

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



Vysokoučinná kapalinová chromatografie
derivátů cyklenu

Diplomová práce

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza

Školitel: Doc. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

Praha 2008

Aneta Dlabalová

Prohlášení

Já, Aneta Dlabalová, studentka 5. ročníku Přírodovědecké fakulty, Praha 2, Albertov 6, 128 43 – součásti Univerzity Karlovy v Praze se sídlem v Praze 1, Ovocný trh 3 – 5, 116 36 (IČO: 00216208), jsem v rámci plnění svých studijních povinností vypracovala v akademickém roce 2007/2008 diplomovou práci s názvem *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie derivátů cyklohexenu*, která má povahu školního díla ve smyslu § 60 z. č. 121/2000 Sb., ve znění pozdějších předpisů. Při vypracování diplomové práce jsem využívala vybavení vysoké školy, její knihovní fondy a sbírky. Při vypracování diplomové práce mi byl nápomocen Doc. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D. jako školitel. Až na výše uvedené jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím literatury, která je v diplomové práci citována.

S přihlédnutím k výše uvedeným skutečnostem a podmínkám, za nichž školní dílo vzniklo, uděluji tímto Univerzitě Karlově v Praze se sídlem v Praze 1, Ovocný trh 3 – 5, 116 36 (IČO: 00216208) a její součásti Přírodovědecké fakultě, Praha 2, Albertov 6, 128 43, svolení k užití výše specifikovaného školního díla, a to zejména pro vnitřní potřeby vysoké školy a její reprezentaci.

Dále se zavazuji výše specifikované školní dílo sama užít a jinému poskytnout licenci pouze s předchozím písemným souhlasem Univerzity Karlovy v Praze se sídlem v Praze 1, Ovocný trh 3 – 5, 116 36 (IČO: 00216208) a její součásti Přírodovědecké fakulty, Praha 2, Albertov 6, 128 43. Vysoká škola a její zmíněná součást tento souhlas udělí, pokud užití školního díla jeho autorem a poskytnutí licence jinému není v rozporu s jejími oprávněnými zájmy. Jsem srozuměna s tím, že vysoká škola a její součást jsou oprávněny požadovat, abych jim jako autor školního díla z výdělku mnou dosaženého v souvislosti s užitím tohoto díla či poskytnutím licence jinému přiměřeně přispěla na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého vysokou školou a její součástí z užití školního díla dle předchozího odstavce.

Jsem si vědoma své odpovědnosti za škodu způsobenou vysoké škole a její součástí porušením povinností, které vyplývají z obecně závazných právních předpisů a tohoto prohlášení, a zavazuji se případnou takto způsobenou škodu vysoké škole a její součásti uhradit.

Toto prohlášení činím na základě své pravé vůle, svobodně, vážně, srozumitelně, určitě, nikoliv v tísní a pod nátlakem. Na důkaz toho připojuji svůj vlastnoruční podpis.

V Praze dne 1. května 2008



.....

podpis

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Pavlovi Coufalovi, Ph.D. za zadání zajímavého tématu diplomové práce, odborné vedení, cenné rady a připomínky, poskytnutí studijních materiálů, za laskavý a trpělivý přístup a za všestrannou pomoc při jejím vypracování.

Dále bych chtěla poděkovat skupině Doc. RNDr. Petra Hermanna, Ph.D. a Prof. RNDr. Ivana Lukeše, CSc. a také Ing. M. Lorencovi za syntézu zkoumaných derivátů cyklenu, paní laborantce Ludmile Porazilové za poskytnutí chemikálií nezbytných při experimentech a celému kolektivu analytické laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Poděkování patří také celé mé rodině za umožnění studia a příteli za jeho velkou pomoc a psychickou podporu.

Předmětová hesla: analytické separační metody
kapalinová chromatografie

Klíčová slova: separace
vysokoúčinná kapalinová chromatografie
bazické a kyselé cykleny

Seznam použitých symbolů a zkratk -----	7
1 Úvod -----	10
1.1 Cykleny -----	12
1.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti -----	12
1.1.2 Syntéza cyklenu -----	13
1.1.3 Syntéza derivátů cyklenu -----	14
1.1.4 Využití derivátů cyklenu v lékařství -----	16
1.2 Separační metody -----	17
1.2.1 Chromatografické separační metody -----	17
1.2.1.1 Rozdělení chromatografických metod -----	17
1.2.1.2 Eluční charakteristiky chromatografie -----	18
1.2.1.3 Termodynamika a kinetika separace -----	20
1.2.1.4 Rovnice používané v chromatografii -----	22
1.3 Kapalinová chromatografie -----	25
1.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie -----	26
1.3.1.1 Chromatografie s obrácenými fázemi (RP-HPLC) -----	27
1.3.1.2 Vlastnosti mobilní fáze a její vliv na separaci -----	29
1.3.1.3 Metody detekce v HPLC -----	29
1.4 Studované deriváty cyklenu -----	30
1.4.1 Vlastnosti derivátů cyklenu důležité pro RP-HPLC -----	33
1.4.2 Vybrané typy stacionárních fází -----	33
2 Cíl diplomové práce -----	35
3 Experimentální část -----	36
3.1 Použité chemikálie -----	36
3.2 Přístrojové vybavení -----	36
3.3 Použité metody a experimentální podmínky analýzy -----	37
3.3.1 Molekulová absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti -----	37
3.3.2 HPLC na reverzní fázi s UV detektorem -----	37
3.4 Statistické zpracování dat -----	41
4 Výsledky a diskuze -----	42
4.1 Molekulová absorpční spektrofotometrie derivátů cyklenu -----	42

4.2	RP-HPLC separace derivátů cyklohexanu	44
4.2.1	Kolona LiChrosphere C18 RP Select B	44
4.2.1.1	Mobilní fáze acetonitril-voda (80:20, v/v)	44
4.2.1.2	Mobilní fáze acetonitril-voda (65:35, v/v)	46
4.2.1.3	Mobilní fáze acetonitril-voda (50:50, v/v)	46
4.2.2	Kolona Biosphere PSI 200 NH	48
4.2.2.1	Mobilní fáze acetonitril-voda (80:20, v/v)	49
4.2.2.2	Mobilní fáze acetonitril-voda (65:35, v/v)	49
4.2.2.3	Mobilní fáze acetonitril-voda (50:50, v/v)	50
5	Závěr	52
	Literatura	54

Seznam použitých symbolů a zkratek

A	absorbance <i>nebo</i> plocha píku	[mAU] [mm ²]
A_{\max}	absorpční maximum	
A-T	páry bazí adenin-thymin (adenin-thymin base pairs)	
c	molární koncentrace	[mol/dm ³]
$(c_i)_m$	c i-tého analytu v mobilní fázi	[mol/dm ³]
$(c_i)_s$	c i-tého analytu ve stacionární fázi	[mol/dm ³]
c_m	hmotnostní koncentrace	[mg/cm ³]
C2	ethylová stacionární fáze	
C8	oktylová stacionární fáze	
C18	oktadecylová stacionární fáze	
DAD	detektor s diodovým polem (diode array detector)	
DIBAL-H	hydrid diisobutylaluminia	
ds DNA	dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina (double-stranded deoxyribonucleic acid)	
ε	molární absorpční koeficient	[m ² /mol]
F_m	objemový průtok mobilní fáze	[ml/min]
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)	
GLC	chromatografie v systému plyn-kapalina (gas-liquid chromatography)	
GPC	gelová permeační chromatografie (gel permeation chromatography)	
GSC	chromatografie v systému plyn-tuhá látka (gas-solid chromatography)	
h	výška píku	[mm]
H	výškový ekvivalent teoretického patra (HETP – height equivalent to a theoretical plate)	[mm]

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography <i>nebo</i> dříve high pressure liquid chromatography)	
IEC	iontově výměnná chromatografie (ion exchange chromatography)	
k	retenční faktor	
k_i	retenční faktor i -tého analytu	
k_2	retenční faktor druhého analytu	
$K_{D,i}$	distribuční konstanta i -tého analytu	
$K_{D,1}$	distribuční konstanta prvního analytu	
$K_{D,2}$	distribuční konstanta druhého analytu	
L	délka kolony	[cm]
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)	
LLC	rozdělovací chromatografie (liquid-liquid chromatography)	
LSC	adsorpční chromatografie (liquid-solid chromatography)	
M_r	relativní molekulová hmotnost	
MRI	magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)	
n	počet teoretických pater	
$(n_i)_m$	látkové množství i -tého analytu v mobilní fázi	[mol]
$(n_i)_s$	látkové množství i -tého analytu ve stacionární fázi	[mol]
n_2	počet teoretických pater druhého analytu	
PC	papírová chromatografie (paper chromatography)	
PET	pozitronová emisní tomografie (positron emission tomography)	
QSAR	kvantitativní vztah mezi chemickou strukturou a aktivitou (quantitative structure-activity relationship)	

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi (reverse phase-HPLC)	
$R_{1,2}$	rozlišení analytů 1 a 2	
SFC	superkritická fluidní chromatografie (supercritical fluid chromatography)	
SPECT	jednofotonová emisní počítačová tomografie (single photon emission computed tomography)	
t	čas	[min]
T	teplota	[°C]
TLC	tenkovrstevná chromatografie (thin layer chromatography)	
t_m	mrtvý čas (kolony)	[min]
$t_{r,i}$	retenční čas i -tého analytu	[min]
$t_{r,1}$	retenční čas prvního analytu	[min]
$t_{r,2}$	retenční čas druhého analytu	[min]
$t'_{r,i}$	redukovaný retenční čas i -tého analytu	[min]
u	lineární rychlost mobilní fáze	[cm/min]
UV	ultrafialová oblast záření (190 – 400 nm)	
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast záření (190 – 700 nm)	
V	objem	[ml]
VIS	viditelná oblast záření (400 – 700 nm)	
V_m	objem mobilní fáze	[ml]
$V_{r,i}$	retenční objem i -tého analytu	[ml]
$V'_{r,i}$	redukovaný retenční objem i -tého analytu	[ml]
V_s	objem stacionární fáze	[ml]
v/v	objemový zlomek	
w	šířka píku při základně	[cm; min]
w_i	šířka píku mezi inflexními body	[cm; min]
w_1	šířka píku při základně prvního analytu	[cm; min]
w_2	šířka píku při základně druhého analytu	[cm; min]
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky	[cm; min]
λ	vlnová délka	[nm]

1 Úvod

V dnešní době se setkáváme s řadou nových onemocnění, kterými se zabývá a které zkoumá klinická medicína. Jedním z velkých problémů současnosti je rychle rostoucí počet nádorových onemocnění. V České republice jsou dokonce druhou nejčastější příčinou úmrtí. Civilizační choroby postihují stále nižší a nižší věkové skupiny. Oproti minulosti je to dáno zejména odlišnou skladbou potravy, která obsahuje mnohem více cukrů a tuků, ale také stresem a kontaminací složek životního prostředí chemickými látkami. Imunitní systém, který může být stresem a polutanty oslaben, není schopen na tuto situaci včas a dostatečně zareagovat. Jako pomoc imunitnímu systému se používají nejrůznější chemické látky, které se nejprve musí izolovat z biologického materiálu nebo syntetizovat. Proto je nezbytné nacházet nové metody syntézy, separace, identifikace a kvantifikace.

Nauka o léčivech se vyvíjí velmi rychle. Každoročně se na trhu objeví velké množství nových přípravků. Od syntézy nové látky až k jejímu zavedení na trh jako registrovaného léku proběhne často 7 – 10 let. Kromě tohoto značného časového úseku stojí za zmínku i náklady, které dnes dosahují několika miliard korun. Každý nový lék s potenciálním farmakoterapeutickým významem prochází předklinickým výzkumem. Je zkoumán vztah mezi chemickou strukturou a biologickým účinkem (QSAR), jenž je teoreticky konstruován na obřích počítačích (in silico) a následně jsou „slibné“ molekuly syntetizovány. Vypracovávají se série modelových metodik in vitro a in vivo, které umožňují přezkoušet jednotlivé látky z hlediska určitých biologických a patofyziologických účinků [1].

Klinické zkoušení nových perspektivních léčiv na člověku (a také na zvířeti) podléhá přísné regulaci podle zvláštních zákonů a nařízení. Ve fázi I se příslušná látka zkouší na zdravých pokusných osobách z hlediska snášenlivosti a kinetiky. Tato fáze trvá obvykle 9 – 24 měsíců. Ve fázi II se sledovaná látka poprvé podává malému počtu pacientů. Přitom se věnuje především pozornost účinkům, pro které se má látka používat, tedy účinkům hlavním. Mimoto se shromažďují údaje o farmakokinetice a snášenlivosti [2]. Ve fázi III se široce testuje účinná látka na větší skupině pacientů. Tyto kontrolované studie se provádějí buď ve srovnání s placebem anebo ve srovnání s dosud nejlepší terapií účinným léčivem. Údaje získané z prvních tří fází by za

příznivého průběhu klinického sledování měly stačit pro splnění požadavků, které pro povolení nového léčiva zákon o léčivech má. Požadavky se vztahují na průkaz účinnosti při určitých indikacích a na bezpečnost při tomto použití. Ve fázi IV se shrnují veškeré poznatky o účinné látce, které se po jejím uvedení do prodeje nahromadily v průběhu širokého používání. Lék nyní může používat každý lékař. V této dodatečné fázi je možné shromáždit zkušenosti získané s novou látkou u některých speciálních skupin, např. u gravidních žen, u pacientů s dialýzou, u velmi starých osob aj. Nová látka pak může být registrována jako nové léčivo.

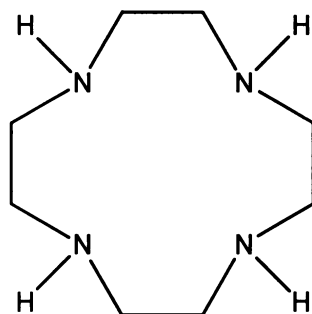
Kritérii pro přípravu nového léčiva je předpokládaná účinnost a neškodnost. Svou roli však samozřejmě hraje také ekonomické hledisko. Ačkoliv se vyvíjí mnoho účinných léků a technik pro boj s rakovinou, pro úspěšnou léčbu nádoru je rovněž velmi důležité jeho včasné odhalení. Současná medicína má k dispozici řadu zobrazovacích metod [3], například radiodiagnostické metody PET – pozitronová emisní tomografie, SPECT – jednofotonová emisní počítačová tomografie [4] anebo MRI – magnetická rezonance [5], která je považována za jednu z nejúčinnějších neinvazivních diagnostických metod dnešní doby. Tato metoda je založena na sledování chování jader s magnetickým momentem ve vnějším magnetickém poli [6], tedy na stejném principu jako nukleární magnetická rezonance. Tkáň postižená rakovinným bujením se liší obsahem vody oproti tkáni zdravé, proto je zaznamenán odlišný signál jader vodíku (^1H) v molekulách vody. V předkládané diplomové práci byly studovány polykarboxylátové deriváty cyklenu. Tyto N-donorové ligandy tvoří s kationty kovů [7] a lanthanoidů [8,9] komplexy. Po koordinaci jedné molekuly vody do první koordinační sféry mohou být použity jako kontrastní látky pro lepší zobrazení nádoru.

V literatuře zatím nebyla popsána žádná dostatečně účinná metoda separace derivátů cyklenu. Čištění jednotlivých reakčních meziproductů je totiž obtížné, protože u žádné látky nelze zabránit vzniku vedlejších produktů s velmi podobnými vlastnostmi (rozpuštěnost, těkavost atd.). Požadované čistoty pro použití v klinické praxi nelze dosáhnout ani opakovanou sloupcovou chromatografií. Cílem této práce tedy bylo zjistit, zda je vysokoúčinná kapalinová chromatografie vhodnou analytickou metodou separace polykarboxylátových derivátů cyklenu a nalézt optimální podmínky separace, které by mohly být později využity pro preparativní vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

1.1 Cykleny

1.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Cykleny (nepřesné označení pro deriváty látky s triviálním názvem cyklen) jsou heterocyklické sloučeniny odvozené od cykлену ($C_8H_{20}N_4$), neboli 1,4,7,10-tetraaza-cyklododekanu, což je bílá až jemně nažloutlá krystalická látka o relativní molekulové hmotnosti 172,27. Bod tání [10,11,12] nebyl podle literatury dříve zcela jednoznačně určen. V současnosti je podle [13] bod tání cykлену stanoven na 108 – 113 °C. Cyklen ve své cyklické molekule obsahuje čtyři atomy dusíku a osm atomů uhlíku. Patří k nejdůležitějším zástupcům široké „rodiny“ polyazamakrocyclů [14]. Chemická struktura cykлену je znázorněna na obr. 1.

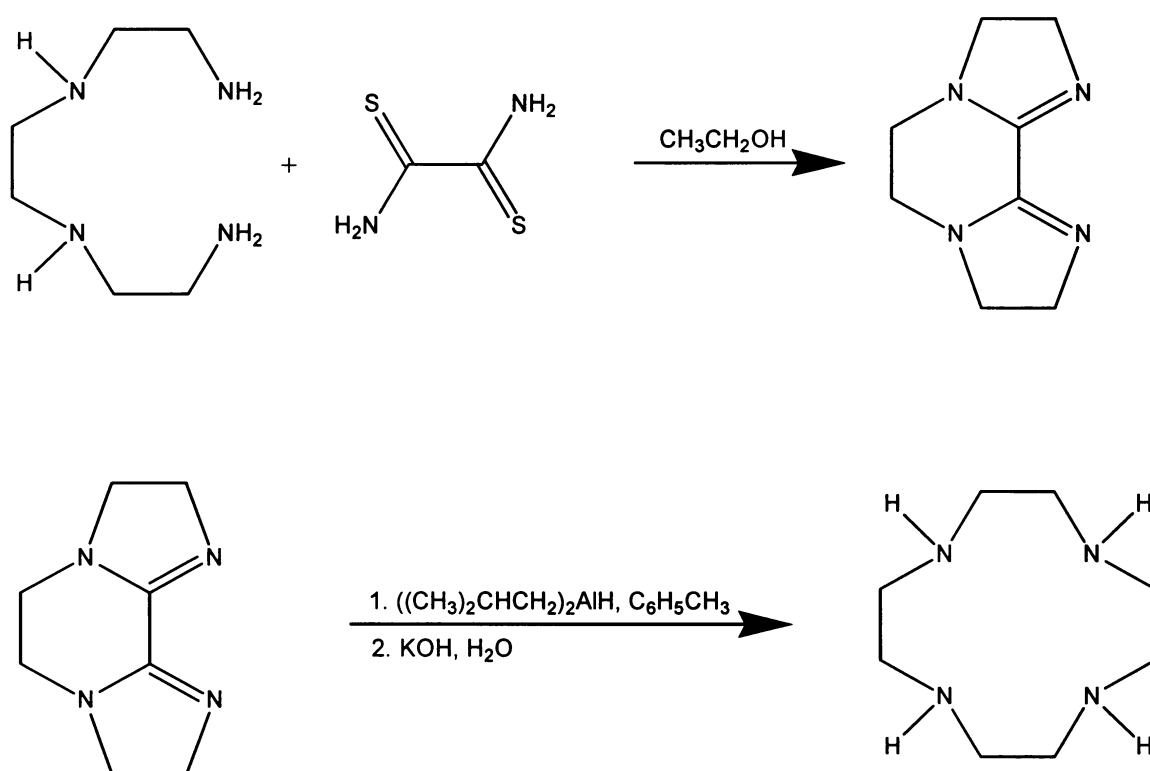


Obr. 1 Chemická struktura cykлену, tedy 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu.

Pro cykleny je charakteristickou strukturou dvanáctičlenný tetraaminový „prsteneček“ [15], který ve své molekule obsahuje trojvazný dusík s volným elektronovým párem, tudíž může být substituován funkčními skupinami. Funkční skupiny mohou mít nepolární či polární charakter, který může být bazický nebo kyselý. Ovlivňují tak, při separaci na chromatografické koloně, druh (hydrofilní, hydrofobní) interakce derivátů cykлену se stacionární fází, jak bude popsáno dále. Polyazamakrocycly byly poprvé zmíněny již roku 1937 J. van Alphenem [16], největší rozvoj však zaznamenaly až ve druhé polovině 20. století [17], kdy byly zkoumány krystalické struktury a geometrie různých sloučenin, jejichž součástí jsou právě cykleny [18,19,20]. Jak již bylo zmíněno výše, lze je využít jako nosiče těžkých kovů a lanthanoidů, a jsou proto vhodnými ligandy nových kontrastních látek pro MRI.

1.1.2 Syntéza cyklenu

Na obr. 2 je zobrazen postup syntézy 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu. Při této syntéze reaguje triethyltetraamin s dithiooxamidem (dithiooxalamidem) v prostředí bezvodého ethanolu (méně než 1 % vody) za vzniku meziprojektu – 2,3,5,6,8,9-hexahydrodiimidazol(1,2-a 2',1'-c)pyrazinu [21,22], který dále reaguje pod zpětným chladičem naplněným dusíkem s redukčním činidlem – hydridem diisobutylaluminia v prostředí toluenu. Syntéza je po 16 hodinách ukončena přidavkem vodného roztoku hydroxidu draselného o koncentraci 3 mol/dm³ za vzniku produktu, tedy 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu [23,24,25].



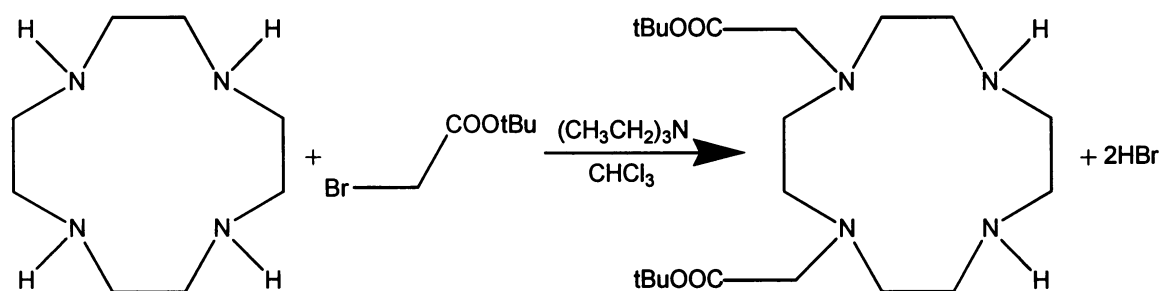
Obr. 2 Syntéza 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu.

Cyklen jako výsledný produkt vzniká reakcí triethyltetraaminu s dithiooxamidem v prostředí bezvodého ethanolu (méně než 1 % vody) za vzniku 2,3,5,6,8,9-hexahydrodiimidazol(1,2-a 2',1'-c)pyrazinu [47,48], který dále reaguje v prostředí toluenu s redukčním činidlem DIBAL-H pod zpětným chladičem naplněným dusíkem. Syntéza je po 16 hodinách ukončena přidavkem vodného roztoku hydroxidu draselného o koncentraci 3 mol/dm³ [23,24,25].

1.1.3 Syntéza derivátů cykľenu

Polykarboxylátové deriváty cykľenu se často připravují poměrně složitou, několikastupňovou syntézou, která je založena na přímé či nepřímé N-alkylaci [26,27,28], při které dochází odděleně ke dvěma nukleofilním substitucím [21,22]. Dříve než je *nepřímá* N-alkylace provedena, jsou tři aminy v cyklickém tetraaminovém kruhu dočasně maskovány ochrannými skupinami jako je *terc.*butyloxykarbonyl, tosyl nebo formyl [29,30,31]. Jinou metodou je zavedení prostorově bránících činidel obsahujících funkční skupiny fosforylu, glyoxalu nebo karbonylu ve stechiometrickém poměru, které mohou dočasně blokovat tři dusíkaté atomy v tetraazamakrocyclech. Hlavní cesta syntézy derivátů cykľenu nepřímou N-alkylací spočívá v reakci s různými alkylačními činidly [26,27,28].

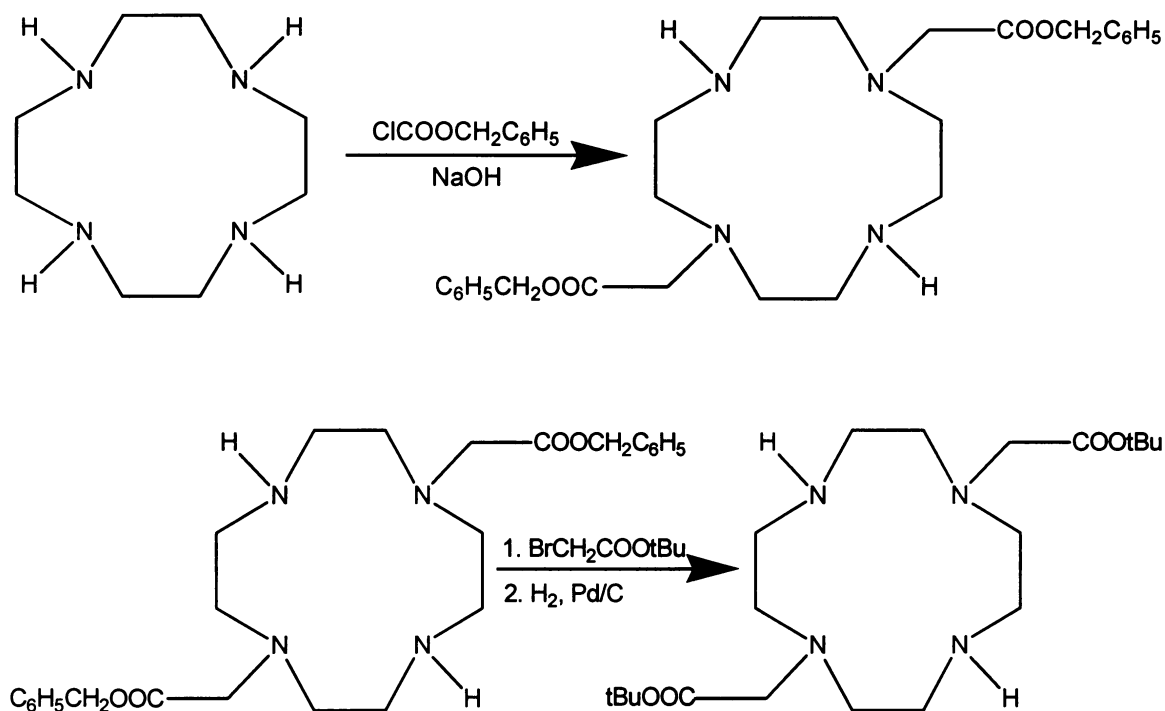
Na obr. 3 je zobrazen postup syntézy 1,4-bis(*terc.*butyloxykarbonylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekanu. Tuto látku lze také označit jako „cis-izomer“, který za těchto podmínek vzniká v převažujícím množství [32]. Při této syntéze reaguje v prostředí chloroformu za přítomnosti triethylaminu při laboratorní teplotě cykľen s *terc.*butylesterem kyseliny bromoctové. Reakcemi tohoto reakčního produktu, tedy 1,4-bis(*terc.*butyloxykarbonylmethyl)1,4,7,10-tetraazacyklododekanu s aktivními či méně aktivními činidly (jako je např. K_2CO_3 , CH_3CN apod.), vznikají další N-alkylované deriváty cykľenu.



Obr. 3 Syntéza *t*Bu₂DO2A1 nepřímou N-alkylací.

Cykľen reaguje s *terc.*butylesterem kyseliny bromoctové v prostředí chloroformu za přítomnosti triethylaminu při laboratorní teplotě. Výsledným produktem je 1,4-bis(*terc.*butyloxykarbonylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan.

Na obr. 4 je ukázán postup syntézy 1,7-bis(*tert.*butyloxykarbonylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekanu. Tuto látku lze také označit jako „trans-izomer“. Při této syntéze reaguje cyklen s benzoylesterem kyseliny chlormravenčí v prostředí hydroxidu sodného a vznikající meziprodukt 1,7-bis(benzoylkarbonylmethyl)1,4,7,10-tetraazacyklododekan dále reaguje za přítomnosti H₂ a katalyzátoru Pd/C při laboratorní teplotě s *tert.*butylesterem kyseliny bromoctové [33].



Obr. 4 Syntéza *t*Bu₂DO2A2 nepřímou N-alkylací.

Cyklen reaguje s benzoylesterem kyseliny chlormravenčí v prostředí hydroxidu sodného, vznikající meziprodukt – 1,7-bis(benzoylkarbonylmethyl)1,4,7,10-tetraazacyklododekan dále reaguje s *tert.*butylesterem kyseliny bromoctové za přítomnosti H₂ a katalyzátoru Pd/C při laboratorní teplotě. Výsledným produktem je 1,7-bis(*tert.*butyloxykarbonylmethyl)1,4,7,10-tetraazacyklododekan [33].

Také bylo vyzkoušeno zavedení *přímé* N-alkylace, ale k této cestě bylo zapotřebí příliš velkého množství drahých polyazacrownů. Z tohoto důvodu se metoda *přímé* N-alkylace v praxi příliš nevyužívá.

1.1.4 Využití derivátů cyklenu v lékařství

Stejně jako crown ethery jsou polykarboxylátové deriváty cyklenu schopné selektivně vázat kationty. Volné ionty kovů jsou pro člověka značně toxické, ale vznikající komplexy vykazují vysokou termodynamickou (v přítomnosti konkurenčních biogenních ligandů) a kinetickou stabilitu ve vodných roztocích, a proto se mohou používat jako kontrastní látky pro různé diagnostické metody v klinické praxi bez rizika toxicity. Komplexy cyklenů s ionty kovů a lanthanoidů [34,35,36,37,38,39,40] slouží také jako radiofarmaka s vysoce specifickým terapeutickým využitím v lidském těle. Již přes padesát let jsou tyto látky přínosem při léčbě různých typů rakoviny.

Mezi nejčastěji používané kontrastní látky v MRI patří komplexy trojmocného gadolinia (sedm nepárových elektronů, maximální spinový moment) s deriváty cyklenu. Přítomnost této paramagnetické látky (Gd^{3+}) ovlivňuje chování a tedy i signál molekul vody (1H) v magnetickém poli. Výhodou cyklenů je jejich sterická nenáročnost, která jim umožňuje koordinovat ion trojmocného gadolinia až osmi donorovými atomy a obsadit tak poslední koordinační místo molekulou vody, jejíž výměnou dochází k přenosu magnetické informace mezi kontrastní látkou a okolním roztokem, aniž by se snížila pevnost a stabilita komplexu. Komplex Gd^{3+} s kyselinou 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctovou vykazuje sice největší stabilitu, ale má mnoho nežádoucích vedlejších účinků [41]. Při MRI se proto používá především triacetátový komplex gadolinia, který je neutrální a nezpůsobuje tolik vedlejších účinků. Účinnost kontrastní látky vyjadřuje veličina relaxivity, která závisí na mnoha parametrech, např. na teplotě, na počtu molekul vody koordinovaných k iontu kovu, na elektronických parametrech iontu kovu atd. Jednou z možností, jak zvýšit relaxivitu je vývoj nových vhodných ligandů s ještě lepšími vlastnostmi.

Byla připravena řada derivátů polyazamakrocyklů s širokým použitím (katalýza, biomedicína, čištění vody od těžkých kovů atd.) [42,43,44,45,46,47,48,49,50,51]. Prokázalo se, že tetraazamakrocyclické ligandy jako např. cyklen, cyklam či bicyklam vykazují antitumorovou a anti-HIV aktivitu [52]. Ortho tri-cyklen se používá k prevenci akné, neboť potlačuje negativní vliv androgenů na pleť [53]. V literatuře [54] byla popsána syntéza inhibitoru karboxypeptidázy A. Tento inhibitor obsahuje Cu^{II} -cyklen nebo Co^{III} -cyklen komplex. Vědci syntetizovali sloučeninu bis(Zn^{II} -cyklen)azobenzen jako interkalační (cross-linking) činidlo. Tato sloučenina se selektivně váže na A-T páry

ds DNA ve vodném roztoku [55]. Také byly připraveny deriváty cykvenu nesoucí heterocyklický oligoamid, které mají rovněž potenciální schopnost vazby na DNA [56].

1.2 Separační metody

Separační metody jsou fyzikálně-chemické metody, při nichž se směs selektivně dělí na jednotlivé složky [57]. Oddělené složky se mohou buď izolovat v chemicky čisté formě, nebo se může pouze zaznamenávat jejich rozdělení a záznam kvalitativně i kvantitativně vyhodnocovat. Společným základem separačních metod jsou mezifázové rovnováhy. Aby se mohla jedna složka oddělit od druhé v homogenní směsi, musí se přidat nebo vytvořit další fáze tak, aby jedna ze složek zůstala v jedné fázi a druhá složka přešla do fáze druhé. Separační metody lze klasifikovat podle různých hledisek, například podle druhu fází (viz tab. 1), mechanismu separačního děje nebo techniky provedení [58].

Tab. 1 Klasifikace separačních metod podle druhu fází [57].

Fáze, z níž se látka převádí	Fáze, do níž se látka převádí	Metody
tuhá	kapalná	extrakce
	plynná	sublimace
kapalná	tuhá	krystalizace, elektrolyza, srážení, LSC, IEC
	kapalná	extrakce, LLC
	plynná	destilace
plynná	tuhá	adsorpce, rozdělovací GC

1.2.1 Chromatografické separační metody

1.2.1.1 Rozdělení chromatografických metod

Mezi chromatografické separační metody patří: **gelová permeační chromatografie** (GPC), která využívá molekulově síťový efekt mechanického dělení molekul analytů v pórech gelu na základě jejich rozdílné velikosti (malé molekuly jsou zachycovány v pórech gelu a velké molekuly eluují dříve); **rozdělovací chromatografie** (LLC) využívá rozdílné rozpustnosti (a tudíž i rozdílné distribuce) molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami; **adsorpční chromatografie** (LSC)

využívá rozdílné adsorpce molekul analytů na povrchu tuhé fáze s aktivními centry; **iontově výměnná chromatografie** (IEC) využívá rozdílné výměnné adsorpce analytů (iontů) na povrchu iontového měniče.

Kapalinovou chromatografii lze uskutečnit v *kolonovém* nebo *planárním* uspořádání. Mezi kolonové techniky patří adsorpční, rozdělovací, gelová a iontově výměnná chromatografie. K planárním technikám se řadí papírová chromatografie (PC) a tenkovrstevná chromatografie (TLC). Zvláštním typem je superkritická fluidní chromatografie (SFC). Podle skupenství mobilní a stacionární fáze lze chromatografické techniky rozdělit na několik základních typů (viz tab. 2). Mohou se ale také klasifikovat podle separačních podmínek. Za konstantních podmínek probíhá *izokratická* chromatografie. Při měnící se teplotě nebo častěji při měnícím se složení mobilní fáze se provádí *gradientová* chromatografie.

Tab. 2 Klasifikace základních typů chromatografických technik podle skupenství mobilní a stacionární fáze [59].

Mobilní fáze	Stacionární fáze	Typ chromatografie
plynná	pevná	GSC
plynná	kapalná	GLC
kapalná	pevná	LSC
kapalná	kapalná	LLC

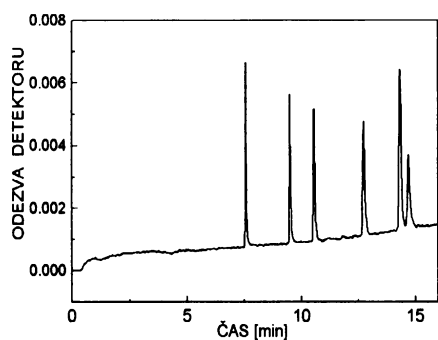
1.2.1.2 Eluční charakteristiky chromatografie

V chromatografii se uplatňují van der Waalovy síly (hydrofobní interakce), mezi které patří disperzní Londonovy síly, které se uplatňují mezi dvěma indukovanými dipóly, orientační síly Keesomovy, ke kterým dochází mezi dvěma dipóly a indukční Debyeovy síly, které způsobují interakci mezi dipólem a indukovaným dipólem. Dalšími silami, které se projevují v chromatografii, jsou vodíková vazba a elektrostatická Coulombova interakce [60].

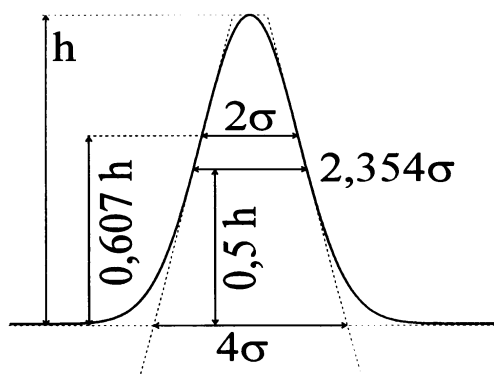
Retenční objem je objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od počátku ke konci separační kolony. Retenční čas je celkový čas, který příslušný analyt stráví v separační koloně. Mrtvý objem kolony je objem eluentu, který musí projít kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od počátku ke

konci kolony. Mrtvý čas kolony je retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Všechny analyty stráví v mobilní fázi stejnou dobu – mrtvý čas kolony. Redukovaný retenční čas je čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi. Distribuční konstanta a retenční faktor charakterizují selektivitu, tj. do jaké míry se analyty na koloně zadržují a zpožďují.

Na obr. 5 je zobrazen chromatogram, což je grafický záznam chromatografické analýzy neboli výstupní informace z detektoru [61]. Zóně analytu v chromatogramu odpovídá pík (eluční křivka), která charakterizuje koncentrační profil analytu v zóně. Ostrost píku závisí na dávkovaném množství a době eluce, jak bude popsáno dále. V ideálním případě má eluční křivka tvar symetrického Gaussovského píku (viz obr. 6) a základní linie prochází horizontálně bez známek šumu nebo driftu.



Obr. 5 Chromatogram (převzato z [60]).



Obr. 6 Gaussovský pík a jeho parametry.

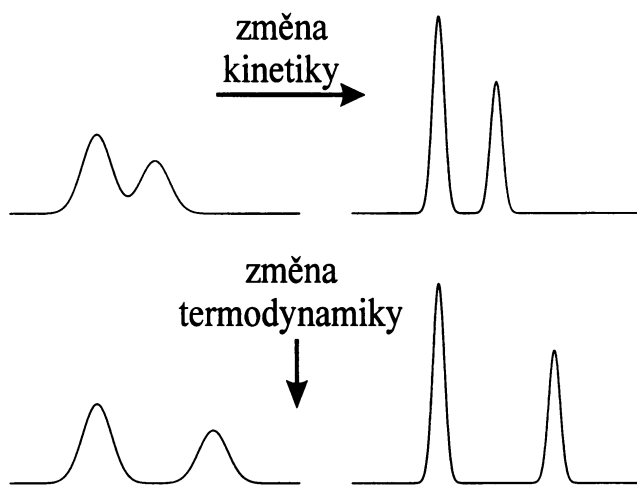
Plocha píku ($A = 1,064 \cdot h \cdot w_{1/2}$), šířka píku při základně ($w = 4\sigma$), šířka píku v polovině výšky ($w_{1/2} = 2,354\sigma$), šířka píku mezi inflexními body ($w_i = 2\sigma$), výška píku (h), výška píku k w_i ($0,607 h$), výška píku k $w_{1/2}$ ($0,5 h$) (převzato z [60]).

Pro chromatografické chování látek má základní význam koncentrační závislost distribučních konstant. Pouze při velmi malých koncentracích v mobilní fázi mají izotermy lineární průběh (K_D je koncentračně nezávislá) a lze získat symetrické eluční křivky (viz obr. 6) a tím i konstantní retenční časy. Konkávnímu průběhu izotermy odpovídá nesymetrická chvostující (tailing) křivka, což je častý jev při LSC. Konvexní tvar izotermy zapříčiňuje nesymetrický tvar píku s rozmytou přední částí (fronting), což

je častým jevem při předávkování kolony. Poloha píku (t_r) identifikuje každou látku, plocha píku (A) určuje její koncentraci. Dalším důležitým parametrem je šířka píku při základně, šířka píku v polovině výšky a šířka píku mezi inflexními body. Šířka píku se udává v délkových nebo časových jednotkách [mm, cm; s, min] [60].

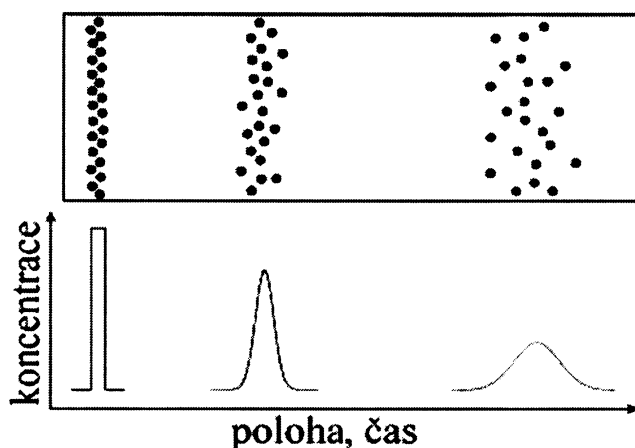
1.2.1.3 Termodynamika a kinetika separace

Termodynamika a kinetika separace spolu úzce souvisejí a obě dvě určují, do jaké míry se sousední píky v chromatogramu překrývají, tj. jak dokonale nebo nedokonale jsou zóny sousedních analytů vzájemně odděleny. Termodynamika a kinetika separace ovlivňují rozlišení sousedních píků v chromatogramu (viz obr. 7).



Obr. 7 Vliv změny kinetiky a termodynamiky na oddělení zón analytů (převzato z [60]).

Kinetika se zabývá jevy, které ovlivňují rozšiřování zón dělených látek (analytů) během postupu kolonou, tzn. šířkou píků v chromatogramu. Rozšiřování zóny analytu (viz obr. 8, str. 21) je dáno jednak vlastním separačním procesem (interakce složek se stacionární fází na základě různých druhů mezimolekulových sil), jednak molekulární difúzí v mobilní a stacionární fázi, nepravidelnostmi toku mobilní fáze a lokálními nerovnovážnými stavy při přechodu látky mezi fázemi. V důsledku toho se zhoršuje separace a snižuje se účinnost kolony, což se projeví nedokonalým oddělením píků. Na reverzní fázi vede k rozšíření chromatografických zón ještě zbytková koncentrace silanolových skupin. Tato problematika je detailněji popsána v kap. 1.3.1.1 na str. 28.



Obr. 8 Rozmývání zóny analytu při postupu kolonou (převzato z [60]).

Termodynamika se zabývá jevy, které ovlivňují velikost interakce mezi sorbentem a analytem, retencí a retardací analytů, rychlostí migrace analytů kolonou, rozdíly v retenčních časech analytů a dělením analytů od sebe navzájem. Termodynamika separace pracuje s objemem stacionární fáze V_s [ml], objemem mobilní fáze neboli mrtvým objem kolony V_m [ml], objemovým průtokem mobilní fáze F_m [ml/min], lineární rychlostí mobilní fáze u [cm/min], retenčním objemem i -tého analytu $V_{r,i}$ [ml], který je definován jako objem mobilní fáze nutný k eluci maxima zóny i -tého analytu, retenčním časem i -tého analytu $t_{r,i}$ [min], mrtvým časem kolony t_m [min], redukovaným retenčním objemem i -tého analytu $V'_{r,i}$ [ml] a redukovaným retenčním časem i -tého analytu $t'_{r,i}$ [min].

L [cm] značí délku kolony, n je počet teoretických pater, H [mm] je výškový ekvivalent teoretického patra, $K_{D,i}$ je distribuční konstanta i -tého analytu, $(c_i)_s$ [mol/dm³] je koncentrace i -tého analytu ve stacionární fázi, $(c_i)_m$ [mol/dm³] je koncentrace i -tého analytu v mobilní fázi, $(n_i)_s$ [mol] je látkové množství i -tého analytu ve stacionární fázi, $(n_i)_m$ [mol] je látkové množství i -tého analytu v mobilní fázi, $t_{r,1}$ a $t_{r,2}$ [min] jsou retenční časy separovaných analytů 1 a 2; w_1 a w_2 [cm; min] jsou šířky píků separovaných látek 1 a 2; $K_{D,1}$ je distribuční konstanta prvního analytu a $K_{D,2}$ je distribuční konstanta druhého analytu, n_2 a k_2 je počet teoretických pater a retenční faktor druhého analytu, w [cm; min] je šířka píku při základně a $w_{1/2}$ [cm; min] je šířka píku v polovině jeho výšky a $R_{1,2}$ značí rozlišení analytů 1 a 2.

1.2.1.4 Rovnice používané v chromatografii

Základní rovnicí chromatografie [62], která platí především pro rozdělovací chromatografii je:

$$V_r = V_m + K_{D,i}V_s \quad (1)$$

Další rovnice používané v chromatografii:

$$V_m = F_m t_m \quad (2) \quad V_{f,i} = V_{r,i} - V_m \quad (3)$$

$$V_{r,i} = F_m t_{r,i} \quad (4) \quad t_{f,i} = t_{r,i} - t_m \quad (5)$$

$$V_{f,i} = K_{D,i}V_s \quad (6) \quad V_{f,i} = F_m t_{f,i} \quad (7)$$

$$u = \frac{L}{t_m} \quad (8) \quad t_{f,i} = \frac{V_{f,i}}{F_m} = \frac{K_{D,i}V_s}{F_m} \quad (9)$$

$$t_{r,i} = \frac{V_{r,i}}{F_m} = \frac{V_m + K_{D,i}V_s}{F_m} \quad (10)$$

Retenční faktor i -tého analytu k_i (kapacitní faktor, kapacitní poměr) vyjadřuje zadržení a charakterizuje vliv zadržovacích vlastností kolony na její rozlišovací schopnost:

$$k_i = \frac{t_{r,i} - t_m}{t_m} = \frac{t_{f,i}}{t_m} \quad (11) \quad k_i = \frac{V_{r,i} - V_m}{V_m} = \frac{V_{f,i}}{V_m} \quad (12)$$

Vztah mezi retenčním faktorem a distribuční konstantou vyjadřuje rovnice:

$$k_i = \frac{(n_i)_s}{(n_i)_m} = K_{D,i} \frac{V_s}{V_m} \quad (13)$$

kde $K_{D,i}$ a k_i charakterizují selektivitu, tj. do jaké míry se analyty na koloně zadržují a zpožďují.

Míra účinnosti kolony je vyjádřena počtem teoretických pater n . Počet teoretických pater se vypočítá podle vztahu:

$$n = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2 \quad (14)$$

$$n = 5,53 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (15)$$

Často se uvádí, jakou výšku má jedno teoretické patro, tzn. počítá se tzv. výškový ekvivalent teoretického patra (H , HETP), který slouží k porovnání kolon různé délky:

$$H = \frac{L}{n} \quad (16)$$

K posouzení separační schopnosti slouží tzv. rozlišení $R_{1,2}$:

$$R_{1,2} = \frac{2(t_{r,1} - t_{r,2})}{w_1 + w_2} \quad (17)$$

Látky považujeme za zcela oddělené (99,7% separace), jestliže $R_{1,2} = 1,5$. Pro většinu látek však stačí, když $R_{1,2} = 1,0$ [58]. Rozlišovací schopnost kolony závisí tedy na rozdílu retenčních časů, které jsou ovlivněny typem separovaných látek i použitým systémem fází, a nepřímoúměrně na šířce píků. Tuto závislost také vyjadřuje vztah:

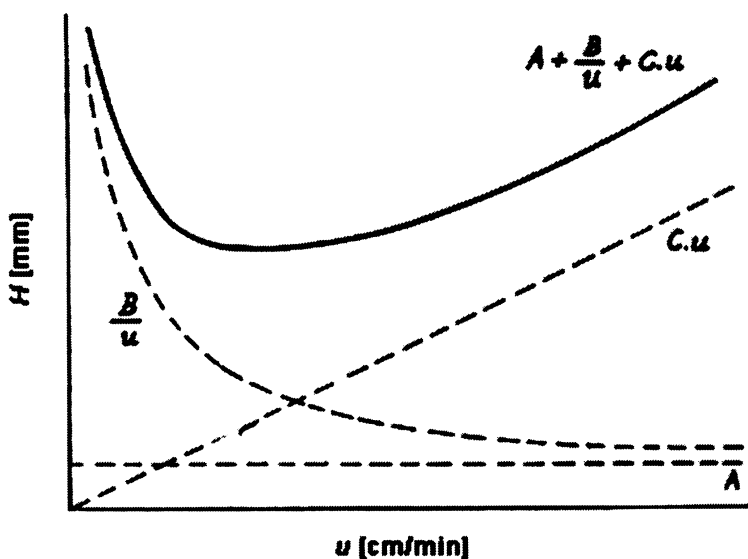
$$R_{1,2} = \frac{1}{2} \sqrt[2]{n_2} \frac{K_{D,2} - K_{D,1}}{K_{D,2}} (1 - k_2) \quad (18)$$

Distribuční konstanta každé složky určuje její obsah v mobilní fázi v kterékoli době a tím i celkový čas, po který tato složka setrvává ve stacionární fázi. Nejjednodušší způsob, jak zlepšit rozlišení látek, je zvýšit počet n , a tedy i L . Výhodnější však je zvětšit relativní rozdíl v distribučních konstantách změnou stacionární nebo mobilní fáze. Rozlišení také závisí na retenčním faktoru druhé složky. Čím bude více zadržována, tím bude rozlišení větší. Látky, které se rychle pohybují kolonou, se proto budou separovat jen nedokonale. Označení veličin a jejich jednotky jsou uvedeny v kap. 1.2.1.3 na str. 21.

Klasická matematická formulace dynamického modelu chromatografické separace je shrnuta v rovnici van Deemtera, Zuiderwega a Klinkenberga, která vyjadřuje závislost výškového ekvivalentu teoretického patra H [mm] na lineární rychlosti mobilní fáze u [cm/min] jako sumu tří nezávislých příspěvků:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (19)$$

Člen A zahrnuje turbulentní difúzi, člen B molekulovou difúzi a člen C odpor proti převodu hmoty. Tato rovnice je vyjádřena grafem (křivka ve tvaru hyperboly) na obr. 9. Rovnice (19) popisuje neideální lineární chromatografii, neuvažuje tedy faktory, které vedou k deformaci Gaussovske eluční křivky. S rostoucí teplotou se snižuje viskozita a zároveň roste člen B . Naopak s rostoucí teplotou se zvyšuje difúzní koeficient a v důsledku toho člen C klesá.



Obr. 9 Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti mobilní fáze (převzato z [58]).

1.3 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je separační, dělicí metoda, která zvyšuje selektivitu a specifičnost v analytické chemii. Chromatografická separace je založena na principu podobnosti (lat. *similia similibus solventur*), tj. nepolární látky se lépe rozpouštějí v nepolárních rozpouštědlech a adsorbují se na nepolárních povrchích. Naopak polární látky se lépe rozpouštějí v polárních rozpouštědlech a adsorbují se na polárních povrchích. V chromatografii dochází k postupnému rozdělování, rozdílné distribuci složek směsi mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna se pohybuje (mobilní) a druhá je nehybná (stacionární), na základě fyzikálně-chemických interakcí, jako jsou adsorpce, rozpouštění, iontová výměna apod. Obvykle se však při separaci uplatňuje více typů interakcí současně. Rozdělovací rovnováha se v chromatografii řídí Nernstovým rozdělovacím zákonem [58]. Směsi látek přítomné v mobilní fázi se pohybují podél stacionární fáze různou rychlostí, protože jsou interakcí se stacionární fází více či méně zadržovány, a tím i zpomalovány v závislosti na hodnotách rovnovážných konstant příslušné interakce. Látky, které interagují silněji se stacionární fází, se pohybují pomaleji než látky, jejichž interakce jsou slabší. Pokud je dráha, kterou směs látek urazí podél stacionární fáze, dostatečně dlouhá a distribuční konstanty (K_D) dostatečně rozdílné, rozdělí se směs látek na zóny jednotlivých složek.

Chromatografická separace slouží ke dvěma základním účelům, lze ji využít pro kvalitativní i kvantitativní analýzu (tj. důkaz, identifikaci a stanovení). V obou případech je žádoucí dosáhnout co nejdokonalejšího rozdělení pokud možno všech složek směsi s co nejmenším úsilím, tj. na co nejkratší dráze, čímž se ušetří čas a používané materiály. V *preparativní* chromatografii se chromatografická separace používá pro izolaci čistých složek a s co největším výtěžkem, např. ze směsi přírodních materiálů [63]. V *analytické* chromatografii se látky od sebe dělí proto, aby mohly být analyticky stanoveny a aby analytické parametry (citlivost, správnost, reprodukovatelnost) byly co nejlepší.

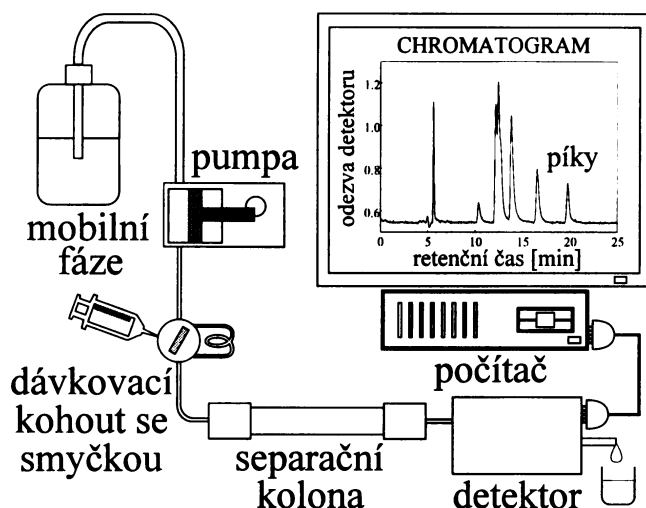
První separaci adsorpční kapalinovou chromatografií uskutečnil ruský botanik M. S. Cvět v roce 1903 [59]. Objev rozdělovací chromatografie spadá do roku 1941 a je spjat se jmény A. J. P. Synge a R. L. M. Martin [57,64]. Avšak moderní vysokoúčinná kapalinová chromatografie pracující za vysokého tlaku se začala používat až o třicet let později.

1.3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Kapalinová kolonová chromatografie zahrnuje skupinu metod, kde je pohyblivou fází kapalina (LLC, LSC a HPLC) [63]. Zatímco nízkotlaká kapalinová chromatografie vyžaduje pro provedení separace hodiny až dny, při vysokoučinné kapalinové chromatografii dojde k separaci již během několika minut. HPLC je univerzální separační metoda, která umožňuje separovat a analyzovat prakticky všechny organické látky [59]. Žádnou jinou vysoce účinnou separační metodou v současnosti nelze analyzovat látky polární, nepolární i iontové povahy, látky těžké i málo těžké nebo látky s relativní molekulovou hmotností od jednotek do tisíců (M_r 70 – 10 000) [63].

Základní výhodou HPLC je možnost účinně ovlivňovat separaci nejenom volbou stacionární fáze, ale rovněž změnami složení mobilní fáze, protože kapalná mobilní fáze není pouze inertním nosičem vzorků, ale podílí se přímo na interakcích rozpuštěných látek se stacionární fází, na rozdíl od plynové chromatografie. Dalším kladem HPLC je poměrně snadné převedení metody do preparativního měřítka [65]. Také miniaturizace má několik významných předností. Je potřeba podstatně menších množství vysoce čistých chemikálií a rozpouštědel, která jsou velmi drahá. Jako mobilní fáze se mohou tedy používat i „exotické“ látky, které by nebylo jinak možno získat v dostatečném množství. Zkracuje se doba analýzy a rovněž se zlepšuje separační účinnost. Kolonu je možno spojit s vysoce selektivními detektory, např. s hmotnostním spektrometrem, který vyžaduje malé vzorky, malé průtokové rychlosti a odstranění většiny mobilní fáze před vstupem do detekční části [66].

Jako každá metoda má samozřejmě i HPLC některé nevýhody. Miniaturizace není pouze kladem, ale přináší s sebou také problémy. Dávkování velmi malých vzorků, definování transportu mobilní fáze při velmi nízkých průtokových rychlostech a konstrukce miniaturních detektorů přinášejí značné obtíže. Oproti plynové chromatografii je navíc o něco pomalejší a méně účinná. Schéma HPLC aparatury je znázorněno na obr. 10 na str. 27.



Obr. 10 Schéma aparatury pro HPLC (převzato z [60]).

1.3.1.1 Chromatografie s obrácenými fázemi (RP-HPLC)

Chromatografii lze klasifikovat také podle polaritý stacionární fáze vůči fázi mobilní. Systém tvořený polární stacionární fází a nepolární mobilní fází je označován jako chromatografie s normálními fázemi. Nejtypičtějším zástupcem normální stacionární fáze je silikagel, jako mobilní fáze se pak používají nepolární rozpouštědla (hexan, heptan, toluen atd.).

RP-HPLC je chromatografická metoda, která využívá nepolární povrch adsorbentu a polární eluent. Od roku 1974 se začala komerčně využívat v širokém měřítku a stala se obecně nejvíce používanou technikou v HPLC [67]. Oproti chromatografii s normálními fázemi má totiž řadu výhod (možnost separace širšího okruhu analytů, vysoká rychlost ustavování rovnováhy v koloně, možnost použití relativně levných mobilních fází a lepší reprodukovatelnost).

V tomto modu chromatografie se silikagel používá pouze jako nosič, na který je chemicky navázána nepolární stacionární fáze. Mobilní fází je směs polárního organického rozpouštědla (methanol, acetonitril aj.) a vody. RP-HPLC je vhodná k separaci nepolárních nebo slabě polárních látek [68]. Nejběžnější reverzní fáze [69] 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. Pořadí eluce na reverzní fázi je opačné

oproti chromatografii s normálními fázemi. Při RP-HPLC na prvním místě eluují látky polární, které jsou následovány látkami semipolárními a nejpозději eluují látky nepolární.

Z komerčně dostupných náplní s chemicky vázanými fázemi lze uvést nepolární fáze s alkylovými řetězci různé délky – C2 až C18 a s fenylovými nebo difenylovými skupinami, které mají zvýšenou polaritu a rozdílnou selektivitu zejména k fenolům a aminosloučeninám. Střední polaritou se vyznačují fáze nitrilové (alkylnitryly) a amidové, které vykazují zvýšenou selektivitu k fenolům, cukrům a alkoholům. Aminofáze mají slabé vlastnosti iontoměniče (anexu).

Chemicky vázané fáze na bázi silikagelu mají dvě základní nevýhody. Jedná se o omezenou stabilitu v silně kyselém a silně bazickém prostředí (využitelný rozsah pH je asi 2 – 8). Bazické sloučeniny jsou protonovány při nízkém pH, zatímco kyselé sloučeniny jsou deprotonovány při vysokém pH. V obou případech jsou látky nabitě, proto interakce se silanolovými skupinami vzrůstá, kdežto interakce s hydrofóbními ligandy klesá. Oblast optimálního pH pro retenci bazických sloučenin je 9 – 10. Oblast optimálního pH pro retenci kyselých sloučenin je 2 – 3 [67].

Druhou nevýhodou je negativní vliv nezreagovaných silanolových skupin ($\equiv\text{Si-OH}$) na povrchu silikagelu, které mohou negativně ovlivňovat separaci zejména bazických látek. I nejlépe připravená chemicky vázaná stacionární fáze obsahuje zbytkové polární silanolové skupiny, jejichž obsah se pohybuje kolem $4 \mu\text{mol/m}^2$, zatímco typický obsah ligandových skupin se pohybuje někde kolem $3,5 \mu\text{mol/m}^2$. Stacionární fáze tudíž obsahuje více zbytkových silanolových skupin než ligandů [70]. Ačkoli většina těchto silanolových skupin není stéricky dostupná chromatografovaným látkám, jsou ještě dostatečně přístupné pro interakce s mobilní fází (vodíkové vazby, dipól-dipólové interakce, iontově výměnné interakce). Toto je potom příčinou stoupající retence a chvostování píků polárních, zejména bazických látek.

Se stoupajícím pH mobilní fáze roste vliv zbytkových silanolových skupin, protože roste jejich počet s negativním nábojem. Proto se v praxi používá eliminace nepolární fáze, tj. minimalizace interakce bazických látek s volnými silanolovými skupinami, čímž je redukováno chvostování píků a tím i nutnost zvyšování obsahu chemicky vázaného uhlíku v nepolární fázi (carbon load). Existuje několik způsobů eliminace nepolární fáze, např. blokováním (endcapping), stérickým stíněním volných

hydroxylových skupin, modifikací ligandu anebo úpravou pH mobilní fáze přidavkem organických aminů do mobilní fáze [70].

1.3.1.2 Vlastnosti mobilní fáze a její vliv na separaci

Mobilní fáze je jedním z nejdůležitějších parametrů v RP-HPLC. Může podporovat či potlačit ionizaci molekul analytu, chránit přístupné zbylé silanolové skupiny atd. Jak již bylo zmíněno v kap. 1.3.1.1 na str. 27, mobilní fáze pro RP-HPLC je směs vody a polárního organického rozpouštědla. Polarita sama není hlavním faktorem působícím na separaci v RP-HPLC. Na rozdíl od acetonitrilu má voda vyšší dipólový moment (vyšší polaritu), mezi vodou a hydrofobním povrchem adsorbentu nemůže tedy dojít ke vzájemné reakci. Rozpouštědla seřazená podle rostoucí polarity, tj. schopnosti mísit se s vodou, tvoří tzv. *elutopní řadu*: pentan, benzen, chloroform, aceton, acetonitril, ethanol, methanol, voda.

Separace na reverzní fázi může být optimalizována využitím specifické selektivity organického rozpouštědla. Retenční faktor k by se měl pohybovat v rozmezí 1 až 10. Při separaci směsi různých složek se doporučuje začít s eluentem o 50% až 60% koncentraci acetonitrilu nebo methanolu ve vodě. Změnou složení mobilní fáze se nezmění selektivita separace ve stejném pořadí jako retence. Viskozita mobilní fáze se mění s jejím nelineárním složením, tlak v koloně závisí tedy na složení eluentu. To má za následek také vliv na rozšiřování zóny analytu, tj. na rovnováhu, ale tento vliv je tak malý, že není experimentálně pozorovatelný. Viskozita a v důsledku toho i tlak v koloně vzrostou více než dvakrát, když se eluent změní ze směsi acetonitrilu a vody v poměru 70:30 (v/v) na směs methanolu a vody ve stejném poměru. Viskozita charakterizuje tokové vlastnosti kapalin, je závislá na teplotě, tlaku a hustotě. S rostoucím tlakem viskozita stoupá, s rostoucí teplotou viskozita klesá a účinnost kolony se zvyšuje.

1.3.1.3 Metody detekce v HPLC

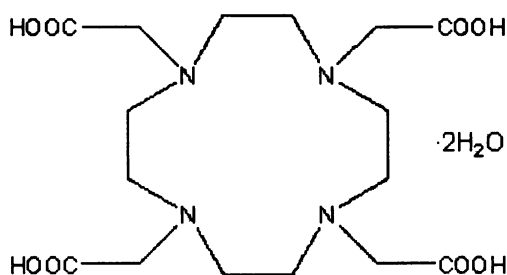
Citlivá metoda detekce je stejně důležitá jako vlastní HPLC separace. Detektory jsou zařízení, která kontinuálně sledují nějakou fyzikální veličinu eluátu vytékajícího z chromatografické kolony. Přitom se vyžaduje, aby se sledovala vlastnost, kterou se separované složky liší od mobilní fáze. Aby se daly sledovat i malé rozdíly vlastností

mobilní kapaliny a eluátu vytékajícího z chromatografické kolony, měří se diferenciálně. Odezva detektoru je úměrná koncentraci látky v eluátu.

Nejčastěji se používá UV/VIS absorpční fotometrický detektor a detektor s diodovým polem (DAD). Měření se provádí při vlnové délce, při které analyt maximálně absorbuje a naopak mobilní fáze absorbuje co nejméně. Existují samozřejmě i látky, pro které není UV/VIS detekce vhodná. Jedná se především o látky výrazně absorbující jen při vlnových délkách pod 200 nm. V této oblasti UV spektra totiž značně absorbují rozpouštědla (methanol, acetonitril) běžně používaná jako součást mobilní fáze pro RP-HPLC. Dalšími z používaných detektorů jsou refraktometrický, fluorimetrický, elektrochemické detektory (amperometrický, vodivostní) anebo hmotnostní spektrometr jako detektor [60].

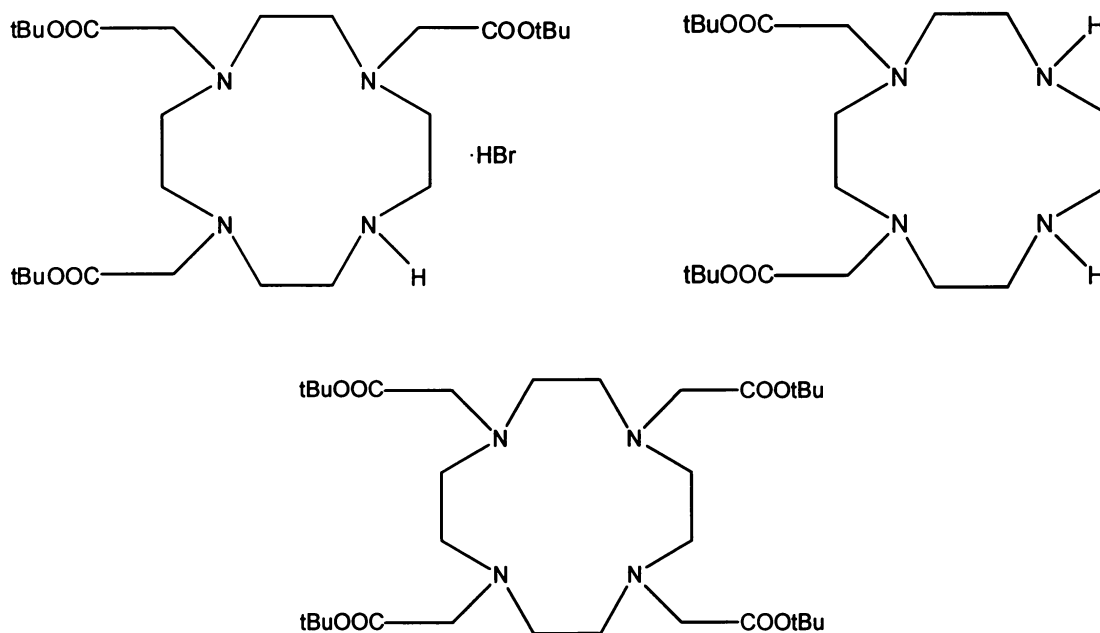
1.4 Studované deriváty cyklenu

Studované polykarboxylátové deriváty cyklenu byly syntetizovány skupinou Prof. I. Lukeše a Doc. P. Hermanna na Katedře anorganické chemie PřF UK v Praze podle postupů [27,37,71,72] a **tBu₂DO2A1** byl připraven Ing. M. Lorencem na Katedře organické chemie PřF UK v Praze postupem [73]. Totožnost a čistota byly stanoveny elementární analýzou a nukleární magnetickou rezonancí, avšak přesto polykarboxylátové deriváty cyklenu používané v této práci nebyly dokonale čisté látky, protože tyto metody nejsou schopny odhalit malé množství příměsí. Jako srovnávací látka při HPLC separaci byla používána 1,4,7,10-tetraazacyklododekan 1,4,7,10-tetraoctová kyselina, dihydrát (viz obr. 11)

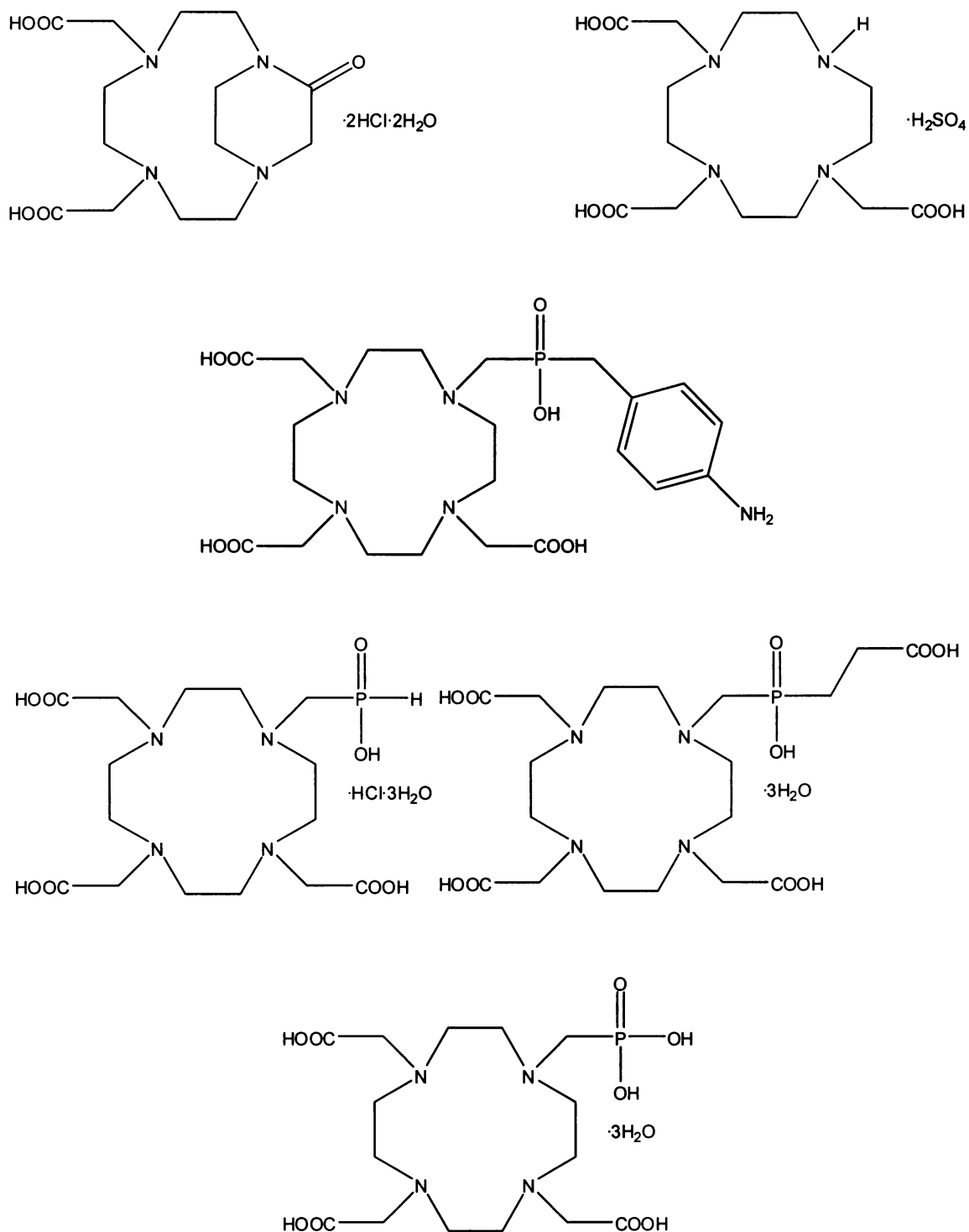


Obr. 11 Struktura srovnávací látky – H₄DOTA·2H₂O.

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 anionty atd.). Na obr. 12 jsou zobrazeny struktury studovaných *esterových* derivátů cyklenu s čistě bazickým charakterem. Na obr. 13 na str. 32 jsou zobrazeny struktury *kyselých* derivátů cyklenu. Jejich systematické názvy, označení a M_r jsou uvedeny v tab. 3 na str. 34.



Obr. 12 Struktury studovaných bazických derivátů cyklenu v pořadí zakreslených chemických struktur: $t\text{Bu}_3\text{DO3A} \cdot \text{HBr}$; $t\text{Bu}_2\text{DO2A1}$; $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$.



Obr. 13 Struktury studovaných kyselých derivátů cykvenu v pořadí zakreslených chemických struktur: $\text{H}_3\text{DO}_3\text{A}\cdot 2\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{H}_3\text{DO}_3\text{A}\cdot \text{H}_2\text{SO}_4$; $\text{H}_4\text{DO}_3\text{AP}^{\text{ABn}}$; $\text{H}_4\text{DO}_3\text{AP}^{\text{H}}\cdot \text{HCl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; $\text{H}_5\text{DO}_3\text{AP}^{\text{PrA}}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; $\text{H}_5\text{DO}_3\text{AP}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

1.4.1 Vlastnosti derivátů cyklu důležité pro RP-HPLC

Molekuly polykarboxylátových derivátů cyklu obsahují čistě nepolární části, ale i značně polární funkční skupiny (viz obr. 11 – 13, str. 30 – 32). Jejich separace tedy může být založena jak na hydrofobních tak i hydrofilních interakcích, které se budou uplatňovat v různé míře podle konkrétní sloučeniny. Stejně tak důležitou vlastností derivátů cyklu pro RP-HPLC je jejich schopnost tvořit amfionty. Všechny deriváty cyklu totiž ve svých molekulách obsahují aminoskupiny schopné protonizace. Kyselé deriváty cyklu obsahují ještě navíc karboxylové a fosfinátové, resp. fosfonátové funkční skupiny, které se mohou naopak deprotonovat [74]. Výsledný náboj jejich molekul se pohybuje podle pH prostředí od +3 do -5.

1.4.2 Vybrané typy stacionárních fází

KLASICKÁ REVERZNÍ FÁZE C18 S BLOKOVANÝMI SILANOLOVÝMI SKUPINAMI

Klasická reverzní fáze C18 je tvořena nerozvětvenými oktadecylovými řetězci. Pro dělení bazických látek je vhodné použít reverzní fázi C18 s blokovanými silanolovými skupinami. Zbytkové silanolové skupiny jsou blokovány trimethylsilanovými skupinami. Separace na této stacionární fázi je založena především na hydrofobních interakcích.

AMINOPROPYLOVÁ STACIONÁRNÍ FÁZE

Jedná se o jednu z nejpolarnějších reverzních fází. Je tvořena silikagelem s nechráněnými zbytkovými silanolovými skupinami. Mezi analyty a aminopropylovou stacionární fází se budou uplatňovat zejména hydrofilní interakce. Přítomné aminoskupiny ($-NH_2$) a nechráněné silanolové skupiny ($\equiv Si-OH$) se navíc mohou chovat jako slabý iontoměnič.

Tab. 3 Systematické názvy a označení studovaných bazických a kyselých derivátů cyklenu a jejich relativní molekulové hmotnosti:

Deriváty cyklenu	Označení	Systematický název derivátů cyklenu	M_r
Bazické	$t\text{Bu}_3\text{DO3A}\cdot\text{HBr}$	tris(<i>terc.</i> butylester) 1,4,7,10-tetraazacyklododekan- -1,4,7-trioctové kyseliny	595,6
	$t\text{Bu}_2\text{DO2A1}$	bis(<i>terc.</i> butylester) 1,4,7,10-tetraazacyklododekan- -1,4-dioctové kyseliny	400,6
	$t\text{Bu}_4\text{DOTA}$	tetrakis(<i>terc.</i> butylester) 1,4,7,10-tetraazacyklo- dodekan-1,4,7,10-tetraoctové kyseliny	628,8
Kyselé	$\text{H}_3\text{DO3A}\cdot 2\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	vnitřní laktam 1,4,7,10-tetraazacyklo-dodekan-1,4,7- -trioctové kyseliny, bishydrogenchlorid dihydrát	437,3
	$\text{H}_3\text{DO3A}\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina, dihydrogensíran	444,5
	$\text{H}_4\text{DO3AP}^{\text{H}}\cdot\text{HCl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová-1- -methylfosfinová kyselina, hydrogenchlorid trihydrát	514,5
	$\text{H}_5\text{DO3AP}^{\text{PrA}}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová-1- -[methyl(2-karboxyethyl)fosfinová kyselina], trihydrát	550,5
	$\text{H}_4\text{DO3AP}^{\text{ABn}}$	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová-1- -{methyl[(4-aminofenyl)methyl]fosfinová kyselina}	529,5
	$\text{H}_5\text{DO3AP}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová-1- -methylfosfonová kyselina, trihydrát	494,4
Srovnávací látka	$\text{H}_4\text{DOTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina, dihydrát	440,4

2 Cíl diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro separaci derivátů cyklenu. V rámci diplomové práce byly řešeny různé problematiky. Ověřovalo se, zda je vysokoúčinná kapalinová chromatografie vhodnou metodou pro separaci studovaných derivátů cyklenu. Optimalizovaly se podmínky separace hledáním vhodného složení mobilní fáze, tj. objemové procentuality organického modifikátoru acetonitrilu v mobilní fázi. Cílem také bylo najít pro separaci derivátů cyklenu nejvhodnější stacionární fázi. Cykleny měly být separovány a určeny ve směsích použitím optimalizovaných podmínek měření.

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Pro spektrofotometrické studium byl použit methanol Chromasolv čistoty pro HPLC od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, SRN). Jako rozpouštědlo pro přípravu vzorků derivátů cykenu a pro HPLC separaci byl použit acetonitril LiChrosolv čistoty pro HPLC od firmy Merck (Darmstadt, SRN) s obsahem vody nižším než 0,03 obj.%. Ostatní použité chemikálie byly analytické čistoty (p.a.): uracil (2,4-dihydroxypyrimidin) od firmy Sigma Chemical (St. Louis, USA) a thiomčovina od firmy Lachema (Brno, ČR). Testovací látky a směsi testovacích látek byly k dispozici na Katedře analytické chemie PřF UK v Praze již jako roztoky o hmotnostní koncentraci 1 mg/cm³. Deionizovaná voda používaná v této práci byla připravena přístrojem Milli-Q (Millipore Corporation, USA) pracujícím na principu reverzní osmózy.

3.2 Přístrojové vybavení

Pevné cykleny pro přípravu vzorků byly odvažovány na analytických vahách Precisa 262 SMA-FR (Precisa Instrument AG, Švýcarsko). Absorpční spektra studovaných derivátů cykenu byla měřena na spektrofotometru HP 8453 (Agilent Technologies, USA) s diodovým polem.

Separace studovaných derivátů cykenu probíhala na kapalinovém chromatografu Ecom 54047, který se skládal z čerpadla LCP 4000 (Ecom, ČR), spektrofotometrického UV detektoru LCD 2084 (Ecom, ČR) a dávkovacího ventilu se smyčkou o objemu 10 µl (Ecom, ČR). Mobilní fáze byla sonifikována na ultrazvukové lázni Elmasonic S15H (P-LAB, ČR). K vývoji metody HPLC separace byly použity tyto kolony: LiChrosphere RP Select B (C18) o rozměru 125 mm x 4 mm a velikosti částic 5 µm (Merck, SRN); Biospher PSI 200 NH o rozměru 150 mm x 4,6 mm a velikosti částic 5 µm (Labio, ČR).

3.3 Použité metody a experimentální podmínky analýzy

3.3.1 Molekulová absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti

Spektrofotometrická charakteristika studovaných derivátů cyklenu v UV/VIS oblasti spektra byla provedena na spektrofotometru s diodovým polem. Pevné vzorky derivátů cyklenu (*t*Bu₃DO3A, *t*Bu₄DOTA, H₄DO3AP^H, H₅DO3AP^{PrA}, H₄DO3AP^{ABn}) byly naváženy na analytických vahách a připraveny rozpuštěním v methanolu na roztoky o $c_m = 1 \text{ mg/cm}^3$ a dále zředěny methanolem na výslednou molární koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$. Vzorek *t*Bu₂DO2A1 byl dodán již jako methanolvý roztok o molární koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$.

Pro eliminaci chyb měření byla připravena vždy tři nezávislá ředění každého vzorku [75]. Tyto roztoky byly měřeny v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 1 cm a 0,2 cm v rozsahu vlnových délek 190 – 700 nm proti blanku (methanolu). Z každého spektra byly odečteny vlnové délky při absorpční hlavního maxima. Vlnové délky, při nichž měly vzorky derivátů cyklenu A_{max} , se pohybovaly v rozmezí 190 – 220 nm. Pro detekci separace cyklenů pomocí RP-HPLC byla zvolena $\lambda = 200 \text{ nm}$ (UV oblast spektra), neboť při této vlnové délce vykazovaly všechny deriváty cyklenu relativně dostatečnou absorpční. Protože methanol při této vlnové délce absorbuje více (UV limit: $\lambda = 205 \text{ nm}$) než acetonitril (UV limit: $\lambda = 190 \text{ nm}$) [76], byl jako organický modifikátor mobilní fáze používán k HPLC separaci cyklenů zvolen acetonitril.

3.3.2 HPLC na reverzní fázi s UV detektorem

Všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě (25 °C). K nástřiku byla použita dávkovací smyčka o objemu 10 μl . Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min anebo na 0,2 ml/min. Pro UV detekci byla zvolena vlnová délka 200 nm. Ke stanovení mrtvého času byly použity roztoky uracilu o koncentraci $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ a thiomocoviny o koncentraci $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$.

Příprava mobilních fází a vzorků

K separaci derivátů cyklenu byly použity tři druhy mobilních fází, které se lišily objemovou procentualitou acetonitrilu ve vodě (80:20, 65:35 a 50:50, v/v). Byly připraveny smísením organického rozpouštědla acetonitrilu s deionizovanou vodou v daném poměru a uchovávány v lednici. Před vlastní analýzou byly sonifikovány na

ultrazvukové lázni po dobu 15 min. Nejprve se k separaci derivátů cykленu začala používat nejméně polární, poté polárnější a nakonec nejvíce polární mobilní fáze, tj. acetonitril-voda v poměru 1:1 (50:50, v/v).

Zásobní vzorky cykленů a směsí derivátů cykленu byly připraveny rozpuštěním odpovídajících množství polykarboxylátových derivátů cykленu v mobilní fázi na molární koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³. Pro HPLC separaci byly zásobní roztoky derivátů cykленu ředěny na koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$ a $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³. Při těchto koncentracích totiž vykazovaly jejich eluční křivky nejlepší tvar.

Kalibrace HPLC pumpy

Nejprve byla provedena kalibrace HPLC pumpy, která spočívá v kalibraci průtoku mobilní fáze F_m [ml/min]. Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min, jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril-voda (50:50, v/v) a změřena stopkami doba potřebná k naplnění objemu 5 ml kalibrovaného odměrného válce o objemu 10 ml. Pokus byl třikrát opakován a z výsledků byl vypočítán aritmetický průměr. Celý pokus byl opakován při průtoku mobilní fáze 1 ml/min a 2 ml/min.

Průtok mobilní fáze F_m (ml/min) byl vypočítán podle rovnice:

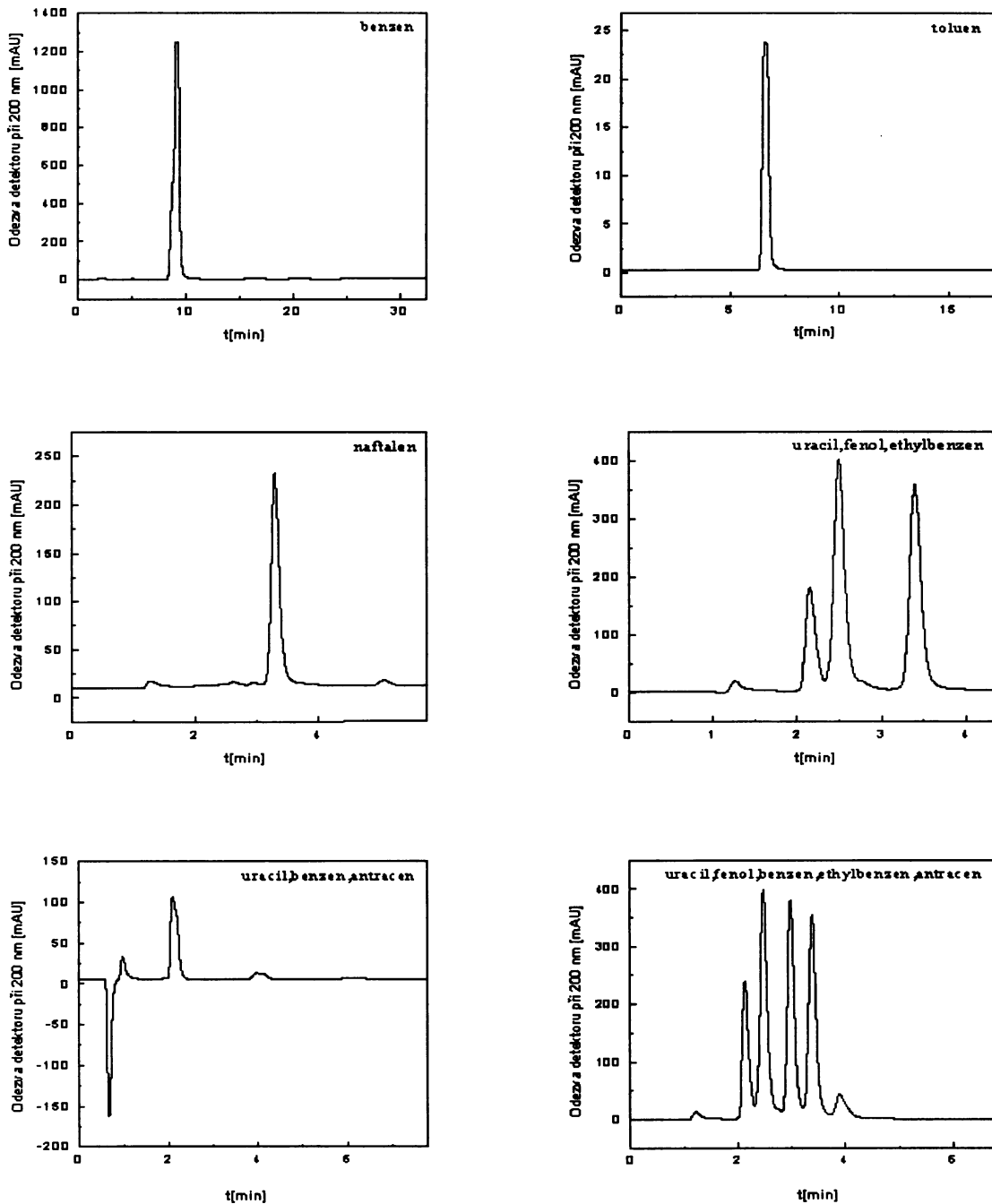
$$F_m = \frac{V}{t} \quad (20)$$

kde V [ml] je objem a t [min] značí čas a byl porovnán s experimentálně zjištěnými hodnotami F_m [ml/min]. Bylo zjištěno, že testovaná pumpa dodává správné množství mobilní fáze při daném nastaveném průtoku.

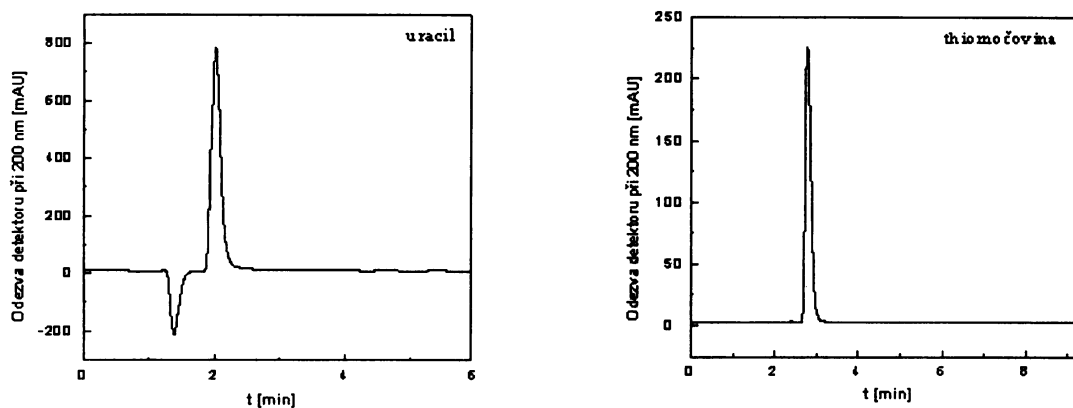
Ověření účinnosti kolony LiChrosphere RP Select B (C18)

Pomocí testovacích látek a směsí testovacích látek byla před vlastní analýzou cykленů ověřena účinnost této kolony. K ověření správné separace, tj. správných retenčních časů (podle polarity separovaných látek), byly použity roztoky testovacích látek v methanolu o $c = 1 \cdot 10$ mol/dm³ – benzen, toluen, naftalen – a roztoky směsí testovacích látek v methanolu o $c = 1 \cdot 10$ mol/dm³ – uracil, fenol, ethylbenzen; uracil, benzen, antracen a uracil, fenol, benzen, ethylbenzen, antracen. K separaci byla použita mobilní fáze acetonitril-voda (65:35, v/v). Chromatogramy testovacích látek a směsí

testovacích látek jsou zobrazeny na obr. 14. Jejich retenční časy jsou uvedeny v tab. 4 na str. 40. Ke stanovení t_m byly použity roztoky uracilu a thioamocoviny (viz obr. 15 a tab. 4 na str. 40).



Obr. 14 Chromatogramy testovacích látek o molární koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³. Stacionární fáze: C18 RP Select B; mobilní fáze: acetonitril-voda (65:35, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm; T: 25 °C.



Obr. 15 Chromatogramy uracilu o molární koncentraci $2 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³ a thioammoniumu o molární koncentraci $2 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³. Stacionární fáze: C18 RP Select B; mobilní fáze: acetonitril-voda (65:35, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm; T: 25 °C.

Tab. 4 Mrtvé retenční časy uracilu ($c = 2 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³), thioammoniumu ($c = 2 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³) a retenční časy testovacích látek a jejich směsí ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³). Stacionární fáze: C18 RP Select B; mobilní fáze: acetonitril-voda (65:35, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm; T: 25 °C:

Testovací látky	t_r [min]
uracil	2,6
thioammonium	2,8
benzen	5,6
toluen	6,6
naftalen	8,0
uracil, fenol, ethylbenzen	2,8; 3,9; 7,9
uracil, benzen, antracen	2,7; 5,6; 10,8
uracil, fenol, benzen, ethylbenzen, antracen	2,8; 3,9; 5,6; 7,8; 10,7

3.4 Statistické zpracování dat

Naměřená data byla zpracována běžnými statistickými postupy [77,78,79]. Výsledky spektrofotometrického měření a HPLC separace jsou mediány z nejméně tří analýz. Chemické vzorce cyklenů byly vytvořeny v programu ChemDraw 6.0.1. (Adept Scientific, UK). Absorpční spektra byla zpracována pomocí programu Adobe Photoshop CS 2 (Adobe Systems Incorporated, USA). Rovnice byly vytvořeny pomocí editoru rovnic v MS Word 2007 (Microsoft Corporation, USA). Nedílnou součástí HPLC aparatury byl osobní počítač s programem CSW 1.6 od firmy Data Apex (Praha, ČR), který sloužil ke sběru a vyhodnocování dat. Chromatografická data pak byla dále zpracována v programu Origin 4.1 (Microcal Software, USA).

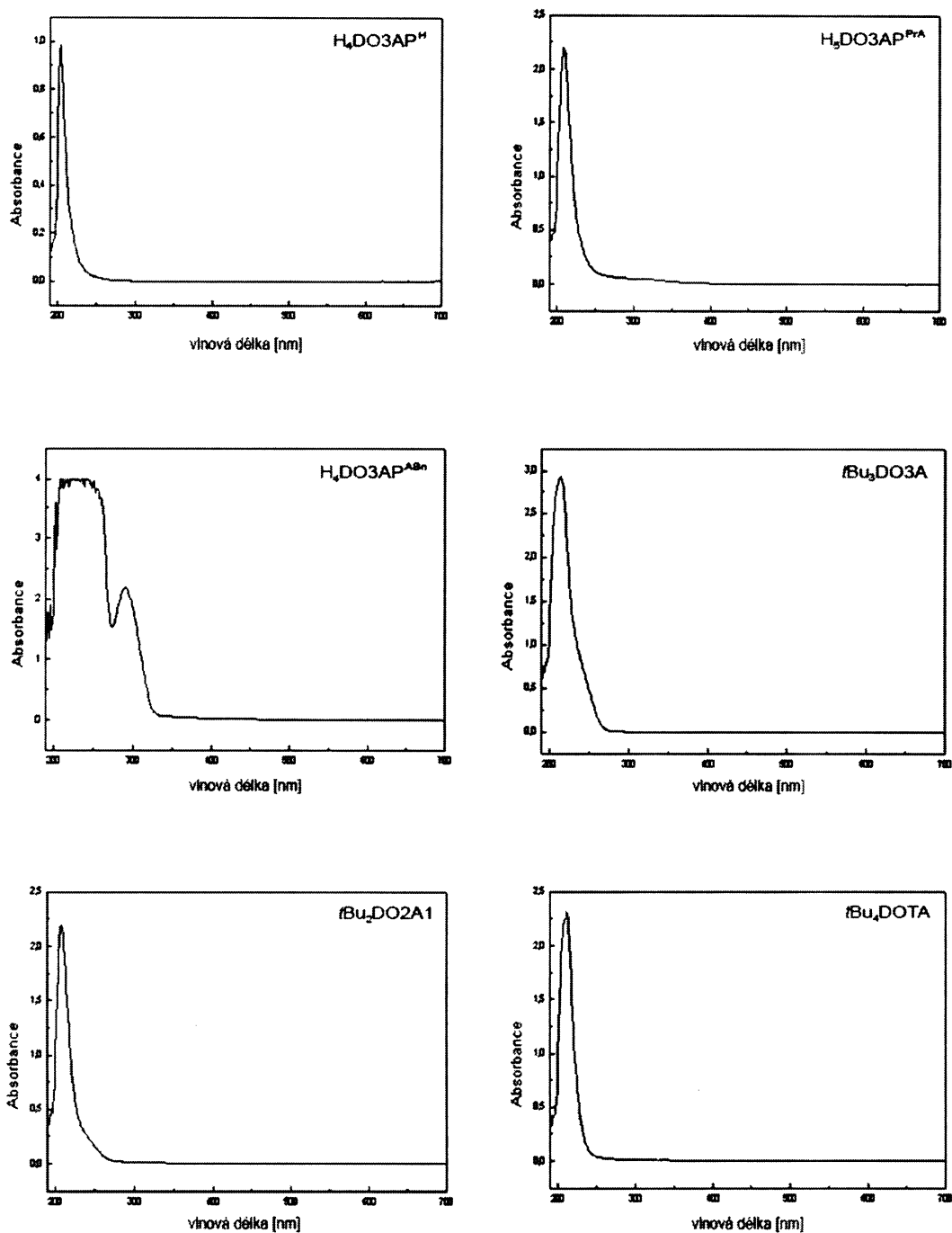
4 Výsledky a diskuze

Pro vývoj metody separace pomocí HPLC se obecně pro látky s relativní molekulovou hmotností do 2000 (viz M_r cyklenů v tab. 3 na str. 34), které jsou rozpustné ve vodných roztocích organických rozpouštědel, doporučuje jako stacionární fáze použití klasických reverzních fází C8 nebo C18 [80]. Právě takovými látkami jsou polykarboxylátové deriváty cyklenu. Na základě jejich chemické struktury a funkčních skupin lze předpokládat, že kromě hydrofobních interakcí může být jejich separace založena i na interakcích hydrofilních. Z tohoto důvodu byla z širokého spektra stacionárních fází k vývoji metody separace použita nejenom klasická reverzní fáze C18, ale i značně polární aminopropylová stacionární fáze.

K dalšímu vývoji metody separace mělo také přispět použití mobilní fáze o proměnlivém složení, tj. proměnlivém množství organického rozpouštědla v mobilní fázi, pomocí něhož byl zkoumán vliv na separaci cyklenů. Jak již bylo zmíněno výše, byl jako organický modifikátor mobilní fáze vybrán acetonitril, neboť při zvolené vlnové délce 200 nm absorbuje na rozdíl od methanolu minimálně (čímž se zvýší citlivost detekce) a deriváty cyklenů se v něm lépe rozpouštějí. Jeho výhodou je také fakt, že je dle eluotropní řady rozpouštědel silnějším elučním činidlem než methanol, je tedy méně polární, a tudíž doba potřebná k separaci studovaných látek bude kratší. Při hledání vhodné mobilní fáze byla nejprve testována mobilní fáze acetonitril-voda (80:20, v/v). Pokud nebylo dosaženo úspěšné separace, byla snížením obsahu organického modifikátoru snížena eluční síla mobilní fáze pro nepolární látky.

4.1 Molekulová absorpční spektrofotometrie derivátů cyklenu

Pro zjištění nastavení vhodných podmínek detekce (vhodné vlnové délky) ke studiu derivátů cyklenu pomocí HPLC byla proměřena spektra studovaných derivátů cyklenu v UV/VIS oblasti. Absorpční spektra byla měřena na spektrofotometru s diodovým polem v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 1 cm ve vlnovém rozsahu 190 – 700 nm. V této fázi měření byly nesyntetizovány pouze některé deriváty cyklenu.



Obr. 16 Absorpční spektra derivátů cyklenu (roztoky o molární koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³ v methanolu) v pořadí zobrazených spekter: H_4DO3AP^H , H_3DO3AP^{PrA} , H_4DO3AP^{ABn} , tBu_3DO3A , tBu_2DO2A1 , tBu_4DOTA . Měření bylo provedeno v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 1 cm na spektrofotometru s diodovým polem v UV/VIS oblasti v rozsahu vlnových délek 190 – 700 nm.

Z naměřených absorpčních spekter (viz obr. 16) vyplývá, že studované polykarboxylátové deriváty cyklenu absorbují velmi slabě v UV/VIS oblasti, neboť ve svých molekulách žádný výrazný chromofor nemají. Výjimku tvoří pouze H_4DO3AP^{ABn} ,

který ve své molekule obsahuje aromatický kruh (výrazný chromofor v UV oblasti spektra), má tedy ze studovaných derivátů cyklenu největší molární absorpční koeficient ϵ [m^2/mol], tudíž i vyšší A_{max} oproti ostatním derivátům cyklenu [81]. Nejvýhodnější byla $\lambda = 200$ nm, při které vykazovaly všechny deriváty cyklenu relativně dostatečnou A , proto byla tato vlnová délka zvolena pro HPLC analýzu na reverzní fázi s UV detektorem.

4.2 RP-HPLC separace derivátů cyklenu

4.2.1 Kolona LiChrosphere C18 RP Select B

Jak již bylo zmíněno v úvodu, kolona RP Select B je klasickou stacionární fází C18 s blokovanými silanolovými skupinami. Pro vývoj metody separace polykarboxylátových derivátů cyklenu byla zvolena jako výchozí stacionární fáze především z toho důvodu, že je díky nízké silanolové aktivitě vhodná pro analýzu bazických látek a navíc vykazuje značnou hydrofobicitu. Polykarboxylátové deriváty cyklenu jsou poměrně dobře rozpustné v acetonitrilu. Také díky této vlastnosti byl acetonitril zvolen jako organický modifikátor mobilní fáze. Byly použity tři druhy mobilních fází, které se od sebe lišily objemovou procentualitou acetonitrilu a vody.

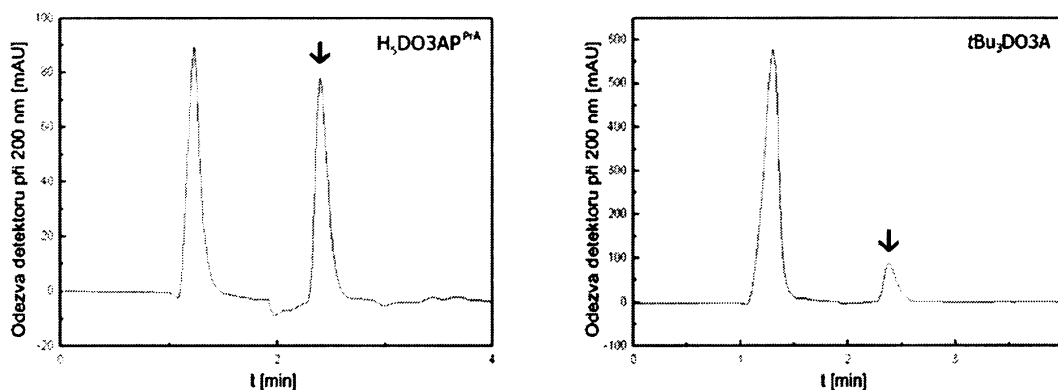
Esterové deriváty cyklenu jsou v důsledku ochrany karboxylových skupin *terc.*butyly podstatně hydrofobnější než deriváty kyselých. Lze proto předpokládat, že na klasické reverzní fázi budou zadržovány více než kyselá deriváty cyklenu. Čím více *terc.*butylových skupin derivát cyklenu obsahuje, tím silnější lze očekávat interakci se stacionární fází. Předpokládané pořadí eluce esterových derivátů cyklenu na fázi C18 je *t*Bu₂DO2A1, *t*Bu₃DO3A a jako poslední by měl eluovat *t*Bu₄DOTA. Mezi jednotlivými kyselými deriváty cyklenu není v hydrofobicitě příliš velký rozdíl, pouze **H₄DO3A^{ABn}**, který jako jediný ve své molekule obsahuje aromatický kruh a je tudíž hydrofobnější, měl by tedy patrně eluovat později než ostatní kyselá deriváty cyklenu.

4.2.1.1 Mobilní fáze acetonitril-voda (80:20, v/v)

Nejprve byla k separaci použita nejméně polární mobilní fáze, tj. s vyšším obsahem acetonitrilu (acetonitril-voda 80:20, v/v). Bazické deriváty cyklenu se separovaly dle principu separace na reverzní fázi (podle očekávání byl zadržován *t*Bu₂DO2A1 nejméně a *t*Bu₄DOTA nejvíce), k jejich dostatečné interakci se stacionární

fází však nedošlo. Kyselé deriváty cyklenu se na reverzní stacionární fázi zdržovaly jen o něco méně než bazické deriváty cyklenu (viz tab. 5, str. 47). Derivát $\text{H}_4\text{DO3AP}^{\text{ABn}}$ byl z kyselých derivátů cyklenu zdržován nejvíce (viz tab. 5, str. 47), neboť ve své molekule obsahuje aromatický kruh (π - π interakce). Mírné zdržování polykarboxylátových derivátů cyklenu bylo způsobeno příliš slabými hydrofobními interakcemi, které jsou zřejmě zapříčiněny skutečností, že v použité mobilní fázi o přibližně neutrálním pH mají kyselé i bazické deriváty podobu iontů. Esterové deriváty cyklenu totiž mají při pH 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, proto eluovaly téměř s mrtvým časem.

Chromatogramy vybraných derivátů cyklenu jsou uvedeny na obr. 17. V této fázi analýzy byly k dispozici stejně jako pro měření absorpčních spekter pouze deriváty $t\text{Bu}_2\text{DO2A1}$, $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$, $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$, $\text{H}_4\text{DO3AP}^{\text{H}}$, $\text{H}_5\text{DO3AP}^{\text{PrA}}$, $\text{H}_4\text{DO3AP}^{\text{ABn}}$.



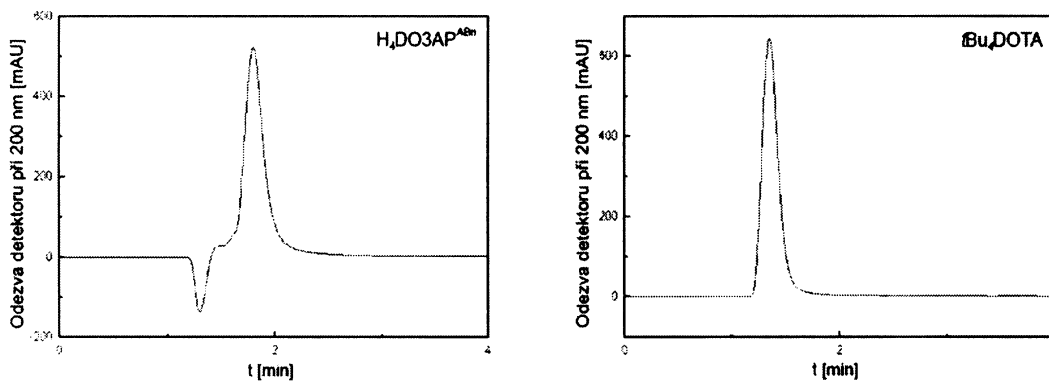
Obr. 17 Chromatogramy $\text{H}_5\text{DO3AP}^{\text{PrA}}$ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³ a $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³ – píky označeny šipkou. Stacionární fáze: C18 RP Select B; mobilní fáze: acetonitril-voda (80:20, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm; T: 25 °C. První pík na chromatogramu $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ patří pravděpodobně HBr. Původ prvního píku na chromatogramu $\text{H}_5\text{DO3AP}^{\text{PrA}}$ není znám.

Vzorky esterových cyklenu byly krystalizovány přímo z reakčních směsí a navíc nebyly přečištěny sloupcovou chromatografií, mohou tedy obsahovat nečistoty, které odpovídají prvnímu píku. Z obr. 17 je patrné, že se jedná o látku, která značně absorbuje při dané vlnové délce a zdržuje se na reverzní fázi méně než bazické deriváty cyklenu. Je tedy více polární než bazické deriváty cyklenu a navíc vzniká při jejich syntéze a tak

by onou příměsí mohla být právě kyselina bromovodíková, což potvrdily experimentální výsledky. Na chromatogramu derivátu $\text{H}_5\text{DO3AP}^{\text{PrA}}$ (obr. 17, str. 45) první pík odpovídá rovněž příměsí, avšak její původ je nejasný.

4.2.1.2 Mobilní fáze acetonitril-voda (65:35, v/v)

Aby se optimalizovaly podmínky separace, byla vyzkoušena mobilní fáze o nižším obsahu acetonitrilu, tj. byla snížena eluční síla mobilní fáze pro nepolární látky, a naopak se urychlila eluce polárních látek. V této fázi měření již byly k dispozici i další kyselé deriváty cyklenu – $\text{H}_3\text{DO3A}$ (vnitřní laktam), $\text{H}_3\text{DO3A}$, $\text{H}_5\text{DO3AP}$ a H_4DOTA jako srovnávací látka. Z tab. 5 na str. 47 je patrné, že dle předpokladu byly kyselé deriváty cyklenu, a oproti očekávání esterové deriváty méně zadržovány než při použití mobilní fáze acetonitril-voda (80:20, v/v). Na obr. 18. jsou znázorněny dva vybrané chromatogramy, z jejichž porovnání vyplývá překvapivé zjištění: retenční čas esterového derivátu $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ je dokonce kratší než retenční čas kyselého derivátu $\text{H}_4\text{DO3AP}^{\text{ABn}}$, což odporuje principům dělení na klasické reverzní fázi. Hydrofilní interakce polárních skupin bazických derivátů cyklenu s mobilní fází převážily nad hydrofobními interakcemi se stacionární fází.

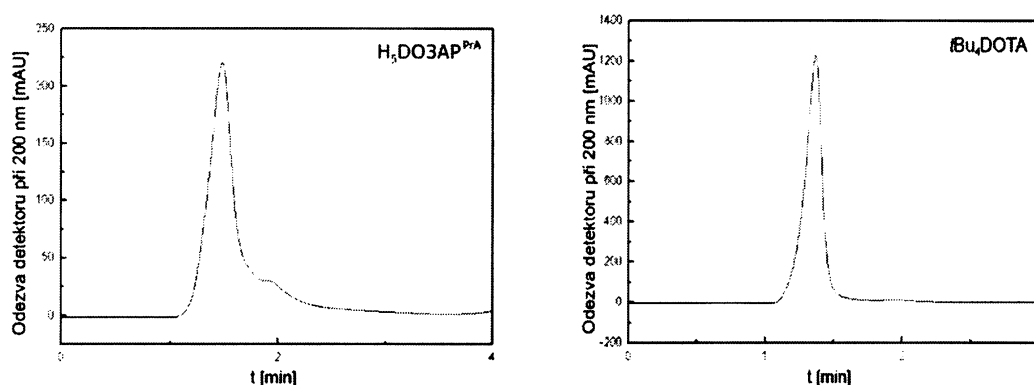


Obr. 18 Chromatogramy $\text{H}_4\text{DO3AP}^{\text{ABn}}$ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ a $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ o koncentraci $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$. Stacionární fáze: C18 RP Select B; mobilní fáze: acetonitril-voda (65:35, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm; T: 25 °C.

4.2.1.3 Mobilní fáze acetonitril-voda (50:50, v/v)

Jako poslední byla použita mobilní fáze o stejném poměru acetonitril-voda (50:50, v/v). Z tab. 5 na str. 47 vyplývá, že se ještě více urychlila eluce kyselých, ale i bazických derivátů cyklenu. Podle předpokladu měly esterové deriváty naopak eluovat

ještě později než při použití mobilní fáze acetonitril-voda (65:35, v/v). Hydrofilní interakce polárních skupin bazických derivátů cyklenu s mobilní fází však převážily nad hydrofobními interakcemi se stacionární fází. Na obr. 19 jsou pro představu zobrazeny pouze některé chromatogramy studovaných derivátů cyklenu.



Obr. 19 Chromatogramy H_5DO3AP^{PrA} o koncentraci $2 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³ a tBu_4DOTA o koncentraci $2 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³. Stacionární fáze: C18 RP Select B; mobilní fáze: acetonitril-voda (50:50, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm; T: 25 °C.

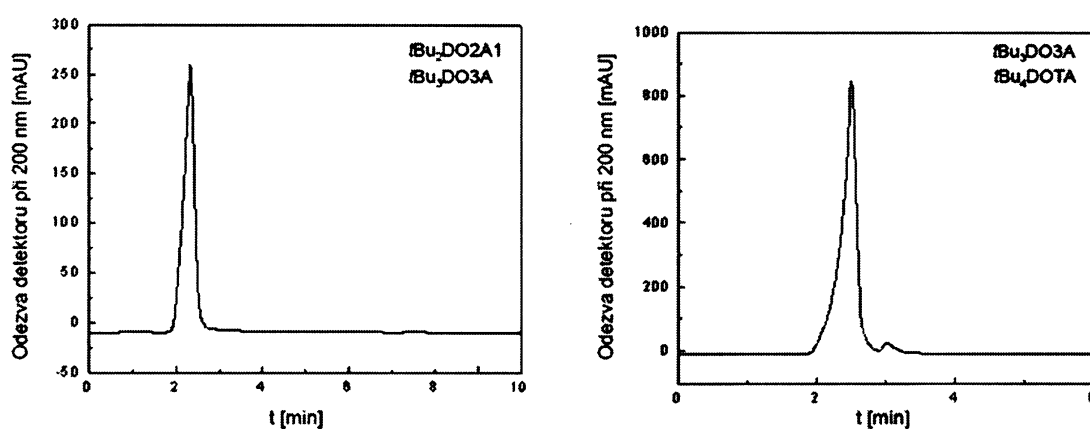
Tab. 5 Retenční časy studovaných derivátů cyklenu na koloně LiChrosphere C18 RP Select B při použití mobilních fází o různém poměru acetonitril-voda. (Při použití mobilní fáze acetonitril-voda (80:20, v/v) byly k dispozici pouze deriváty tBu_2DO2A1 , tBu_3DO3A , tBu_4DOTA , H_4DO3AP^H , H_5DO3AP^{PrA} , H_4DO3AP^{ABn}).

Kolona LiChrosphere C18 RP Select B

Složení mobilní fáze v poměru acetonitril-voda (v/v)		80:20	65:35	50:50
Deriváty cyklenu		t_r [min]		
Bazické	tBu_2DO2A1	2,40	1,82	1,31
	tBu_3DO3A	2,41	1,46	1,37
	tBu_4DOTA	2,42	1,49	1,37
Kyselé	H_3DO3A (vnitřní laktam)	–	1,77	1,56
	H_3DO3A	–	1,79	1,67
	H_4DO3AP^H	2,41	1,77	1,57
	H_5DO3AP^{PrA}	2,41	1,54	1,48
	H_4DO3AP^{ABn}	2,43	1,83	1,51
	H_5DO3AP	–	1,84	1,55
Srovnávací látka	H_4DOTA	–	1,72	1,49

Separace směsí bazických derivátů cyklenu

Vytyčeným cílem byla také separace směsí bazických derivátů cyklenu a potvrzení přítomnosti jednotlivých derivátů cyklenu ve směsi. Avšak kvůli slabým hydrofobním interakcím esterových derivátů se stacionární fází C18 se dalo předpokládat, že k jejich separaci nedojde. K ověření, že k separaci bazických derivátů cyklenu opravdu nedojde, byla použita mobilní fáze acetonitril-voda (80:20, v/v). Všechny esterové deriváty cyklenu skutečně eluovaly ve stejném čase a za daných experimentálních podmínek se nesePARovaly, proto se v chromatogramu objevoval pouze jeden pík (viz obr. 20).



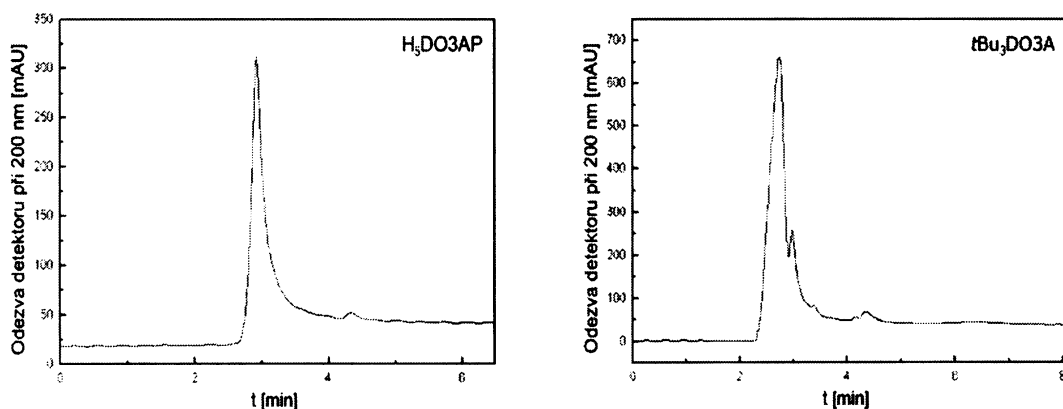
Obr. 20 Chromatogramy směsí $t\text{Bu}_2\text{DO2A1}$ a $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ o koncentraci $5 \cdot 10^{-5}$ mol/cm³; směsí $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ a $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ o koncentraci $2 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³. Stacionární fáze: C18 RP Select B; mobilní fáze: acetonitril-voda (80:20, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm; T: 25 °C.

4.2.2 Kolona Biosphere PSI 200 NH

Při dalším vývoji metody separace kyselých derivátů cyklenu byla vyzkoušena stacionární fáze s navázanými aminopropylými řetězci, která je „polární“ oproti klasické reverzní fázi C18. Důvodem použití této kolony je předpoklad, že se na ní budou kyselé deriváty cyklenu více zdržovat, a tím dojde k jejich lepší separaci než na reverzní fázi C18. Aminoskupiny stacionární fáze se navíc v kyselém prostředí chovají jako slabý iontoměnič (anex). K separaci na této koloně byly rovněž použity tři mobilní fáze o různém poměru acetonitrilu a vody stejně jako při separaci na reverzní fázi C18. Retenční časy studovaných derivátů cyklenu při použití mobilních fází o různé objemové procentualitě acetonitrilu v mobilní fázi jsou uvedeny v tab. 6 na str. 51.

4.2.2.1 Mobilní fáze acetonitril-voda (80:20, v/v)

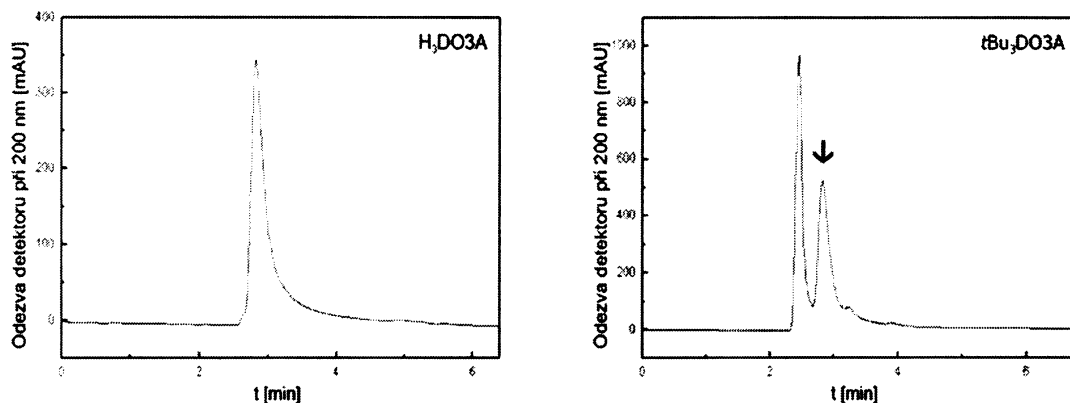
Při separaci na aminopropylové stacionární fázi a při použití mobilní fáze o složení acetonitril-voda (80:20, v/v) byly kyselé deriváty cyklenu dle předpokladu zadržovány více než na RP C18, ale jejich retenční časy nebyly dostatečně odlišné, aby se tyto podmínky daly využít pro jejich separaci v preparativní chromatografii pro čištění derivátů cyklenu po syntéze. Esterové deriváty eluovaly vlivem interakcí jejich polárních skupin s „polární“ aminopropylovou stacionární fází také později než na reverzní fázi C18. Uplatnily se hydrofilní interakce polárních skupin separovaných látek s aminoskupinami stacionární fáze. Vybrané chromatogramy studovaných derivátů cyklenu jsou zobrazeny na obr. 21.



Obr. 21 Chromatogramy $\text{H}_3\text{DO3AP}$ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ a $\text{tBu}_3\text{DO3A}$ o koncentraci $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$. Stacionární fáze: Biosphere PSI 200 NH; mobilní fáze: acetonitril-voda (80:20, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm; T: 25 °C.

4.2.2.2 Mobilní fáze acetonitril-voda (65:35, v/v)

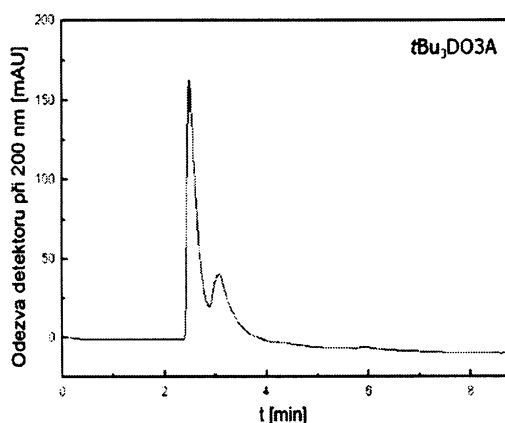
Při použití této mobilní fáze došlo u všech studovaných derivátů cyklenu k mírnějšímu zadržení než při použití mobilní fáze acetonitril-voda (80:20, v/v), jak vyplývá z experimentálních výsledků (obr. 22 na str. 50 a tab. 5 na str. 51). Při použití této mobilní fáze polární skupiny bazických derivátů cyklenu interagovaly silněji s polární mobilní fází (vyšší obsah vody). Vybrané chromatogramy studovaných derivátů cyklenu jsou zobrazeny na obr. 22. Kyselé deriváty cyklenu důsledkem nižšího obsahu acetonitrilu v mobilní fázi eluovaly také dříve. Na chromatogramu derivátu $\text{tBu}_3\text{DO3A}$ je patrný ještě jeden pík (1.pík), který patří pravděpodobně kyselině bromovodíkové.



Obr. 22 Chromatogramy $\text{H}_3\text{DO3A}$ (vnitřní laktam) o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ a $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ o koncentraci $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ (první pík patří pravděpodobně HBr). Stacionární fáze: Biosphere PSI 200 NH; mobilní fáze: acetonitril-voda (65:35, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm; T: 25 °C.

4.2.2.3 Mobilní fáze acetonitril-voda (50:50, v/v)

Avšak při použití mobilní fáze se značně sníženou eluční silou byly bazické deriváty cykvenu na aminopropylové stacionární fázi zadržovány nejvíce. Větší retence bazických derivátů cykvenu byla způsobena jednak nízkou eluční silou mobilní fáze a také vlivem hydrofilních interakcí s „polární“ stacionární fází. Jak je patrné z obr. 23 pík $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ komigroval s eluční křivkou příměsi v jednom píku.



Obr. 23 Chromatogram $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$. Stacionární fáze: Biosphere PSI 200 NH; mobilní fáze: acetonitril-voda (50:50, v/v); průtok: 0,5 ml/min; UV detekce při vlnové délce 200 nm; T: 25 °C.

Oproti očekávání byly zadržovány však i kyselé deriváty cyklenu o něco více než při použití mobilní fáze acetonitril-voda (65:35, v/v). Pouze srovnávací látka **H₄DOTA** eluovala dříve, tedy dle předpokladu.

Tab. 6 Retenční časy studovaných derivátů cyklenu na koloně Biosphere PSI 200 NH při použití mobilních fází o různém poměru acetonitrilu a vody.

Kolona Biosphere PSI 200 NH				
Složení mobilní fáze v poměru acetonitril-voda (v/v)		80:20	65:35	50:50
Deriváty cyklenu			<i>t_r</i> [min]	
Bazické	<i>t</i> Bu ₂ DO2A1	2,86	2,83	3,01
	<i>t</i> Bu ₃ DO3A	2,70	2,59	2,99
	<i>t</i> Bu ₄ DOTA	2,67	2,66	3,10
Kyselé	H ₃ DO3A (vnitřní laktam)	2,90	2,75	3,10
	H ₃ DO3A	2,94	2,89	3,10
	H ₄ DO3AP ^H	2,97	2,92	3,20
	H ₅ DO3AP ^{PrA}	2,97	2,91	3,10
	H ₄ DO3AP ^{ABn}	2,87	2,79	3,10
	H ₅ DO3AP	2,87	2,84	3,20
Srovnávací látka	H ₄ DOTA	2,93	2,87	2,83

5 Závěr

V rámci této diplomové práce bylo studováno chromatografické chování polykarboxylátových derivátů cyklenu, které nebyly doposud v literatuře separovány a kvantifikovány pomocí metody HPLC. Tyto studované deriváty s „nepolárním“ motivem cyklenu obsahují navíc i značně polární funkční skupiny, které tak mohou ovlivnit druh interakce se stacionární fází. Jelikož se tedy jedná o sloučeniny s velmi složitou strukturou, není možné předem určit, které druhy interakcí se stacionární fází budou při jejich separaci převládat, a tedy na jaké stacionární fázi by došlo k jejich úspěšné separaci, tj. s co nejlepším rozlišením. Proto byly vyzkoušeny dva druhy kolon s rozdílnými typy interakcí: kolona *LiChrosphere RP Select B* – klasická nepolární reverzní fáze s nerozvětvenými C18 řetězci a s blokovanými silanolovými skupinami, která je především vhodná pro separaci bazických látek, a kolona *Biospher PSI 200 NH* – značně polární fáze s aminopropylovými řetězci, na které se měly uplatnit hydrofilní interakce především kyselých derivátů cyklenu.

K dalšímu studiu chromatografických vlastností derivátů cyklenu bylo využito mobilních fází o různé eluční síle, a sice mobilní fáze acetonitrilu (jako organického modifikátoru) v různém poměru s vodou. Cílem bylo najít optimální podmínky separace použitím pouze jednoduché mobilní fáze, tj. například bez použití iontově párových činidel. Tato činidla se totiž těžko vymývají z kolony a mohou také hydrolyzou siloxanových vazeb poškozovat stacionární fázi na bázi silikagelu a snižovat tak její účinnost. Proto jsou pro preparativní chromatografii zcela nevhodná. Lze konstatovat, že vysokoúčinná kapalinová chromatografie je vhodnou metodou separace derivátů cyklenu, ale je třeba najít lepší podmínky pro jejich separaci, které by mohly být využity pro jejich separaci v preparativní chromatografii pro čištění derivátů cyklenu po syntéze.

Z experimentálních výsledků vyplývá, že použitím mobilní fáze složené pouze z acetonitrilu a vody úspěšné separace dosaženo nebylo. Studované deriváty cyklenu se nezadržovaly ani na klasické reverzní stacionární fázi C18 ani na částečně polární aminopropylové stacionární fázi a eluovaly prakticky s mrtvým časem. Neboť jejich retenční časy nebyly dostatečně odlišné, nepodařilo se bazické deriváty cyklenu od sebe oddělit. Pro úspěšnou separaci derivátů cyklenu je třeba vyzkoušet další méně běžné

stacionární fáze, jakými jsou například stacionární fáze perfluorovaná, amidofáze či slabé iontoměniče [82,83], a zároveň vyzkoušet i jiné organické modifikátory mobilní fáze, popř. upravit její pH anebo použít cyklodextriny jako „prostředníky“ vazby derivátů cyklenu na stacionární fázi. Tato experimentální práce bude však již naplnit dalších diplomových projektů.

Závěrem lze říci, že vytyčené cíle předkládané diplomové práce byly splněny, nebylo však dosaženo uspokojivých výsledků, jelikož se nepodařilo nalézt optimální podmínky separace studovaných derivátů cyklenu pomocí HPLC.

Literatura

- [1] Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie*. Praha, Grada Publishing 2002.
- [2] Hynie, S.: *Farmakologie v kostce*. 2. přeprac. vyd. Praha, Triton 2001.
- [3] Zuna, I.; Poušek, L.: *Úvod do zobrazovacích metod v lékařské diagnostice*. Praha, vydavatelství ČVUT 2000.
- [4] Anderson, C. J.; Welch, M. J.: *Chem. Rev.* **99**, 2219 (1999).
- [5] <<http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/inside.htm>> [cit. 19.4.2008]
- [6] Merbach, A. E.; Tóth, E.: *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. Chichester, New York, John Wiley & Sons 2001.
- [7] Shinoda, S.; Nishimura, T.; Tadokoro, M.; Tsukube, H.: *J. Org. Chem.* **66**, 6104 (2001).
- [8] Cotton, F. A.; Wilkinson, G.; Murilo, C. A.; Bochmann, M.: *Advanced Inorganic Chemistry*. 6th ed. New York, John Wiley & Sons 1999.
- [9] Čermáková, L.; Němec, I.: *Vybrané kapitoly z teoretické analytické chemie*. Praha, SPN 1983.
- [10] Stetter, H.; Mayer, K. H.: *Chem. Ber.* **94**, 1410 (1961).
- [11] Buøen, S.; Dale, J.; Krane, J.: *Acta Chem. Scand.* **38**, 773 (1984).
- [12] Zhang, R.; Bush, D. H.: *Inorg. Chem.* **32**, 4920 (1993).
- [13] <<http://chemicaland21.com/lifescience/UH/CYCLEN.htm>> [cit. 12.4.2006]
- [14] Bradshaw, J. S.; Krakowiak, K. E.; Izatt, R. M.: Aza-Crown Macrocycles. In: *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*. Taylor E. C. (ed.). New York, John Wiley & Sons 1993, p. 1-29.
- [15] Tsukube, H.; Shinoda, S.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **77**, 453 (2004).
- [16] van Alphen, J.: *Rec. Trav. Chim.* **56**, 343 (1937).
- [17] Meyer, M.; Dahaoui-Gindrey, V.; Lecomte, C.; Guillard, R.: *Coord. Chem. Rev.* **178**, 1313 (1998).
- [18] Kobayashi, K.; Tsuboyama, S.; Tsuboyama, K.; Sakurai, T.: *Acta Cryst.* **50**, 306 (1994).

-
- [19] Kobayashi, K.; Tsuboyama, S.; Sakurai, T.; Tsuboyama, K.; Ito, T.: *Anal. Sci.* **12**, 821 (1996).
- [20] Lau, V. C.; Berben, L. A.; Long, J. R.: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9042 (2002).
- [21] Atkins, T. J.; Richman, J. E.; Oettle, W. F.: *Org. Synth.* **58**, 86 (1978).
- [22] Atkins, T. J.; Richman, J. E.; Oettle, W. F.: *Org. Synth.* **6**, 652 (1988).
- [23] Weisman, G. R.; Reed, D. P.: *J. Org. Chem.* **62**, 4548 (1997).
- [24] Weisman, G. R.; Reed, D. P.: *Org. Synth.* **78**, 73 (2002).
- [25] Weisman, G. R.; Reed, D. P.: *Org. Synth.* **10**, 667 (2004).
- [26] Li, C.; Wong, W-T.: *Tetrahedron Lett.* **43**, 3217 (2002).
- [27] Li, C.; Wong, W-T.: *J. Org. Chem.* **68**, 2956 (2003).
- [28] Kimura, E.; Aoki, S.; Koike, T.; Shiro, M. J.: *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 3068 (1997).
- [29] Dischino, D. D.; Delaney, E. J.; Emswiler, J. E.; Gaughan, G. T.; Prasad, J. S.; Srivastava, S. K.; Tweedle, M. F.: *Inorg. Chem.* **30**, 1265 (1991).
- [30] Boldrini, V.; Giovenzana, G. B.; Pagliarin, R.; Palmisano, G.; Sisti, M.: *Tetrahedron Lett.* **41**, 6527 (2000).
- [31] Filali, A.; Yaouanc, J. J.; Handel, H.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **30**, 560 (1991).
- [32] Li, C.; Wong, W-T.: *Tetrahedron Lett.* **60**, 5595 (2004).
- [33] Kruper, W. J.; Rudolf, P. R.; Langhoff, C. A.: *J. Org. Chem.* **58**, 3869 (1993).
- [34] Reichardt, C.: *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. 3rd ed. Weinheim, Wiley-VCH 2003.
- [35] Glass, R. S.: *Conformational Analysis of Medium-Sized Heterocycles*. New York, VCH 1988.
- [36] Volkert, W.; Hoffman, T. J.: *Chem. Rev.* **99**, 2269 (1999).
- [37] Rudovský, J.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Máner, V.; Aime, S.: *Org. Biomol. Chem.* **3**, 112 (2005).
- [38] Rohovec, J.; Vojtišek, P.; Hermann, P.; Ludvík, I.; Lukeš, J.: *Chem. Soc. Dalton Trans.* **2**, 141 (2000).

-
- [39] Lukeš, I.; Kotek, J.; Vojtišek, P.; Hermann, P.: *Coord. Chem. Rev.* **216**, 287 (2001).
- [40] Liu, S.; Edwards, D. S.: *Bioconjug. Chem.* **12**, 7 (2001).
- [41] Loncin, M. F.; Desreux, J. F.; Merciny, E.: *Inorg. Chem.* **25**, 2646 (1986).
- [42] Jurisson, S.; Berning, D.; Jia, W.; Ma, D.: *Chem. Rev.* **93**, 1137 (1993).
- [43] Alexander, V.: *Chem. Rev.* **95**, 273 (1995).
- [44] Percelay, L.; Appriou, P.; Handel, H. et al.: *Anal. Chim. Acta* **209**, 249 (1988).
- [45] Blain, S.; Appriou, P.; Chaumeil, H.; Handel, H.: *Anal. Chim. Acta* **232**, 331 (1990).
- [46] Cibulka, R.; Vasold, R.; König, B.: *Chem. Eur. J.* **10**, 6223 (2004).
- [47] Mejeritskaia, E.; Luo, F.; Kelly, C. A. et al.: *Inorg. Chim. Acta* **246**, 295 (1996).
- [48] <http://wwwlib.umi.com/dissertations/preview_all/9939588> [cit. 2.9.2007]
- [49] Shinoda, S.; Okazaki, T.; Player, T. N.; Misaki, H.; Hori, K.; Tsukube, H.: *J. Org. Chem.* **70**, 1835 (2005).
- [50] Kryatova, O. P.; Kolchinski, A. G.; Rybak-Akimova, E. V.: *J. Incl. Phen. and Macrocycl. Chem.* **42**, 251 (2002).
- [51] Aoki, S.; Jikiba, A.; Takeda, K.; Kimura, E.: *J. of Phys. Org. Chem.* **17**, 489 (2004).
- [52] Cox, P. J.; Lin, P. K. T.: *Acta Cryst.* **60**, 321 (2004).
- [53] <<http://www.acne-resource.org/acne-skin-care/tri-cyclens.html>> [cit. 19.11.2006]
- [54] Song, J. B.; Hah, S. S.; Suh, J.: *Bull. Korean Chem. Soc.* **25**, 1703 (2004).
- [55] Maie, K.; Nakamura, M.; Yamana, K.: *Nucleoside/tides & Nucleic Acids* **25**, 453 (2006).
- [56] Subat, M.; Gallmeier, H-Ch.; Fuchs, A.; König, B.: *Synth. Com.* **35**, 3003 (2005).
- [57] Salaš, J. a kol.: *Analytická chemie*. Praha, Avicenum 1987.
- [58] Kalous, V. a kol.: *Metody chemického výzkumu*. Praha, SNTL 1987.
- [59] Anzenbacher, P.; Kovář, J.: *Metody chemického výzkumu pro biochemiky*. Praha, MŠ ČSR 1986.
-

- [60] <<http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/>> [cit. 3.11.2007]
- [61] <<http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/BiotechEnviron/CHROMO/chromgram.html>> [cit. 11.8.2005]
- [62] Pungor, E.: *Laboratory Manual*. Budapest, MTA KESZ 1974.
- [63] Štulík, K.; Pacáková, V.: *High Performance Liquid Chromatography*. Praha, SPN 1990.
- [64] Martin, A. J. P.; Synge, R. L. M.: *Biochem. J.* **35**, 1358 (1941).
- [65] Bidlingmeyer, B. A.: *Preparative Liquid Chromatography*. Amsterdam, Elsevier 1987.
- [66] Soják, L. a kol.: *Separáčné metódy v organickej chémii*. Bratislava, Univerzita Komenského v Bratislavě 1985.
- [67] <<http://www.tut.fi/units/ymp/kem/opintojaksot/KEM-4350/vanhat/L6.pdf>> [cit. 15.3.2005]
- [68] <<http://www.mn-net.com/web%5CMN-WEB-HPLCKatalog.nsf/WebE/GRUNLAGEN>> [cit. 2.9.2007]
- [69] Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 2nd ed., New York, John Wiley & Sons 1979.
- [70] <<http://www.hplc.cz/Tip/silanol.htm>> [cit. 3.5.2008]
- [71] Rudovský, J.; Cígler, P.; Kotek, J.; Hermann, P.; Vojtíšek, P.; Lukeš, I.; Peters, J. A.; Elst, L. V.; Müller, R. N.: *Chem. Eur. J.* **11**, 2373 (2005).
- [72] Desreux, J. F.: *Inorg. Chem.* **19**, 1319 (1980).
- [73] Dadabhoy, A.; Faulkner, S.; Sammes, P. G.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2**, 348 (2002).
- [74] Försterová, M.; Svobodová, I.; Lubal, P.; Táborský, P.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I.: *Dalton Trans.* **5**, 535 (2007).
- [75] Klimešová, V.; Kubicová, L.; Palát, K.; Sova, J.: *Seminární cvičení z obecné a anorganické chemie*. Praha, Karolinum 2000.
- [76] <<http://www.zirchrom.com/images/solvent.gif>> [cit. 20.3.2007]
- [77] Ševčík, J. G. K.: *Zaokrouhlování výsledků v analytické chemii*. Praha, Consultancy 2002.
- [78] Eckschlager, K.: *Chemometrie I., II.* Praha, Reprodukční a knihařské pracoviště PČF UK 1994.

[79] Coufal, P.; Bosáková, Z.; Čabala, R.; Suchánková, J.; Feltl, L.: *Seminář z analytické chemie – teorie, příklady, cvičení*. Praha, Karolinum 2001.

[80] Meyer, V. R.: *Practical High Performance Liquid Chromatography*. 3rd ed. Chichester, John Wiley & Sons 1974.

[81] <http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/Detectors/det_uvab.html> [cit. 23.4.2008]

[82] <http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Analytical_Chromatography/HPLC/Columns.html>
[cit. 19.4.2007]

[83] <http://www.merck-chemicals.com/chemdat/cs_CZ/Merck-CZ-Site/EUR/ViewWelcome-Start> [cit. 22.6.2007]