová
	H₃DO3A	kyselina-1,4,7,10- -tetraazacyklododekan- -1,4,7-trioctová
	H₄DO3AP^H	kyselina-1,4,7,10- -tetraazacyklododekan-4,7,10- -trioctová-1-methylfosfinová
	H₅DO3AP^{PrA}	kyselina-1,4,7,10- -tetraazacyklododekan-4,7,10- -trioctová-1-[methyl(2- -karboxyethyl)fosfinová]
	H₄DO3AP^{ABn}	kyselina-1,4,7,10- -tetraazacyklododekan-4,7,10- -trioctová-1-{methyl[(4- aminofenyl)methyl]fosfinová}
	H₅DO3AP	kyselina-1,4,7,10- -tetraazacyklododekan-4,7,10- -trioctová-1-methylfosfonová

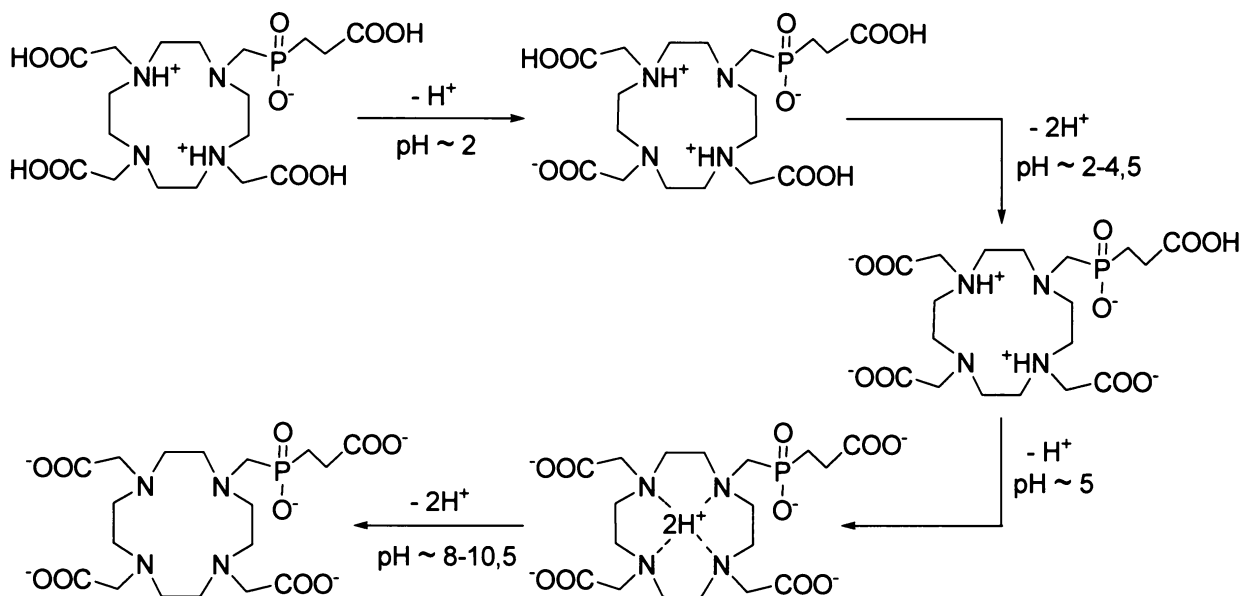
ESTEROVÉ DERIVÁTY CYKLENU

Struktura	Označení	Systematický název
	tBu₂DO2A	bis(<i>tert</i> -butylester) kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan- 1,4-dioctové
	tBu₃DO3A	tris(<i>tert</i> -butylester) kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan- 1,4,7-trioctové
	tBu₄DOTA	tetrakis(<i>tert</i> -butylester) kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan- -1,4,7,10-tetraoctové

2.2.2 VLASTNOSTI POLYKARBOXYLÁTOVÝCH DERIVÁTŮ CYKLENU DŮLEŽITÉ PRO HPLC SEPARACI

Molekuly polykarboxylátových derivátů cyklu obsahují vedle čistě nepolárních částí také značně polární funkční skupiny. Separace tedy může být založena na hydrofobních i hydrofilních interakcích, které se budou uplatňovat různou měrou podle konkrétní sloučeniny. Další pro chromatografii důležitou vlastností polykarboxylátových derivátů cyklu je schopnost tvořit amfionty. Všechny deriváty cyklu totiž ve svých molekulách obsahují aminoskupiny schopné protonizace, kyselé deriváty cyklu navíc ještě karboxylové a fosfinátové resp. fosfonátové skupiny, které se mohou naopak deprotonovat [11] (Obr. 4). V Tab. 1 jsou shrnuty disociační konstanty kyselých derivátů cyklu [11-15]. Výsledný náboj jejich molekul se pohybuje od +3 do -5 podle pH prostředí. Hodnoty disociačních konstant esterových

derivátů cyklenu publikovány nebyly. Lze však očekávat, že záporný logaritmus poslední disociační konstanty terciární aminoskupiny bude přibližně 9-10, sekundární 11-11,5. Hodnota předposlední disociační konstanty bude posunuta asi o jednotku níž.



Obr. 4: Příklad deprotonace polykarboxylátového derivátu cyklenu (H_5DO3AP^{PrA}) v závislosti na pH [11].

Tab. 1: Hodnoty disociačních konstant kyselých derivátů cyklenu

	pK_A (H_6L)	pK_A (H_5L)	pK_A (H_4L)	pK_A (H_3L)	pK_A (H_2L)	pK_A (HL)	literatura
H_4DOTA		2,36	4,13	4,60	9,72	11,90	[12]
H_3DO3A			3,48	4,43	9,24	11,59	[13]
H_4DO3AP^H	1,19	2,18	3,28	4,66	9,42	12,25	[14]
H_5DO3AP^{PrA}	1,93	3,10	4,34	5,04	9,44	12,68	[11]
H_4DO3AP^{ABn}	1,24	2,71	4,11	5,11	9,60	12,55	[11]
H_5DO3AP	1,63	3,09	4,34	6,54	10,35	13,83	[15]

2.3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE (HPLC)

Princip chromatografie byl objeven na počátku 20. století ruským botanikem Cvěttem. Teoretické základy moderní kapalinové chromatografie byly sice položeny již roku 1941 A. J. P. Martinem a R. L. M. Syngem [16], nicméně moderní HPLC pracující za vysokého tlaku se začala používat až o třicet let později. Hlavním důvodem tohoto „zpoždění“ byly obtíže s přípravou stacionární fáze s dostatečně malými a uniformními částicemi. Od té doby urazila HPLC dlouhou cestu a stala se nejpoužívanější analytickou separační metodou vůbec. Nyní se vývoj HPLC ubírá směrem k miniaturizaci kolon a spojování s účinnými metodami detekce, např. spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS).

Hlavní výhodou HPLC je její univerzálnost. S žádnou jinou vysoce účinnou separační metodou v současnosti nelze analyzovat látky polární, nepolární i iontové povahy, těkavé i málo těkavé, s relativní molekulovou hmotností od jednotek do tisíců. Dalšími klady HPLC jsou jistě i možnost ovlivňovat separaci složením mobilní fáze (na rozdíl od plynové chromatografie) a poměrně snadné převedení metody do preparativního měřítka.

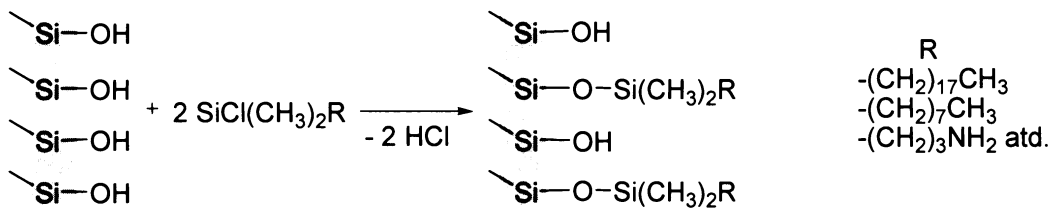
Jako každá metoda má samozřejmě i HPLC některé nevýhody. Tou největší je jistě drahý provoz daný zejména spotřebou velmi čistých rozpouštědel. Oproti plynové chromatografii je navíc pomalejší, méně účinná a náročnější co se instrumentace týče.

2.3.1 CHROMATOGRRAFIE S OBRÁCENÝMI FÁZEMI (RP-HPLC)

Chromatografii jako separační metodu založenou na rozdělování látek mezi dvě nemísitelné fáze lze rozdělit podle dominantního separačního mechanismu do několika kategorií. Jde o adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, iontově párovou, vylučovací a afinitní chromatografii. Při separaci se obvykle uplatňuje více typů interakcí současně.

Chromatografii lze dělit také podle polaritativy stacionární fáze vůči mobilní. Systém tvořený polární stacionární fází a nepolární mobilní se nazývá chromatografií s normálními fázemi. Nejtypičtějším zástupcem normální stacionární fáze je silikagel, jako mobilní fáze se pak používají nepolární rozpouštědla (hexan, heptan, toluen atd.). Pokud je stacionární fáze méně polární než mobilní, jde o chromatografii s obrácenými neboli reverzními fázemi (RP-HPLC). V tomto modu chromatografie se silikagel

používá pouze jako nosič, na který je nepolární stacionární fáze navázána chemicky (Obr. 5). Mobilní fází je potom směs polárního organického rozpouštědla (methanol, acetonitril atd.) a vody. Nejběžnější reverzní fáze jsou tvořeny navázanými oktadecylovými (C18) nebo oktylovými (C8) řetězci. Používají se ale také polárnější stacionární fáze, mezi které patří např. fenylová, aminopropylová nebo kyanopropylová fáze.



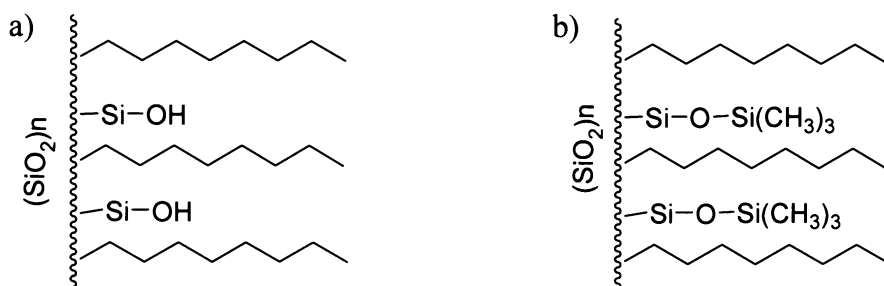
Obr. 5: Schéma přípravy reverzní stacionární fáze.

RP-HPLC s navázanou stacionární fází je v současnosti používána mnohem častěji než chromatografie s normálními fázemi. Oproti normální fázi má totiž řadu výhod – zejména širší okruh analytů, které je na ní možné separovat, rychlé ustavování rovnováhy v koloně, možnost použití relativně levných mobilních fází a lepší reprodukovatelnost. Chemicky vázané fáze na bázi silikagelu mají dvě základní nevýhody. První z nich je omezená stabilita v silně kyselém a bazickém prostředí (využitelný rozsah pH je asi 2-8), druhou pak je přítomnost nezreagovaných silanolových skupin (Si-OH) na povrchu silikagelu (Obr. 6a), které mohou negativně ovlivňovat separaci zejména bazických látek.

2.3.2 VYBRANÉ TYPY STACIONÁRNÍCH FÁZÍ

Klasická reverzní fáze C8 s blokovánými silanolovými skupinami

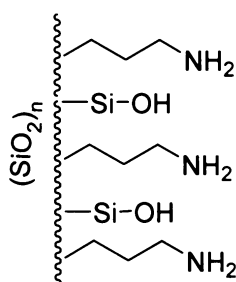
Klasická reverzní fáze C8 je tvořena nerozvětvenými oktylovými řetězci. Zbytkové silanolové skupiny jsou blokovány (tzv. endcappovány) trimethylsilanovými skupinami (Obr. 6b) a proto je přímo výrobcem doporučována pro dělení bazických látek. Separace na této stacionární fázi je založena především na hydrofobních interakcích [17].



Obr. 6: Schéma stacionární fáze s navázanými oktylovými řetězci a volnými (a) resp. endcappovanými (b) silanolovými skupinami.

Aminopropylová stacionární fáze (Biospher PSI 200 NH)

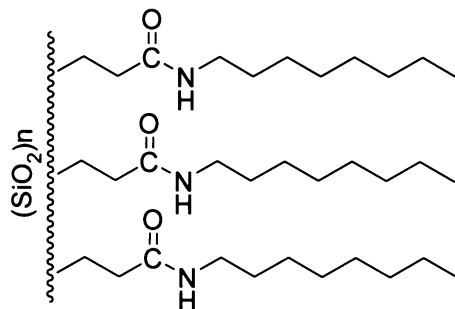
Jedná se o jednu z nejpolarnějších reverzních fází, navíc s nechráněnými zbylými silanolovými skupinami (Obr. 7). Mezi analyty a aminopropylovou stacionární fází se budou uplatňovat zejména hydrofilní interakce. Aminoskupiny a nechráněné silanolové skupiny se navíc mohou chovat jako slabý iontoměnič.



Obr. 7: Schéma aminopropylové stacionární fáze.

N-alkylamidová stacionární fáze (Ascentis RP-Amide)

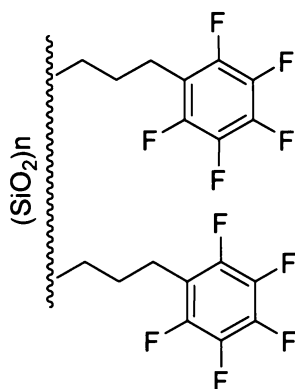
Stacionární fáze se zakotvenou (tzv. embedded) amidovou skupinou (Obr. 8) je jednou z novějších typů kolon a předpokládá se, že časem může jako „kolona první volby“ nahradit klasickou C18. Zakotvené amidové skupiny fungují jako velmi účinné chránění volných silanolových skupin [18]. Oproti klasické C18 mohou být analyty zadržovány nejen prostřednictvím hydrofobních interakcí, ale také přes interakce hydrofilní.



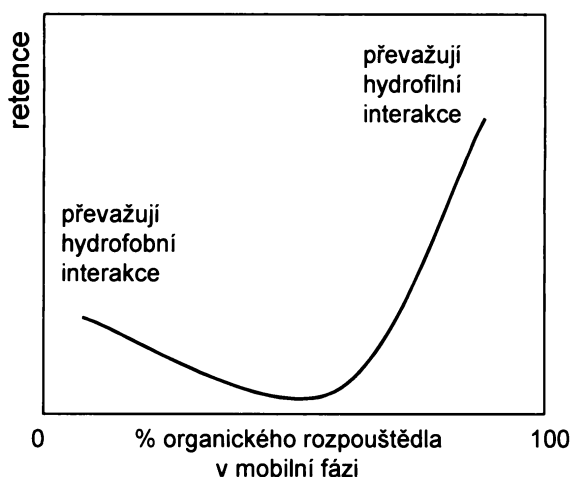
Obr. 8: Schéma N-alkylamidové stacionární fáze.

Pentafluorofenylpropylová stacionární fáze (Discovery HSF5)

Základní charakteristikou pentafluorofenylpropylové stacionární fáze (Obr. 9) je tzv. U-shape retention [19]. Při separaci polárních analytů se totiž podle množství organického rozpouštědla v mobilní fázi chová buď jako reverzní nebo jako normální fáze. Pokud je závislost retence na množství organického modifikátoru v mobilní fázi vynesena do grafu, výsledkem je křivka ve tvaru písmene U (Obr. 10). Při použití mobilní fáze s malým obsahem organické složky je dělení na pentafluorofenylpropylové stacionární fázi založeno převážně na hydrofobních (π - π) interakcích, ale při použití mobilní fáze s vysokým obsahem organického rozpouštědla převažují interakce hydrofilní, zejména iontově výměnné a tvorba vodíkových vazeb mezi analytem a stacionární fází. Právě díky velkému množství možných interakcí je pentafluorofenylpropylová stacionární fáze doporučována pro analýzu látek obtížně separovatelných na klasické reverzní fázi. Nevýhodou této stacionární fáze je poměrně obtížná predikce chování separovaných látek.



Obr. 9: Schéma pentafluorofenylpropylové stacionární fáze.



Obr. 10: Závislost retence na množství organického rozpouštědla v mobilní fázi (U-shape retention).

2.4 DETEKCE V HPLC

Citlivá metoda detekce je stejně důležitá jako vlastní HPLC separace. Nejběžněji používaným typem detektoru je optický UV-VIS, popř. diode array detektor. Měření se provádí při vlnové délce, při které analyt maximálně absorbuje a naopak mobilní fáze absorbuje co nejméně. Existují samozřejmě i látky, pro které UV-VIS detekce není vhodná. Jde především o látky výrazně absorbující jen při vlnových délkách pod 200 nm. V této oblasti UV spektra totiž značně absorbují rozpouštědla běžně používaná jako součást mobilní fáze pro RP-HPLC (acetonitril, methanol).

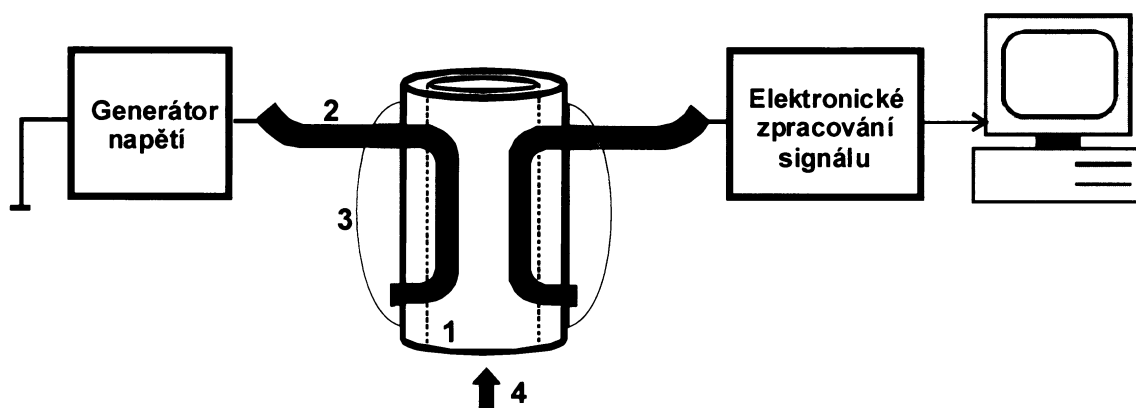
Další možností detekce jsou detektory založené na elektrochemických principech [20-23]. Mezi jejich největší výhody patří relativně snadná konstrukce, velká citlivost a také fakt, že měřenou veličinou je přímo elektrický proud popř. napětí. Nevýhodou je zejména kontakt detekční elektrody s analyzovaným roztokem, který může vést ke změnám na povrchu elektrody a časové nestabilitě signálu. Pro odstranění tohoto nedostatku lze v případě vodivostní detekce použít bezkontaktního uspořádání detekční cely.

2.4.1 BEZKONTAKTNÍ VODIVOSTNÍ DETEKTOR (CCD)

Jednou z možností, jak detekovat nabitě látky, které málo absorbují v UV-VIS oblasti, je použití bezkontaktní vodivostní detekce (CCD) [24, 25]. Ačkoli jde o

poměrně častou metodu detekce v kapilární zónové elektroforéze, v RP-HPLC byla zatím použita pouze sporadicky [26]. Důvodem může být to, že pomocí RP-HPLC je separováno poměrně málo látek majících náboj, který je hlavní podmínkou pro použití CCD detekce. Dalším omezením použití CCD je nutnost použití mobilní fáze o malé vodivosti, tedy bez přídavku kyseliny, pufru nebo iontově párového činidla.

Vlastní CCD detektor je zařízení skládající se z detekční cely se dvěma elektrodami, zdroje vysokofrekvenčního sinusového střídavého napětí a obvodu pro měření proudu (Obr. 11).



Obr. 11: Schéma bezkontaktního vodivostního detektoru (1 - PTFE kapilára, 2 - platinové elektrody pokryté 5 µm vrstvou PTFE, 3 - tavné lepidlo, 4 - výstup mobilní fáze z kolony).

Na první elektrodu je z generátoru přiváděno střídavé napětí o takové frekvenci, aby střídavý proud prošel přes vrstvu izolantu (PTFE obal elektrody) do analyzovaného roztoku. Druhá elektroda slouží jako přijímač elektrického signálu, tzn. střídavého proudu, procházejícího analyzovaným roztokem. Velikost střídavého proudu tekoucího mezi elektrodami závisí nejen na elektrické vodivosti roztoku úměrné koncentraci analytu, ale i na jeho permitivitě. Voda má podstatně větší permitivitu než většina organických látek, z čehož vyplývá jedna z nevýhod bezkontaktní vodivostní detekce – i malá změna obsahu vody v mobilní fázi způsobí velkou změnu signálu CCD, což vede např. k výrazným systémovým píkům [27, 28].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Měření byla prováděna na kapalinovém chromatografu, který se skládal z čerpadla LCP 4000 (Ecom, ČR), spektrofotometrického UV detektoru LCD 2084 (Ecom, ČR) a dávkovacího ventilu s 10 μ l smyčkou (Ecom, ČR). K vývoji metody separace byly použity tyto kolony: RP Select B (C8), 125 \times 4 mm (Merck, SRN), Biospher PSI 200 NH, 150 \times 4,6 mm (Labio, ČR), Ascentis RP-Amide, 250 \times 4,6 mm (Supelco, USA) a Discovery HSF5, 150 \times 4,6 mm (Supelco, USA). Získaná data byla zpracována softwarem CSW 1.7 od firmy Data Apex (Praha, ČR).

Ve druhé fázi práce byl za UV detektor připojen bezkontaktní vodivostní detektor (CCD) zkonstruovaný prof. F. Opekarem na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze [29]. Jako zdroj vysokofrekvenčního sinusového napětí pro CCD byl použit generátor FG 503 (Motech Industries, USA).

3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Methanol a acetonitril LiChrosolv pro HPLC a kyselina mravenčí (98-100%) byly od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Kyselina octová (99%), kyselina trifluoroctová (98%) a triethylamin (99,5%) byly od firmy Fluka (Neu-Ulm, Německo). Kyselina fosforečná (85%), hydrogenfosforečnan sodný, dihydrogenfosforečnan sodný a hydroxid draselný vše v čistotě p.a. byly od firmy Lachema (Brno, ČR).

Všechny studované polykarboxylátové deriváty cyklu s výjimkou *t*Bu₂DO₂A byly syntetizovány skupinou prof. I. Lukeše a doc. P. Hermanna na Katedře anorganické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze podle postupů [11, 30-34]. *t*Bu₂DO₂A byl připraven ing. M. Lorencem na Katedře organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze postupem [35].

Deionizovaná voda používaná v této práci byla připravena přístrojem Milli-Q (Millipore Corporation, USA) pracujícím na principu reverzní osmózy.

3.2.1 PŘÍPRAVA MOBILNÍCH FÁZÍ A VZORKŮ PRO ANALÝZU

Vzorky pro analýzu o koncentracích 1.10^{-3} mol.dm⁻³, 1.10^{-4} mol.dm⁻³ a 5.10^{-5} mol.dm⁻³ byly připraveny rozpuštěním odpovídajících množství polykarboxylátových derivátů cyklu v mobilní fázi a uchovávány v lednici.

Mobilní fáze byly připraveny smísením organického rozpouštědla s deionizovanou vodou, vodným roztokem kyseliny nebo pufru v daném poměru a před použitím 15 minut sonifikovány přístrojem Elmasonic S15H (P-LAB, ČR). Fosforečnanový pufr (pH = 7,1) byl připraven rozpuštěním příslušného množství hydrogenfosforečnanu sodného a dihydrogenfosforečnanu sodného v deionizované vodě. Octanový, mravenčanový a fosforečnanový pufr (pH = 2,1) byl připraven částečným zneutralizováním příslušných kyselin hydroxidem draselným. Hodnoty pH vodné složky mobilní fáze byly měřeny na pH metru Jenway 4330 (Essex, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou.

3.3 EXPERIMENTÁLNÍ PODMÍNKY

Všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě. Dávkovaný objem vzorků byl 10 µl, průtok mobilní fáze byl 0,5 ml.min⁻¹. Pro UV detekci byla zvolena vlnová délka 200 nm. Zdroj vysokofrekvenčního napětí pro CCD pracoval při frekvenci 100 kHz a amplitudě 4 V. Přehled mobilních fází použitých pro vývoj metody separace na jednotlivých kolonách je uveden v tabulkách 2-5.

Tab.2: Přehled mobilních fází použitých pro vývoj metody na koloně RP Select B (část 1)

organická složka	vodná složka	% (v/v)
methanol	deionizovaná voda	85:15
methanol	deionizovaná voda	65:35
methanol	deionizovaná voda	15:85
methanol	10 mM fosforečnanový pufr (pH=2,1)	85:15
methanol	10 mM fosforečnanový pufr (pH=2,1)	35:65
methanol	0,5% kyselina fosforečná (pH=2,1)	85:15

Tab. 2: Přehled mobilních fází použitých pro vývoj metody na koloně RP Select B (část 2)

organická složka	vodná složka	% (v/v)
acetonitril	deionizovaná voda	85:15
acetonitril	deionizovaná voda	65:35
acetonitril	deionizovaná voda	15:85
acetonitril	0,5% kyselina fosforečná (pH=2,1)	85:15
acetonitril	0,5% kyselina fosforečná (pH=2,1)	35:65
acetonitril	0,05% kyselina trifluoroctová (pH=3,0)	50:50
acetonitril	0,05% kyselina trifluoroctová (pH=3,0)	35:65

Tab. 3: Přehled mobilních fází použitých pro vývoj metody na koloně Biospher PSI 200 NH

organická složka	vodná složka	% (v/v)
methanol	deionizovaná voda	85:15
methanol	deionizovaná voda	35:65
methanol	0,1% kyselina mravenčí (pH=2,6)	65:35
methanol	0,1% kyselina mravenčí (pH=2,6)	35:65
methanol	0,05% triethylamin (pH=9,0)	65:35
acetonitril	deionizovaná voda	85:15
acetonitril	deionizovaná voda	65:35
acetonitril	deionizovaná voda	35:65

Tab. 4: Přehled mobilních fází použitých pro vývoj metody na koloně Ascentis RP Amide (část 1)

organická složka	vodná složka	% (v/v)
methanol	deionizovaná voda	85:15
methanol	deionizovaná voda	65:35
methanol	deionizovaná voda	35:65

Tab. 4: Přehled mobilních fází použitých pro vývoj metody na koloně Ascentis RP Amide (část 2)

organická složka	vodná složka	% (v/v)
methanol	10 mM mravenčanový pufr (pH=3,5)	85:15
methanol	10 mM mravenčanový pufr (pH=3,5)	35:65
acetonitril	deionizovaná voda	85:15
acetonitril	deionizovaná voda	65:35
acetonitril	deionizovaná voda	35:65
acetonitril	10 mM mravenčanový pufr (pH=3,5)	85:15
acetonitril	10 mM mravenčanový pufr (pH=3,5)	75:25
acetonitril	10 mM mravenčanový pufr (pH=3,5)	65:35
acetonitril	10 mM mravenčanový pufr (pH=3,5)	35:65
acetonitril	10 mM mravenčanový pufr (pH=3,5)	15:85
acetonitril	10 mM fosforečnanový pufr (pH=7,1)	35:65

Tab. 5: Přehled mobilních fází použitých pro vývoj metody na koloně Discovery HSF5 (část 1)

organická složka	vodná složka	% (v/v)
methanol	deionizovaná voda	95:5
methanol	deionizovaná voda	90:10
methanol	deionizovaná voda	85:15
methanol	deionizovaná voda	65:35
methanol	deionizovaná voda	35:65
methanol	deionizovaná voda	15:85
methanol	10 mM fosforečnanový pufr (pH=2,1)	85:15
methanol	10 mM octanový pufr (pH=4,7)	85:15
acetonitril	deionizovaná voda	85:15
acetonitril	deionizovaná voda	75:25
acetonitril	deionizovaná voda	65:35
acetonitril	deionizovaná voda	35:65

Tab. 5: Přehled mobilních fází použitých pro vývoj metody na koloně
Discovery HSF5 (část 2)

organická složka	vodná složka	% (v/v)
acetonitril	10 mM fosforečnanový pufr (pH=2,1)	75:25
acetonitril	0,1% kyselina mravenčí (pH=2,6)	75:25
acetonitril	10 mM mravenčanový pufr (pH=3,5)	85:15
acetonitril	10 mM octanový pufr (pH=4,7)	75:25

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro vývoj metody separace pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie se obecně pro látky s molární hmotností do 2000, které jsou rozpustné ve vodných roztocích organických rozpouštědel, jako stacionární fáze první volby doporučuje klasická reverzní fáze C8 nebo C18 [36]. Právě takovými látkami jsou polykarboxylátové deriváty cyklenu. Na základě jejich struktury lze předpokládat, že kromě hydrofobních interakcí může být jejich separace založena i na hydrofilních interakcích. Z širokého spektra stacionárních fází proto byly k vývoji metody separace kromě klasické reverzní fáze použity i některé částečně polární reverzní fáze.

Při hledání vhodné mobilní fáze byly nejprve testovány jednoduché dvousložkové směsi organického modifikátoru s vodou. Pokud nebylo dosaženo úspěšné separace, bylo pH mobilní fáze upravováno přidávkem kyseliny, báze nebo pufru.

4.1 KOLONA RP SELECT B

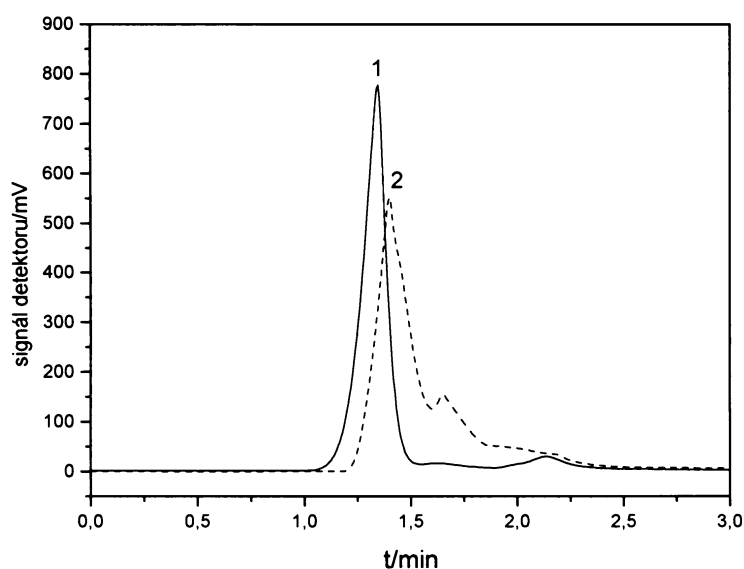
Jak již bylo zmíněno v úvodu, kolona RP Select B je klasickou stacionární fází C8 s blokovými silanolovými skupinami. Pro vývoj metody separace polykarboxylátových derivátů cyklenu byla zvolena jako výchozí stacionární fáze hlavně z toho důvodu, že je díky nízké silanolové aktivitě vhodná pro analýzu bazických látek. Navíc vykazuje poměrně značnou hydrofobicitu, srovnatelnou s některými stacionárními fázemi C18 [37].

4.1.1 JEDNODUCHÉ MOBILNÍ FÁZE

Polykarboxylátové deriváty cyklenu jsou dostatečně rozpustné jak v methanolu tak v acetonitrilu, a proto byla obě tato rozpouštědla použita jako základ mobilních fází (přesné složení viz. Tab. 2, str. 21).

Ačkoli je acetonitril silnější eluční činidlo než methanol, retenční časy polykarboxylátových derivátů cyklenu získané při použití mobilní fáze se stejným

obsahem methanolu resp. acetonitrilu ve vodě se prakticky nelišily. Pravděpodobným důvodem je malé zadržování polykarboxylátových derivátů cyklenu způsobené příliš slabými hydrofobními interakcemi se stacionární fází. Z naměřených chromatogramů nicméně vyplývá, že při použití acetonitrilu jako organického modifikátoru mobilní fáze mají píky polykarboxylátových derivátů cyklenu lepší tvar než pokud je použit methanol (Obr. 12). Navíc při vlnové délce 200 nm acetonitril absorbuje méně než methanol, čímž se zvyšuje citlivost UV detekce. Acetonitril je proto pro přípravu mobilních fází vhodnější než methanol.

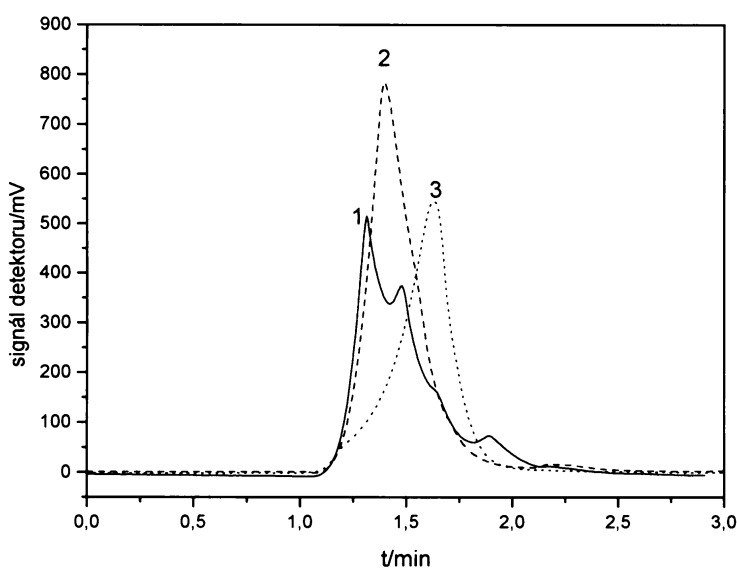


Obr. 12: Chromatogramy $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při použití acetonitrilu (1) resp. methanolu (2) jako organického modifikátoru mobilní fáze. Stacionární fáze: RP Select B; mobilní fáze: acetonitril-voda (85:15, v/v) resp. methanol-voda (65:35, v/v); průtok: 0,5 ml/min; CCD detekce ($f = 100 \text{ kHz}$, $A = 4 \text{ V}$).

Esterové deriváty cyklenu jsou v důsledku chránění karboxylových skupin *tert*-butyly podstatně hydrofobnější než deriváty kyselé a lze proto předpokládat, že na klasické reverzní fázi budou zadržovány více než kyselé deriváty cyklenu. Čím více *tert*-butylových skupin derivát cyklenu obsahuje, tím silnější lze očekávat interakci se stacionární fází. Předpokládané pořadí eluce esterových derivátů cyklenu na oktylové

stacionární fázi je toto: *t*Bu₂DO₂A, *t*Bu₃DO₃A a jako poslední *t*Bu₄DOTA. Mezi jednotlivými kyselými deriváty cyklenu není v hydrofobicitě příliš velký rozdíl. Pouze H₄DO₃AP^{ABn}, který jako jediný ve své molekule obsahuje aromatický kruh a je tudíž hydrofobnější, bude patrně eluovat později než ostatní kyselé deriváty cyklenu.

Použitím „jednoduchých“ mobilních fází, složených pouze z organického rozpouštědla a vody, ale úspěšné separace dosaženo nebylo. Kyselé ani esterové deriváty cyklenu totiž v koloně téměř nebyly zadržovány a eluovaly prakticky s čelem (Obr. 13).



Obr. 13: Chromatogramy *t*Bu₄DOTA (1), H₄DO₃AP^H (2) a H₄DOTA (3), všechny o koncentraci 5·10⁻⁵ mol·dm⁻³. Stacionární fáze: RP Select B; mobilní fáze: methanol-voda (65:35, v/v); průtok: 0,5 ml/min; CCD detekce (f = 100 kHz, A = 4 V).

Ani po značném snížení eluční síly mobilní fáze, tzn. po zmenšení obsahu organické složky v mobilní fázi až na 15% (obj.), nedošlo k žádné patrné změně v zadržování polykarboxylátových derivátů cyklenu. Jednou z možných příčin může být to, že při používání mobilní fáze o zhruba neutrálním pH jsou jak kyselé tak bazické deriváty cyklenu přítomny v podobě iontů. Esterové deriváty cyklenu totiž mají při pH kolem 7 protonovány dva atomy dusíku, kyselé deriváty cyklenu ještě navíc disociované karboxylové a fosfinátové resp. fosfonátové skupiny. Jejich afinita

k polární mobilní fázi pak jednoznačně převáží nad hydrofobními interakcemi se stacionární fází.

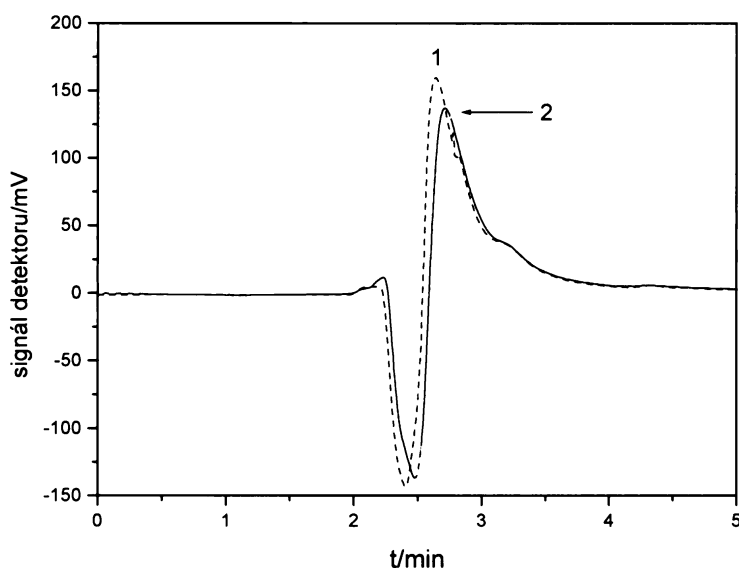
Obr. 13 dále dokumentuje poměrně překvapivou věc – retenční čas hlavního píku esterového derivátu cyklenu nejen, že se téměř neliší od retenčních časů kyselých derivátů cyklenu, ale je dokonce kratší, což odporuje principům dělení na klasické reverzní fázi. Až z pozdějších experimentů vyplynulo, že jde o příměs iontové povahy ve vzorku *t*Bu₄DOTA, která poskytuje výrazný signál na CCD detektoru. Tento problém je více diskutován v kapitole o dělení esterových derivátů cyklenu (4.1.3).

4.1.2 MOBILNÍ FÁZE S PŘÍDAVKEM KYSELINY NEBO PUFRU

Jednou z možností, jak ovlivnit chromatografické chování polykarboxylátových derivátů cyklenu, je úprava pH mobilní fáze. Ideální pro dělení esterových derivátů cyklenu by byla hodnota pH mobilní fáze nad 10, která by zaručovala, že žádný z atomů dusíku nebude protonován a tudíž molekuly derivátů cyklenu budou nenabitě. Takto vysoké pH mobilní fáze však není možné použít, jelikož pak dochází k rozpouštění silikagelového základu stacionární fáze a kolona ztrácí svoji účinnost.

Volba vhodného pH mobilní fáze je u kyselých derivátů cyklenu o něco náročnější než u derivátů esterových. Je to dáno zejména amfionickým charakterem kyselých derivátů cyklenu. Pro každý amfiont sice lze najít pH izoelektrického bodu (tzn. pH, při kterém je molekula jako celek elektroneutrální), nicméně jednotlivé kyselé deriváty cyklenu mají pH izoelektrického bodu lehce odlišné a není tedy možné najít jednu hodnotu pH, při které by všechny kyselé deriváty cyklenu byly navenek nenabitě. Částečným řešením je použití mobilní fáze o pH mezi 2 a 3, které není natolik kyselé, aby vedlo k hydrolyze siloxanových vazeb a tím ke zmenšení účinnosti kolony. Přitom je ale dostatečně nízké na zajištění plné protonizace karboxylových skupin. Použití mobilní fáze o pH mezi 2 a 3 tedy povede k částečnému snížení hydrofilního charakteru kyselých derivátů cyklenu.

Při použití mobilních fází obsahujících stejný podíl organického modifikátoru, jejichž pH bylo upraveno na stejnou hodnotu jednou fosforečnanovým pufrem a podruhé kyselinou fosforečnou (přesné složení mobilních fází viz. Tab. 2 na str. 21), byly získány velice podobné výsledky (např. Obr. 14).

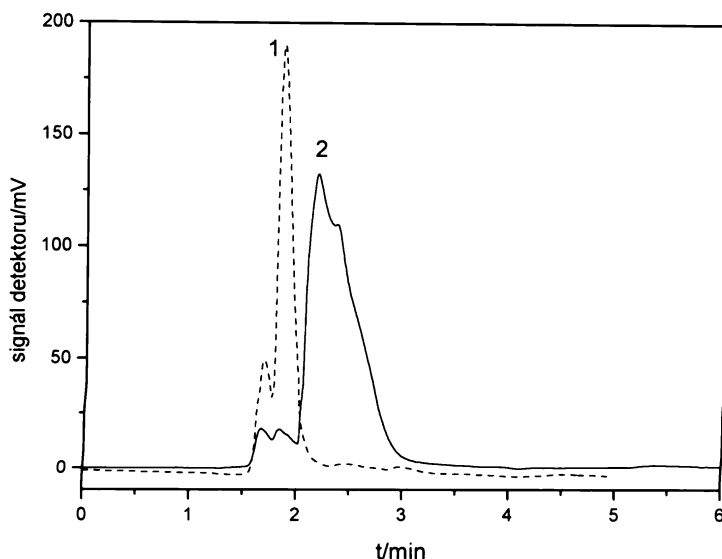


Obr. 14: Chromatogramy H_4DOTA o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při použití kyseliny fosforečné (1) resp. fosforečnanového pufru (2) k úpravě pH mobilní fáze. Stacionární fáze: RP Select B; mobilní fáze: acetonitril-10 mM fosforečnanový pufr (85:15, v/v) resp. acetonitril-0,5% kyselina fosforečná (85:15, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm.

Z chromatogramů je patrné, že H_4DOTA poskytuje o něco větší signál (větší výška i plocha píku) při použití kyseliny fosforečné než pokud je součástí mobilní fáze fosforečnanový pufr. Hodnotu pH mobilní fáze je tedy výhodnější upravit pouze kyselinou než tlumivým roztokem. Detekce polykarboxylátových derivátů cyklenu je pak citlivější a navíc při použití kyseliny je nižší riziko vysrážení solí v koloně než při použití pufru.

Pro přípravu mobilních fází obsahujících kyselinu nebo pufr byl opět použit methanol i acetonitril. Stejně jako u „jednoduchých“ mobilních fází měly píky polykarboxylátových derivátů cyklenu lepší tvar, pokud byl jako organický modifikátor mobilní fáze použit acetonitril.

Oproti očekávání se i po přidání kyseliny fosforečné do mobilní fáze a tudíž po snížení hodnoty pH mobilní fáze z hodnoty 7,0 na hodnotu 2,1, zadržování kyselých derivátů cyklenu nezměnilo – stále eluovaly téměř s čelem. Na koloně se však začaly zadržovat esterové deriváty cyklenu (Obr. 15).

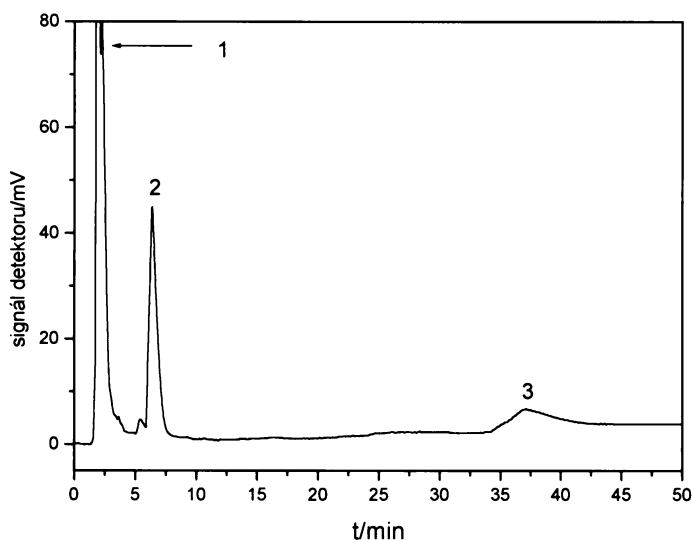


Obr. 15: Chromatogramy $\text{H}_4\text{DO3AP}^{\text{H}}$ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (1) a $t\text{Bu}_2\text{DO2A}$ o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (2). Stacionární fáze: RP Select B; mobilní fáze: acetonitril-0,5% kyselina fosforečná, $\text{pH} = 2,1$ (35:65, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm.

4.1.3 DĚLENÍ ESTEROVÝCH DERIVÁTŮ CYKLENU

Při separaci esterových derivátů cyklenu byl podle očekávání nejméně zadržován $t\text{Bu}_2\text{DO2A}$, který eluoval s retenčním časem velice blízkým kyselým derivátům cyklenu. Jako druhý eluoval, opět v souladu s předpokladem, derivát $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ a až jako poslední $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ (Obr. 16).

Vlastní změna pH mobilní fáze však nemůže být důvodem, proč začaly být esterové deriváty cyklenu v koloně zadržovány. Esterové deriváty cyklenu mají jak při pH kolem 2, tak při neutrálním pH dva atomy dusíku ve své molekule protonovány a na okyselení mobilní fáze tedy nemohou reagovat změnou struktury, která by ovlivnila jejich chromatografické chování. Jako pravděpodobnější příčina zadržování esterových derivátů cyklenu se jeví spíše to, že disociované molekuly kyseliny fosforečné interagují s protonovanými atomy dusíku esterových derivátů cyklenu, tzn. chovají se částečně jako iontově párové činidlo.



Obr. 16: Chromatogram směsi $t\text{Bu}_2\text{DO}_2\text{A}$ (1), $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$ (2) a $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ (3), všechny o koncentraci $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Stacionární fáze: RP Select B; mobilní fáze: acetonitril-0,5% kyselina fosforečná, pH = 2,1 (35:65, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm.

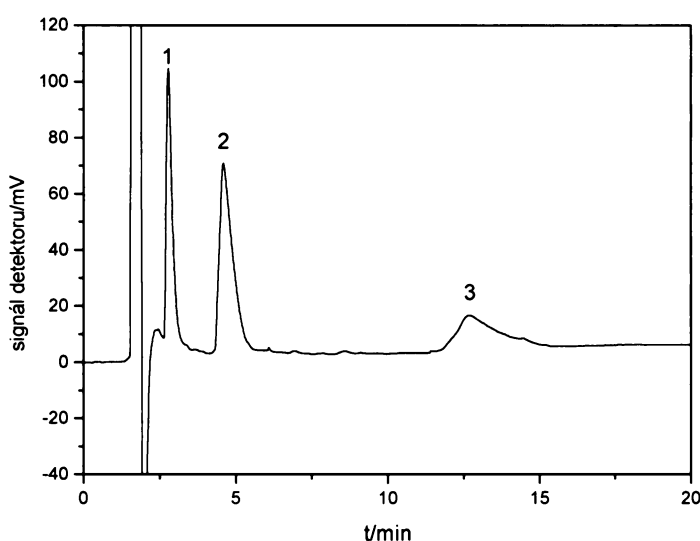
Klasická iontově párová činidla (např. oktansulfonan sodný) se používají k dělení nabitých látek, které jsou pro nedostatek hydrofobních interakcí obtížně separovatelné na klasické reverzní fázi. Přidáním iontově párového činidla do mobilní fáze dojde k vytvoření dvojice činidlo-analyt, které se projeví potlačením náboje analytu a současně nárustem hydrofobicity vlivem dlouhého alkylového řetězce iontově párového činidla. Obecně se však doporučuje použít iontově párové činidlo jen pokud se nepodaří nalézt jiné podmínky separace [36]. Hlavním důvodem je zejména to, že iontově párová činidla se těžko vymývají z kolony a mohou poškozovat stacionární fáze na bázi silikagelu. Pro použití v preparativním HPLC jsou nevhodná úplně.

Kyselina fosforečná se sice částečně chová jako iontově párové činidlo, nicméně při jejím použití se není třeba obávat výše popsaných negativních efektů iontově párových činidel. Po jejím přidání do mobilní fáze došlo k potlačení nábojů esterových derivátů cyklenu, čímž se výrazně snížila jejich afinita k mobilní fázi. Esterové deriváty cyklenu pak byly zadržovány v koloně zejména na základě hydrofobních interakcí *terc*-butylových skupin se stacionární fází.

Ačkoli byly esterové deriváty cyklenu v mobilní fázi o složení acetonitril-0,5% kyselina fosforečná (35:65, v/v) úspěšně odděleny, nelze tyto podmínky separace

označit za optimální. Hlavním důvodem je příliš dlouhý retenční čas $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ a překrývání píku $t\text{Bu}_2\text{DO}_2\text{A}$ s píkem eluujícím s mrtvým časem (Obr. 16).

Podstatně lepšího dělení esterových derivátů cyklenu bylo dosaženo po upravení mobilní fáze přidáním kyseliny trifluoroctové, která se stejně jako kyselina fosforečná chová částečně jako iontově párové činidlo. Při použití mobilní fáze acetonitril-0,05% kyselina trifluoroctová (50:50, v/v) eluovaly studované esterové deriváty cyklenu dle předpokladu v pořadí rostoucí hydrofobicity. Píky všech esterových derivátů cyklenu byly rozděleny až k základní linii a doba analýzy navíc nepřesáhla 20 minut (Obr. 17).



Obr. 17: Chromatogram směsi $t\text{Bu}_2\text{DO}_2\text{A}$ (1), $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$ (2) a $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ (3), všechny o koncentraci $3,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Stacionární fáze: RP Select B; mobilní fáze: acetonitril-0,05% kyselina trifluoroctová, pH = 2,1 (50:50, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm.

Jednou z možností jak v budoucnu ještě zlepšit podmínky separace esterových derivátů cyklenu je využití gradientové eluce. Vyvinutím vhodného gradientu by bylo možné separovat esterové deriváty cyklenu v kratším čase, čímž by se také zlepšil tvar píku $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$, který eluuje jako poslední a je tudíž nejvíce rozmytý.

Z Obr. 16 a 17 je také patrné, že s mrtvým časem eluuje velice intenzivní pík, jehož původ byl nejasný. Proto byly naměřeny chromatogramy jednotlivých esterových

derivátů cyklenu v okyselených mobilních fázích. Ukázalo se, že tento pík poskytují vedle píku příslušného esterového derivátu cyklenu pouze *t*Bu₃DO3A a *t*Bu₄DOTA, nevyskytuje se však u *t*Bu₂DO2A.

Pík eluující s čelem je tedy pravděpodobně píkem příměsí *t*Bu₃DO3A a *t*Bu₄DOTA. Polykarboxylátové deriváty cyklenu používané v této práci totiž nemusí být dokonale čisté látky. Jejich čistota sice byla kontrolována hmotnostní spektrometrií a nukleární magnetickou rezonancí, ale k odhalení malého množství příměsí v polykarboxylátovém derivátu cyklenu nejsou tyto metody dostatečně účinné. Velká intenzita signálu píku získaném jak při použití CCD tak UV detektoru ukazuje, že jde o látku nabitou, která značně absorbuje při vlnové délce 200 nm.

Nejpravděpodobnější příměsí se zdála být kyselina bromovodíková, která vzniká v průběhu syntézy esterových derivátů cyklenu. V mobilní fázi je dostatečně disociována a proto poskytuje intenzivní signál na CCD detektoru, navíc značně absorbuje v oblasti kolem 200 nm. K ověření, zda kyselina bromovodíková je skutečně onou příměsí, byla použita metoda tzv. spikování. Nejprve byl naměřen chromatogram samotného *t*Bu₃DO3A. Do téhož vzorku *t*Bu₃DO3A pak bylo přidáno malé množství kyseliny bromovodíkové a opět naměřen chromatogram. Porovnáním obou chromatogramů se ukázalo, že pík příměsí výrazně narostl, zatímco velikost píku *t*Bu₃DO3A zůstala prakticky nezměněna. Tím se potvrdilo, že nečistotou v *t*Bu₃DO3A a *t*Bu₄DOTA je skutečně kyselina bromovodíková. V *t*Bu₂DO2A se nevyskytuje pravděpodobně proto, že nebyl krystalizován přímo z reakční směsi, ale nejprve přečištěn sloupcovou chromatografií a tudíž zbaven zbytku kyseliny bromovodíkové.

4.2 KOLONA BIOSPHER PSI 200 NH

Při dalším vývoji metody separace kyselých derivátů cyklenu byla vyzkoušena kolona Biospher PSI 200 NH. Stacionární fáze s aminopropylovými řetězci je podstatně polárnější než klasická reverzní fáze a proto by se na ní měly kyselé deriváty cyklenu více zadržovat. Aminoskupiny stacionární fáze se navíc v kyselém prostředí chovají jako slabý iontoměnič.

4.2.1 MOBILNÍ FÁZE S METHANOLEM

Při použití mobilních fází obsahujících pouze methanol a vodu (přesné složení viz. Tab. 3 na str. 22) kyselé deriváty cyklenu z kolony neeluovaly ani po 120 minutách analýzy nebo byly jejich píky již natolik rozmyté, že splynuly se základní linií. Hydrofilní interakce kyselých derivátů cyklenu s aminoskupinami stacionární fáze byly patrně natolik silné, že se ani použitím mobilní fáze methanol – voda (85:15, v/v) nepovedlo kyselé deriváty cyklenu vymýt z kolony.

K potlačení hydrofilních interakcí kyselých derivátů cyklenu s volnými silanolovými skupinami stacionární fáze, které také přispívají značnou měrou k zadržování, byl do mobilní fáze přidán triethylamin (TEA) [38, 39]. Ani tento pokus o zmenšení hydrofilních interakcí nebyl úspěšný, jelikož kyselé deriváty cyklenu se z kolony opět nepovedlo vymýt. Jedinou pozorovatelnou změnou oproti předchozím mobilním fázím bylo podstatné zvětšení šumu základní linie.

Při okyselení mobilní fáze kyselinou mravenčí (hodnota pH mobilní fáze byla 2,6) se zvýší iontoměničový charakter kolony tzn. aminoskupina stacionární fáze se začne chovat jako slabý anex. Snížením hodnoty pH je také částečně potlačena disociace karboxylových skupin kyselých derivátů cyklenu, čímž by se měla o něco snížit jejich hydrofilita. Fosfinátové a fosfonátové skupiny kyselých derivátů cyklenu zůstávají za těchto podmínek disociované a tedy schopné interagovat se slabým anexem. Ani při těchto podmínkách však k úspěšné separaci nedošlo – kyselé deriváty cyklenu opět ani po 120 minutách analýzy neeluovaly z kolony.

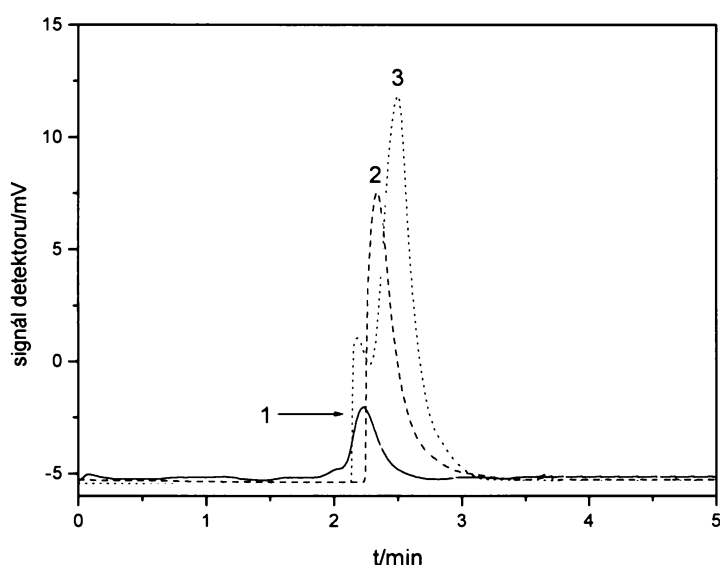
4.2.2 MOBILNÍ FÁZE S ACETONITRILEM

Acetonitril byl pro přípravu mobilních fází (přesné složení viz. Tab. 3 na str. 22) použit zejména proto, že je silnějším elučním činidlem než methanol. Navíc je pravděpodobné, že stejně jako na koloně RP Select B budou mít píky polykarboxylátových derivátů cyklenu lepší tvar, pokud bude organickým modifikátorem mobilní fáze acetonitril než methanol.

Kyselé deriváty cyklenu skutečně začaly z kolony eluovat, k jejich vymytí dokonce stačila mobilní fáze o složení acetonitril – voda (35:65, v/v). V literatuře [40]

se nicméně uvádí, že mobilní fáze, kde je organickým modifikátorem jednou methanol a podruhé acetonitril, mají zhruba stejnou eluční sílu, pokud obsahují asi o 15 procent methanolu více než acetonitrilu. Eluční síla mobilní fáze o složení acetonitril – voda (35:65, v/v) by tedy měla být srovnatelná s eluční silou mobilní fáze methanol – voda (50:50, v/v). Tento rozpor s literaturou může být způsoben tím, že na rozdíl od acetonitrilu může methanol tvořit vodíkové vazby jak s aminopropylovou stacionární fází tak s kyselými deriváty cyklenu, což má jistě vliv na zadržování analytů v této koloně.

Ačkoli byly kyselé deriváty cyklenu na aminopropylové stacionární fázi zadržovány, k jejich separaci nedošlo (Obr. 18). Mezi analyzovanými látkami a stacionární fází sice patrně vznikají hydrofilní interakce, ale pouze na jejich základě nelze jednotlivé kyselé deriváty cyklenu od sebe oddělit.



Obr. 18: Chromatogramy H_4DOTA (1), H_4DO3AP^H (2) a H_4DO3AP^{ABn} (3), všechny o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Stacionární fáze: Biospher PSI 200 NH; mobilní fáze: acetonitril-voda (35:65, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm.

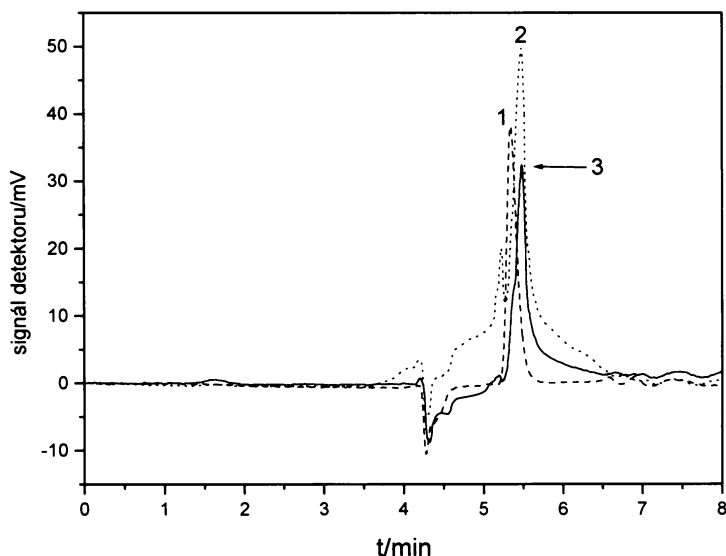
4.3 KOLONA ASCENTIS RP-AMIDE

Jak vyplývá z předchozích kapitol, separace kyselých derivátů cyklenu založená čistě na hydrofobních nebo čistě na hydrofilních interakcích mezi stacionární fází a

analyzovanými látkami nebyla úspěšná. Proto byla pro další vývoj metody zvolena stacionární fáze se zakotvenou amidovou skupinou, na které sice převažují hydrofobní interakce mezi separovanými látkami a alkylovými řetězci stacionární fáze, ale zakotvená amidová skupina je doplňuje o interakce hydrofilní, zejména tvorbu vodíkových vazeb [41]. Podle [42] navíc stacionární fáze se zakotvenou amidovou skupinou vykazuje větší selektivitu při separaci bazických a amfionických látek, jakými jsou i polykarboxylátové deriváty cyklu, než klasická reverzní fáze.

4.3.1 JEDNODUCHÉ MOBILNÍ FÁZE

Stejně jako na koloně RP Select B byly i na koloně Ascentis RP-Amide nejprve vyzkoušeny mobilní fáze složené pouze z organického modifikátoru a vody (přesné složení viz. Tab. 4 na str. 22). Kyselé i esterové deriváty cyklu eluovaly prakticky se stejným retenčním časem, bez ohledu na obsah methanolu resp. acetonitrilu v mobilní fázi (Obr. 19).

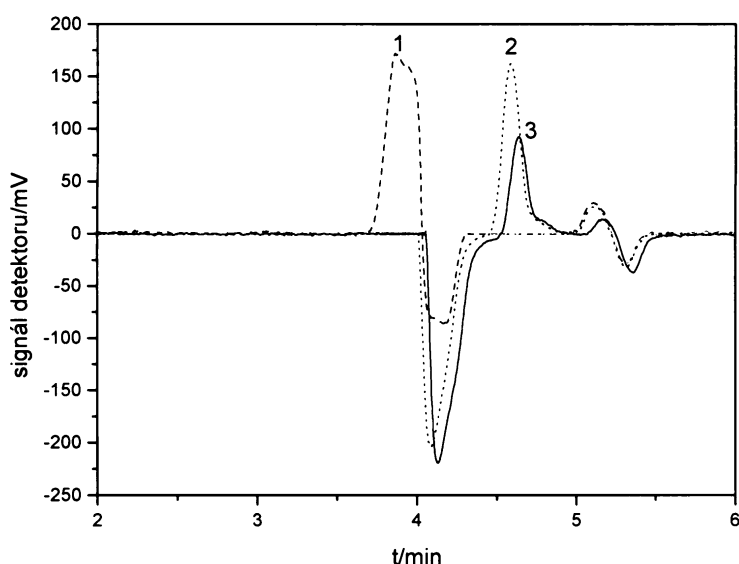


Obr. 19: Chromatogramy vzorků H_4DO3AP^{ABn} (1), tBu_4DOTA (2) a H_5DO3AP^{PrA} (3), všechny o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Stacionární fáze: Ascentis RP-Amide; mobilní fáze: acetonitril-voda (65: 35, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm.

Zadržování a selektivita polykarboxylátových derivátů cyklenu na stacionární fázi se zakotvenou amidovou skupinou se při použití jednoduchých mobilních fází tedy nijak výrazně neliší od zadržování na klasické reverzní fázi.

4.3.2 MOBILNÍ FÁZE OBSAHUJÍCÍ PUFŘ

Použití mobilních fází tvořených organickým modifikátorem a mravenčanovým pufrem (přesné složení viz. Tab. 4 na str. 22) vedlo k zajímavým výsledkům. Ačkoli kyselé deriváty cyklenu stále eluovaly prakticky s čelem, esterové deriváty cyklenu začaly být zadržovány (Obr. 20). Čím větší eluční sílu měla mobilní fáze, tím dříve eluovaly, což přesně odpovídá pravidlům zadržování látek na klasické reverzní fázi.



Obr. 20: Chromatogramy vzorků H_4DO3AP^{ABn} (1), tBu_4DOTA (2) a tBu_3DO3A (3), všechny o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Stacionární fáze: Ascentis RP-Amide; mobilní fáze: acetonitril – 10 mM mravenčanový pufř (75:25, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm.

K úspěšné separaci esterových derivátů cyklenu přesto nedošlo, jelikož ani v mobilní fázi methanol – voda (35:65, v/v) neeluovaly s dostatečně rozdílnými retenčními časy. Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.1.3, snížení hodnoty pH mobilní fáze nemá vliv na strukturu esterových derivátů cyklenu. Jednou z možností samozřejmě je,

že se mravenčanový pufr chová částečně jako iontově párové činidlo, tedy stejně jako např. kyselina trifluoroctová na koloně RP Select B. Proti této variantě ale hovoří fakt, že $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ a $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ eluují prakticky současně. Spíše tedy dochází k zadržování esterových derivátů cyklenu na základě jejich interakcí se zakotvenou amidovou skupinou stacionární fáze. Právě tyto interakce pak budou patrně ovlivněny přítomností mravenčanového pufru v mobilní fázi.

4.4 KOLONA DISCOVERY HSF5

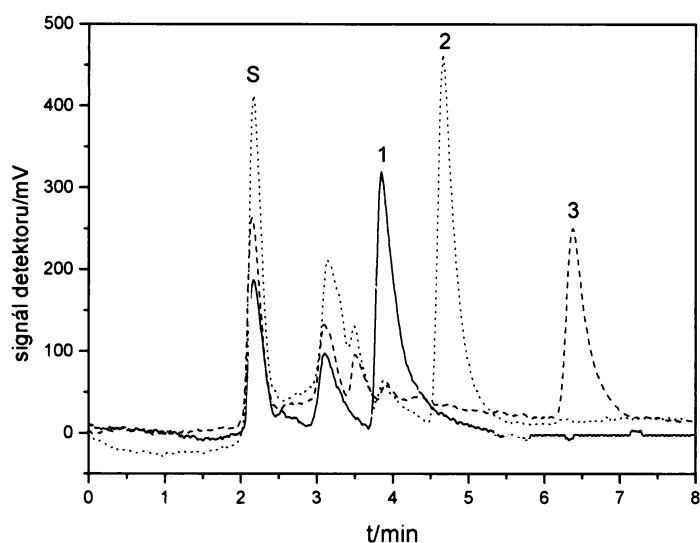
Separace polárních látek, tedy i polykarboxylátových derivátů cyklenu, na pentafluorofenylpropylové stacionární fázi může být, jak již bylo zmíněno v úvodu, založena jak na hydrofilních, tak na hydrofobních interakcích. Tato kolona byla vybrána pro dělení polykarboxylátových derivátů cyklenu zejména proto, že se při separaci uplatní hydrofilní interakce podstatně větší měrou než na koloně Ascentis RP-Amide [37], zvláště pokud bude použita mobilní fáze s vysokým obsahem organického modifikátoru.

4.4.1 JEDNODUCHÉ MOBILNÍ FÁZE

Při použití mobilních fází s vysokým obsahem methanolu nebo acetonitrilu (přesné složení viz. Tab. 5 na str. 23) se kyselé deriváty cyklenu začaly separovat. Čím více organického modifikátoru mobilní fáze obsahovala, tím více byly na koloně zadržovány, ale tím horší také byl tvar jejich píků. Nejlepších výsledků dělení kyselých derivátů cyklenu bylo dosaženo v mobilní fázi o složení methanol-voda (85:15, v/v), která je vhodným kompromisem mezi zadržováním jednotlivých separovaných látek a rozmýváním jejich píků (Obr. 21).

Pořadí eluce jednotlivých derivátů cyklenu je obtížně predikovatelné, jelikož přesný mechanismus zadržování polárních látek na pentafluorofenylpropylové stacionární fázi ještě nebyl úplně objasněn. Za základ separace při použití mobilní fáze s vysokým obsahem organického modifikátoru je považován iontově výměnný mechanismus a významně k dělení přispívá i tvorba vodíkových můstků [19, 43]. Lze

tedy předpokládat, že rozhodující vliv na různé zadržování jednotlivých kyselých derivátů cyklenu budou mít hodnoty jejich disociačních konstant (K_a) a schopnost tvořit vodíkové vazby.



Obr. 21: Chromatogramy vzorků H_4DOTA (1), H_5DO3AP^{PrA} (2) a H_4DO3AP^{ABn} (3), všechny o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Systémový pík je v chromatogramech označen písmenem S. Stacionární fáze: Discovery HSF5; mobilní fáze: methanol-voda (85:15, v/v); průtok: 0,5 ml/min; CCD detekce ($f = 100 \text{ kHz}$, $A = 4 \text{ V}$).

Při separaci kyselých derivátů cyklenu na koloně Discovery HSF5 nebyl žádný zásadní rozdíl mezi tím, když byl jako základ mobilní fáze použit methanol nebo acetonitril. Podobných retenčních časů jednotlivých kyselých derivátů cyklenu bylo dosaženo pokud mobilní fáze obsahovala asi o 10 % méně acetonitrilu než methanolu. Podle [44] by však měly být látky s alespoň částečně bazickým charakterem zadržovány podstatně více, pokud je organickým modifikátorem acetonitril a ne methanol. Důvodem, proč se kyselé deriváty cyklenu chovají odlišně, mohou být jiné podmínky experimentů – látky studované v [44] neměly amfionický charakter a testované mobilní fáze navíc obsahovaly maximálně 70 % acetonitrilu nebo methanolu.

Ačkoli by látky s alespoň částečným bazickým charakterem měly být na pentafluorofenylpropylové stacionární fázi zadržovány i při použití mobilních fází s malým obsahem organického rozpouštědla [19], kyselé deriváty cyklenu s výjimkou

H_4DO3AP^{ABn} eluovaly i v mobilních fázích o složení methanol-voda (15:85, v/v) nebo acetonitril-voda (35:65, v/v) úplně s čelem. Pravděpodobně jsou kyselé deriváty cyklenu příliš polární na to, aby se v koloně zadržovaly převážně na základě hydrofobních interakcí. Tento fakt je jen dalším potvrzením výsledků získaných na klasické reverzní fázi.

4.4.2 MOBILNÍ FÁZE OBSAHUJÍCÍ PUFŘ

Pokud je základem separace kyselých derivátů cyklenu na koloně Discovery HSF5 iontově výměnný mechanismus, lze jejich zadržování ovlivnit okyselením mobilní fáze [19]. Hodnota pH mobilní fáze má totiž vliv jak na disociaci analyzovaných látek, tak na disociaci volných silanolových skupin stacionární fáze. Čím vyšší je hodnota pH, tím více volných silanolových skupin je disociováno a o to silnější pak jsou iontové interakce mezi analyzovanými látkami a stacionární fází.

Ideální hodnota pH mobilní fáze z hlediska disociace analyzovaných látek by byla taková, při které by kyselé deriváty cyklenu měly protonované aminoskupiny a současně nedisociované karboxylové a fosfinátové resp. fosfonátové skupiny, čímž by mohly vytvořit maximum jak iontových interakcí, tak vodíkových vazeb se stacionární fází. Jak již bylo diskutováno v kapitole 4.1.2, bohužel neexistuje jedna hodnota pH, při které by všechny kyselé deriváty cyklenu splňovaly předchozí podmínky.

I přesto byly vyzkoušeny mobilní fáze s rozdílnými hodnotami pH (přesné složení viz. Tab. 5 na str. 23). Kyselé deriváty cyklenu sice byly při použití okyselených mobilních fází zadržovány, ale lepších výsledků separace bylo dosaženo v jednoduchých mobilních fázích, jejichž pH je téměř neutrální.

Na dělení částečně bazických látek na koloně Discovery HSF5 má podle [43] vliv také koncentrace iontů v mobilní fázi. Je pravděpodobné, že další optimalizací koncentrace pufru v mobilní fázi by bylo možné dosáhnout lepšího dělení kyselých derivátů cyklenu.

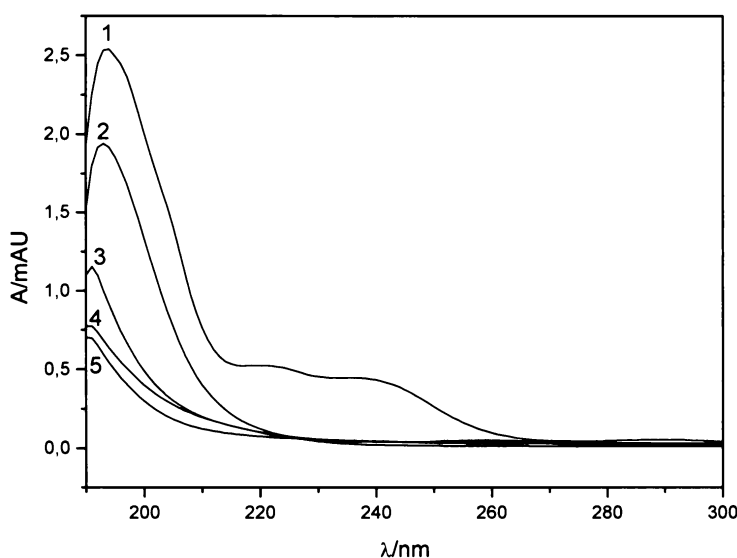
Metoda separace, při které je mobilní fáze upravena přidávkem pufru, má oproti metodě dělení využívající mobilní fázi složenou pouze z methanolu resp. acetonitrilu a vody několik nevýhod jako např. obtížnou převeditelnost do preparativního měřítka

nebo nízkou citlivost CCD detekce. Proto se jako nejvhodnější pro separaci kyselých derivátů cyklenu na koloně Discovery HSF5 zdají být podmínky zmíněné již v odstavci 4.4.1., tzn. mobilní fáze o složení methanol-voda (85:15, v/v).

4.5 DETEKCE

4.5.1 UV DETEKCE

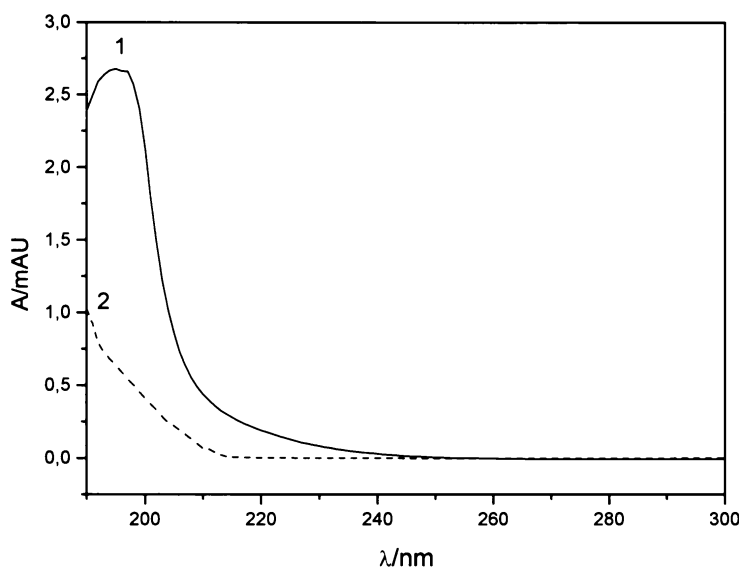
Studované polykarboxylátové deriváty cyklenu absorbují velmi slabě v UV oblasti. S výjimkou H_4DO3AP^{ABn} , který ve své molekule obsahuje aromatický kruh, totiž tyto látky v molekulách neobsahují žádný výrazný chromofor. Z naměřených UV spekter vyplývá, že všechny polykarboxylátové deriváty cyklenu maximálně absorbují při vlnové délce mezi 190 a 200 nm (Obr. 22, pro přehlednost jsou ukázána spektra pouze některých derivátů cyklenu).



Obr. 22: UV spektra vzorků H_4DO3AP^{ABn} (1), tBu_4DOTA (2), H_4DO3AP^H (3), H_5DO3AP^{PrA} (4) a H_3DO3A (5), všechny o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rozpuštěny v 65% methanolu. Měřeno proti 65% methanolu v 1 cm křemenné kyvetě.

Při volbě optimální vlnové délky pro detekci polykarboxylátových derivátů cyklenu bylo třeba vzít v úvahu, že použité organické modifikátory mobilní fáze

(methanol a acetonitril) také značně absorbují při vlnových délkách kolem 200 nm (Obr. 23). Jako nejvhodnější byla pro detekci po porovnání spekter na Obr. 22 a 23 vybrána vlnová délka 200 nm.



Obr. 23: UV spektra methanolu (1) a acetonitrilu (2). Měřeno proti deionizované vodě v 1 cm křemenné kyvetě.

4.5.2 BEZKONTAKTNÍ VODIVOSTNÍ DETEKCE (CCD)

Polykarboxylátové deriváty cyklenu poskytují i při zvolené vlnové délce poměrně slabý signál na UV detektoru, zejména pokud je jako organický modifikátor mobilní fáze použit methanol. Proto byl hledán ještě jiný způsob detekce, kterým by bylo možné tyto látky detekovat citlivěji.

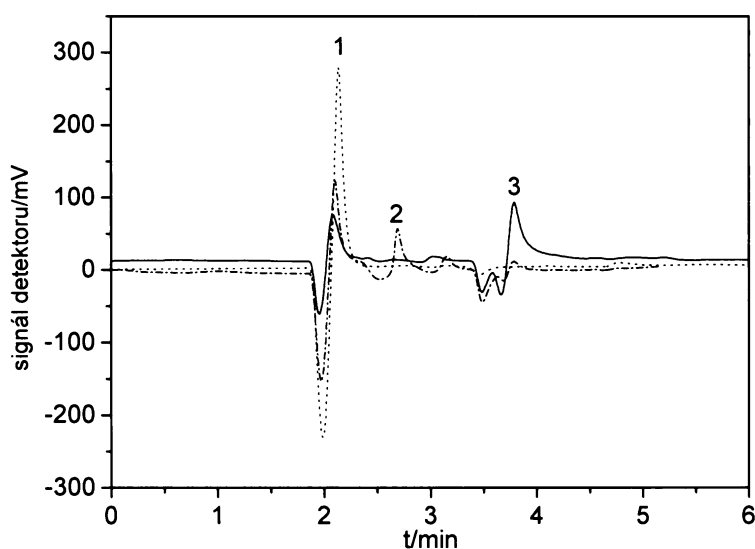
Použití bezkontaktního vodivostního detektoru se z celé řady možných metod detekce zdálo být nejvhodnější. Jak již bylo zmíněno v úvodu, jde o způsob detekce, kterým je možné stanovit nabitě látky i ve velmi nízkých koncentracích. Vzhledem k tomu, že polykarboxylátové deriváty cyklenu jsou látky amfionické povahy, mající podle pH okolního prostředí výsledný náboj +3 až -5, jsou ideálními analyty pro bezkontaktní vodivostní detekci.

Velký vliv na citlivost bezkontaktní vodivostní detekce má frekvence budícího střídavého napětí. Optimální frekvence závisí jednak na geometrii detekční cely, ale

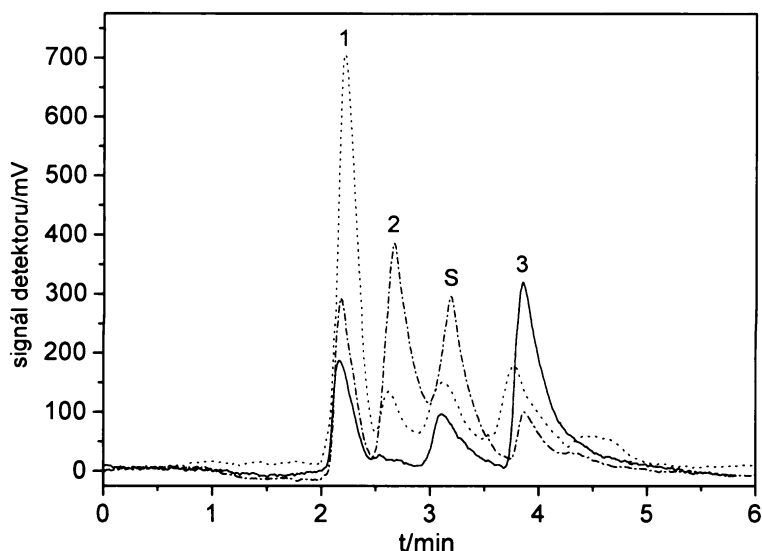
také na vodivosti mobilní fáze [45]. Nejlepších výsledků s CCD detektorem by mělo být dosaženo především v málo vodivých mobilních fázích tzn. bez přídavku kyseliny nebo pufru. Proto byla při hledání nejvhodnější frekvence budícího střídavého napětí použita mobilní fáze methanol-voda (65:35, v/v). Optimalizace byla provedena měřením odezvy stejného vzorku polykarboxylátového derivátu cyklenu ($H_4DO_3AP^{ABn}$) při frekvencích 20, 50, 100, 150 a 200 kHz. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo při frekvenci 100 kHz, a proto byla tato frekvence zvolena jako optimální a používána při dalších měřeních.

4.5.3 SROVNÁNÍ UV A CCD DETEKCE

Při separaci polykarboxylátových derivátů cyklenu v jednoduchých mobilních fázích poskytoval CCD detektor, v souladu s očekáváním, podstatně větší odezvu než UV detektor, což je patrné ze srovnání chromatogramů získaných při analýze stejných vzorků při současném použití UV detekce (Obr. 24) a CCD detekce (Obr. 25).



Obr. 24: Chromatogramy vzorků $H_4DO_3AP^H$ (1), H_3DO_3A (2) a H_4DOTA (3), všechny o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Stacionární fáze: Discovery HSF5; mobilní fáze: methanol-voda (85:15, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm.



Obr. 25: Chromatogramy vzorků $\text{H}_4\text{DO}_3\text{AP}^{\text{H}}$ (1), $\text{H}_3\text{DO}_3\text{A}$ (2) a H_4DOTA (3), všechny o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Systémový pík je v chromatogramech označen písmenem S. Stacionární fáze: Discovery HSF5; mobilní fáze: methanol-voda (85:15, v/v); průtok: 0,5 ml/min; CCD detekce ($f = 100 \text{ kHz}$, $A = 4 \text{ V}$).

Píky polykarboxylátových derivátů cyklenu zaznamenané CCD detektorem měly horší tvar než píky z UV detektoru. Hlavním důvodem je pravděpodobně fakt, že CCD detektor byl zařazen až jako druhý v pořadí, což vede k výraznějšímu rozmývání zón analytů.

Díky větší citlivosti bezkontaktní vodivostní detekce jsou v chromatogramech na Obr. 25 navíc vidět i nečistoty (např. ve vzorku $\text{H}_3\text{DO}_3\text{A}$ je obsaženo malé množství H_4DOTA a vzorek $\text{H}_4\text{DO}_3\text{AP}^{\text{H}}$ je znečištěn malým množstvím $\text{H}_3\text{DO}_3\text{A}$), což při použití UV detekce téměř není patrné (Obr. 24).

Pokud byla součástí mobilní fáze kyselina nebo pufr, poskytovala bezkontaktní vodivostní detekce většinou srovnatelný signál s UV detektorem. V mobilních fázích, jejichž hodnota pH byla kolem 4, byla na CCD detektoru pozorována výrazně slabší odezva oproti UV detektoru. Tento jev je možné vysvětlit blízkostí pH izoelektrického bodu polykarboxylátových derivátů cyklenu s hodnotou pH okolního prostředí.

V rámci této diplomové práce bylo studováno chromatografické chování polykarboxylátových derivátů cyklenu. Byly vyzkoušeny čtyři typy stacionárních fází: klasická reverzní fáze C8 (kolona RP Select B), aminopropylová (kolona Biospher PSI 200 NH), amidová (kolona Ascentis RP-Amide) a pentafluorofenylpropylová (kolona Discovery HSF5).

Při použití kolon RP Select B a Ascentis RP Amide, tedy stacionárních fází s převahou hydrofobních interakcí, se kyselé deriváty cyklenu téměř nezadržovaly a k jejich separaci proto nedošlo. Na koloně Biospher PSI 200 NH byly tyto látky díky hydrofilním interakcím se stacionární fází sice zadržovány, k úspěšnému dělení ale rovněž nedošlo. Na základě samotných hydrofobních nebo hydrofilních interakcí tedy není možné kyselé deriváty cyklenu od sebe oddělit. Z testovaných stacionárních fází je pro separaci kyselých derivátů cyklenu vhodná pouze pentafluorofenylpropylová stacionární fáze, na které se uplatňují oba typy interakcí.

Nejlepších výsledků separace kyselých derivátů cyklenu bylo dosaženo na koloně Discovery HSF5 při použití mobilní fáze o složení methanol-voda (85:15, v/v). Nalezená optimální mobilní fáze navíc neobsahuje žádný pufr, což umožňuje snadné převedení metody separace i do preparativního měřítka.

Vzhledem k amfionickému charakteru kyselých derivátů cyklenu by v budoucnu bylo vhodné vyzkoušet iontoměničou stacionární fází, nejlépe silný katex, který by mohl být alternativou k pentafluorofenylpropylové stacionární fází.

Byla vypracována metoda separace esterových derivátů cyklenu na klasické reverzní fází (RP Select B). Optimálního dělení bylo dosaženo v mobilní fází o složení acetonitril-0,05% kyselina trifluoroctová (50:50, v/v). Píky separovaných látek byly odděleny až k základní linii a doba analýzy navíc nepřesáhla 20 minut. Použitím gradientové eluce by bylo možné zkrátit retenční čas $t_{\text{Bu}_4\text{DOTA}}$ ($t_{\text{R}}=11,8$ min), který byl poměrně vzdálený od času eluce $t_{\text{Bu}_2\text{DO}_2\text{A}}$ a $t_{\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}}$ ($t_{\text{R}}=2,7$ min a 4,2 min), čímž by se ještě zkrátila doba analýzy a také zlepšil tvar píky $t_{\text{Bu}_4\text{DOTA}}$.

Dále se ukázalo, že bezkontaktní vodivostní detektor, zatím používaný převážně v kapilární zónové elektroforéze, je vhodnou metodou detekce nabitých látek i v RP-HPLC, kterou lze uplatnit zejména, jde-li o látky slabě absorbující v UV oblasti.

Pokud byla pro separaci polykarboxylátových derivátů cyklenu použita mobilní fáze neobsahující kyselinu ani pufr, poskytla CCD detekce lepší výsledky než běžná UV detekce. Signály studovaných látek získané CCD detektorem byly natolik zřetelné, že ve vzorcích bylo možné identifikovat nečistoty, které na záznamu pořízeném UV detektorem nebyly patrné.

Na základě experimentálních výsledků této diplomové práce lze konstatovat, že HPLC je vhodnou metodou pro separaci polykarboxylátových derivátů cyklenu, což dokládají vyvinuté metody separace kyselých a esterových derivátů cyklenu.

6 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	absorbance
C18	oktadecylová stacionární fáze
C8	oktylová stacionární fáze
CCD	bezkontaktní vodivostní detektor
f	frekvence
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
K_a	disociační konstanta
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí
MRI	zobrazování magnetickou rezonancí (magnetic resonance imaging)
NMR	nukleární magnetická rezonance
PET	pozitronová emisní tomografie (positron emission tomography)
PTFE	polytetrafluorethylen (teflon)
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie s převrácenými fázemi
SPECT	single-photon emission computed tomography
TEA	triethylamin
t_R	retenční čas
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast záření
λ	vlnová délka

7 LITERATURA

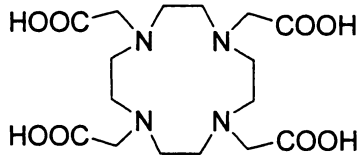
1. Anderson, C. J.; Welch, M. J.: *Chem. Rev.* **99** (1999) 2219.
2. <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/inside.htm> [cit. 29.1.2007].
3. Merbach, A. E.; Tóth, E.: *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, New York, John Wiley & Sons, 2001.
4. Bradshaw, J. S.; Krakowiak, K. E.; Izatt, R. M.: *Aza-crown makrocycles*. New York, John Wiley & Sons, 1993.
5. Meyer, M.; Dahaoui-Gindrey, V.; Lecomte, C.; Guillard, R.: *Coord. Chem. Rev.* **178** (1998) 1313.
6. Alexander, V.: *Chem. Rev.* **95** (1995) 273.
7. Percelay, L.; Appriou, P.; Handel, H. et al.: *Anal. Chim. Acta* **209** (1988) 249.
8. Blain, S.; Appriou, P.; Chaumeil, H.; Handel, H.: *Anal. Chim. Acta* **232** (1990) 331.
9. Cibulka, R.; Vasold, R.; Konig, B.: *Chem. Eur. J.* **10** (2004) 6223.
10. Mejeritskaia, E.; Luo, F.; Kelly, C. A. et al.: *Inorg. Chim. Acta* **246** (1996) 295.
11. Forsterova, M.; Svobodova, I.; Lubal, P.; Táborský, P.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I.: *Dalton Transactions* **5** (2007) 535.
12. Anderegg, G.; Arnaud-Neu, F.; Delgado, R.; Felcman, J.; Popov, K.: *Pure Appl. Chem.* **77** (2005) 1445.
13. Kumar, K.; Chang, C. A.; Francesconi, L. C.; Dischino, D. D.; Malley, M. F.; Gougoutas, J. Z.; Tweedle, M. F.: *Inorg. Chem.* **33** (1994) 3567.
14. Hermann, P. et al.: Nepublikované výsledky.
15. Táborský, P.; Lubal, P.; Havel, J.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **70** (2005) 1909.
16. Martin, A. J. P.; Synge, R. L. M.: *Biochem. J.* **35** (1941) 1358.
17. Neue, U. D.; Van Tran, K.; Iraneta, P. C.; Alden, B. A.: *J. Sep. Sci.* **26** (2003) 174.
18. Ascah, T. L.; Feibush, B.: *J. Chromatogr.* **506** (1990) 357.
19. Bell, D. S.; Jones, A. D.: *J. Chromatogr. A* **1073** (2005) 99.
20. Rocklin, R. D.: *J. Chromatogr.* **546** (1991) 175.

21. Buchberger, W.W.: *J.Chromatogr.A* **884** (2000) 3.
22. Pejcic, B.; De Marco, R.: *Electrochim. Acta* **51** (2006) 6217.
23. Holland, L. A.; Leigh, A. M.: *Electrophoresis* **23** (2002) 3649.
24. Kubáň, P.; Hauser, P. C.: *Electroanalysis* **16** (2004) 2009.
25. Guijt, R. M.; Evenhuis, Ch. J.; Macka, M.; Haddad, P. R.: *Electrophoresis* **25** (2004) 4032.
26. Kubáň, P.; Abad-Villar, E. M.; Hauser, P. C.: *J.Chromatogr. A* **1107** (2006) 159.
27. Kafková, B.; Bosáková, Z.; Tesařová, E.; Suchánková, J.; Coufal, P.; Štulík, K.: *Chromatographia* **56** (2002) 445.
28. Srbek, J.; Coufal, P.; Bosáková, Z.; Tesařová, E.: *J. Sep. Sci* **28** (2005) 1263.
29. Hoherčáková, Z.; Opekar, F.; Štulík, K.: *Electroanalysis* **17** (2005) 1924.
30. Rudovský, J.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Mainero, V.: *Org. Biomol. Chem* **3** (2005) 112.
31. Rudovský J.; Cígler P.; Kotek J.; Hermann P.; Vojtíšek P.; Lukeš I.; Peters J. A.; Elst L. V.; Muller R. N.: *Chem. Eur. J.* **11** (2005) 2373.
32. Desreux J. F.: *Inorg. Chem.* **19** (1980) 1319.
33. Hermann, P. et al.: Nепublikované výsledky.
34. Dadabhoy, A.; Faulkner, S.; Sammes, P. G.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (2002) 348.
35. Li, C.; Wong, W. T.: *J. Org. Chem.* **68** (2003) 2956.
36. Meyer, V. R.: *Practical High Performance Liquid Chromatography*, 3. vydání Chichester, John Wiley& Sons, 2000.
37. Euerby, M. E.; Petersson, P.: *J. Chromatogr. A* **994** (2003) 13.
38. Kiel, J. S.; Morgan, S. L.; Abramson, R. K.: *J. Chromatogr.* **320** (1985) 313.
39. Vervoort, R. J. M.; Maris, F. A.; Hindriks, H.: *J. Chromatogr.* **623** (1992) 207.
40. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, New York, John Wiley& Sons, 1974.
41. Bell, D.: *The Reporter Europe (Supelco)*, **24** (2007) 6.
42. Way, W.; Herick, K.: *The Reporter Europe (Supelco)*, **21** (2006) 6.
43. Bell, D. S.; Cramer, H. M.; Jones, A. D.: *J. Chromatogr. A* **1095** (2005) 113.

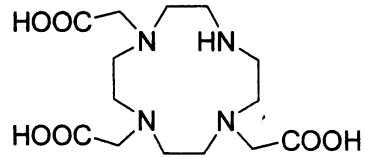
44. Kiridena, W.; DeKay, C.; Koziol, W. W.; Ali, Z.; Ahmed, H.; Poole, C. F.:
Chromatographia **63** (2006) 407.
45. Opekar, F.; Jelínek, I.; Trojánek, A.: *Anal. Chim. Acta* **390** (1999) 101.

PŘEHLED STRUKTUR STUDOVANÝCH LÁTEK

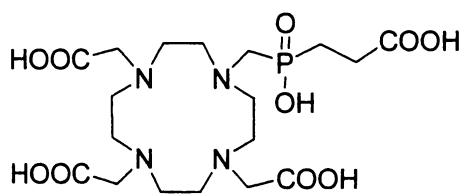
H₄DOTA



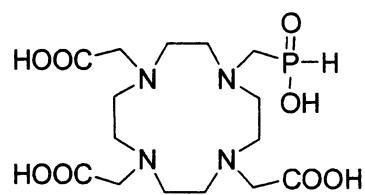
H₃DO3A



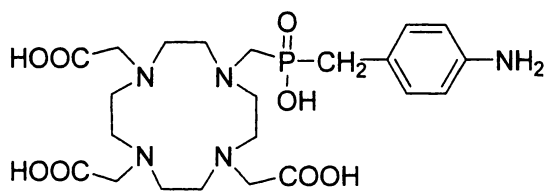
H₅DO3AP^{PrA}



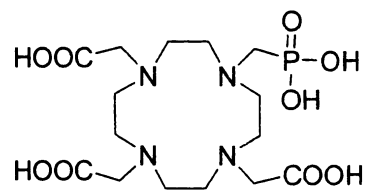
H₄DO3AP^H



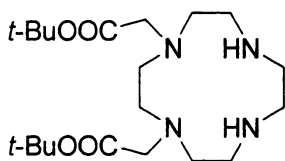
H₄DO3AP^{ABn}



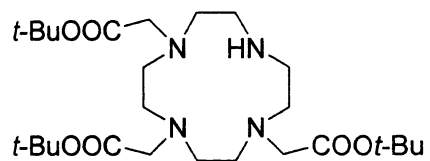
H₅DO3AP



***t*Bu₂DO2A**



***t*Bu₃DO3A**



***t*Bu₄DOTA**

