

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

KLINICKÁ A TOXIKOLOGICKÁ ANALÝZA

**Separace a identifikace derivátů cyklenu
pomocí nanoLC-MS a CZE**

Diplomová práce

Bc. Radka Míková

Praha 2007

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.....*5. 4. 2012*.....

Bc. Radka Míková

Radka Míková
.....
podpis

Práce na tomto projektu byla finančně podporována výzkumným záměrem MSM0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D. za odborné vedení této práce, za cenné rady, připomínky a trpělivost. Katedrám anorganické a organické chemie děkuji za poskytnutí vzorků k analýze. Dále děkuji svým rodičům za všestrannou podporu a zázemí.

Předmětová hesla: analytická chemie, separace, identifikace, nanokapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, kapilární zónová elektroforéza

Klíčová slova: cykleny, hmotnostní spektrum, elektroferogram

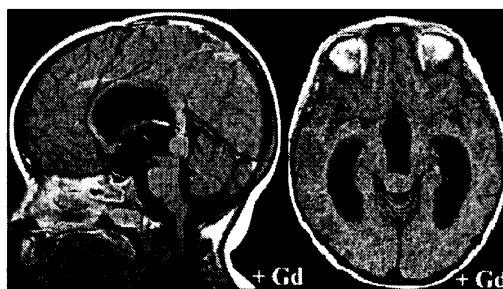
OBSAH

1	ÚVOD	6
1.1	Cykleny	8
1.2	Hmotnostní spektrometrie	10
1.2.1	Ionizace	10
1.2.2	Analyzátory	12
1.2.3	Detektory	13
1.2.4	Hmotnostní spektrum	15
1.2.5	Fragmentace	16
1.2.6	Kapalinová chromatografie na čipu	17
1.3	Kapilární zónová elektroforéza	19
1.3.1	Elektroforetická pohyblivost	20
1.3.2	Elektroosmotický tok	21
1.3.3	Dávkování	23
1.3.4	Detekce	24
1.3.5	Elektroferogram	24
2	CÍL PRÁCE	26
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1	Přístroje	27
3.2	Chemikálie	28
3.3	Příprava vzorků pro analýzu	30
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	31
5	ZÁVĚR	49
6	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	50
7	LITERATURA	52

1 ÚVOD

S rozvojem civilizace stále narůstá výskyt civilizačních chorob. Jednou z nejzákeřnějších jsou například nádorová onemocnění. V dnešní době má ale také medicína širší možnosti prevence a léčby těchto chorob. Podmínkou rozvoje medicíny je ovšem i současný rozvoj vědy v různých oblastech. Je tedy nutné neustále nacházet nové metody syntézy, separace, identifikace a kvantifikace a uvádět do provozu nové přístroje schopné lépe separovat, identifikovat a kvantifikovat dosud známé, ale i nově připravené látky.

V této práci byly pomocí moderních metod a přístrojů studovány cykleny. Cykleny je nepřesné označení používané pro deriváty látky s triviálním názvem cyklen. Jsou to látky, které tvoří komplexy s kationty lanthanoidů a které po koordinaci jedné molekuly vody do první koordinační sféry mohou být použity jako kontrastní látky v zobrazování nukleární magnetickou rezonancí označovanou NMR. V medicíně se tato metoda označuje MRI, tedy Magnetic Resonance Imaging, příklad je na **obrázku 1**.



Obrázek 1 Výsledek vyšetření mozku pomocí MRI s použitím komplexu gadolinia.

Nejnovější technikou použitou během této diplomové práce je bezpochyby nanokapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí. Vysokoučinná kapalinová chromatografie a kapilární kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostním

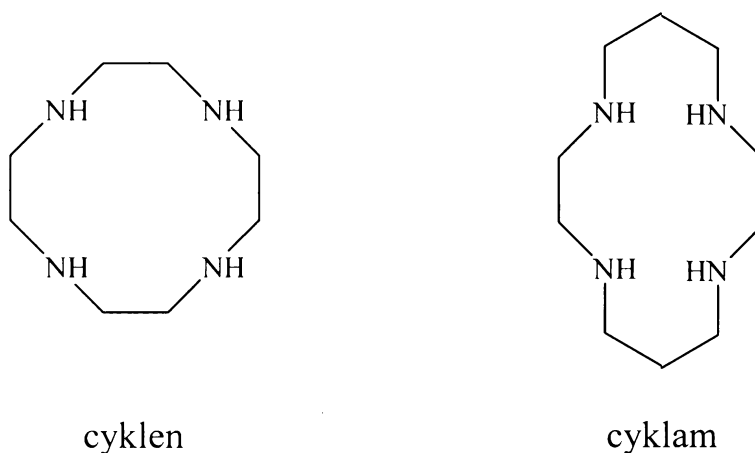
spektrometrem jsou moderní a velmi účinné analytické metody. Dnes je lze realizovat v podobě nanokapalinové chromatografie i na čipu o rozměrech přibližně 130 x 40 x 1 mm, který je předřazený hmotnostnímu spektrometru. Po separaci látek na čipu deteguje hmotnostní spektrometr jednotlivé látky obsažené ve vzorku a zobrazí výsledky pomocí hmotnostních spekter.

Díky těmto novým metodám je možné separovat a identifikovat také cykly a potom s jejich pomocí zobrazovat různé tkáňové útvary v lékařství nebo například čistit vodu od těžkých kovů.

1.1 Cykleny

Cykleny jsou sloučeniny odvozené od 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu, který je substituován na dusíkových atomech.

V počátcích zkoumání polyazamakrocyklů [1] byly studovány hlavně cykleny a cyklamy, tedy dvanácti- a čtrnáctičlenné kruhy na **obrázku 2**.



Obrázek 2 Základní kruh cykленu - 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu, a cyklamu - 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekanu.

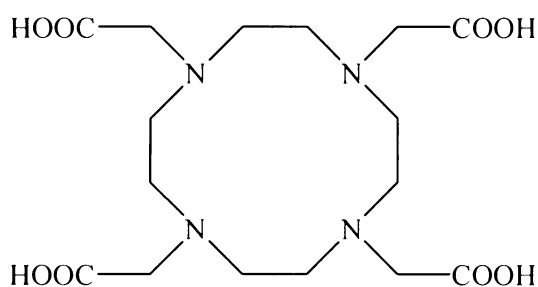
Metody syntézy [2-5] a vlastnosti těchto dvou látek byly zkoumány hlouběji díky jejich širokému využití v různých oborech, například v lékařství [6], v biochemii jako náhrada za enzymy [7], jako katalyzátory [8-13] při peroxidaci, oxidaci, epoxidaci, redukci a inhibici oxidace, dále pro separaci a transport plynů [14], v analytické chemii [15] a pro extrakci kationtů kovů [16].

Polyazamakrocykly selektivně komplexují přechodné a těžké kovy. Tato schopnost se využívá v biomedicíně, hydrometalurgii a při čištění vody [17]. Zvláštní důležitost v tomto směru mají N-substituované tri- a tetraacetátové cykleny. Nejstálejší

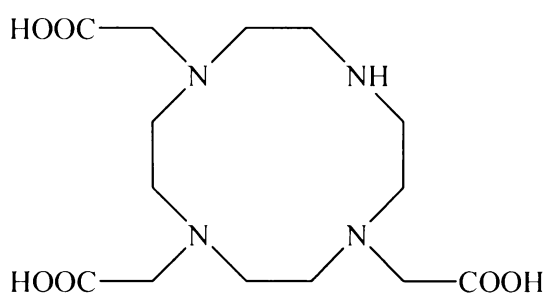
je tetraacetátový komplex gadolinia [18], který se používá jako kontrastní látka při nukleární magnetické rezonanci v medicíně. Později se začal k tomuto účelu používat triacetátový komplex gadolinia, který nemá tolik vedlejších účinků, neboť je neutrální. Různé komplexy cyklenů se s úspěchem používají také při nádorové radioterapii.

Pro využití cyklenů je nejdůležitější jejich struktura. Faktory ovlivňující fyzikálně-chemické vlastnosti cyklenů nejsou dosud zcela jasné. Zejména jsou studovány elektrické a prostorové parametry. Stereochemii tetraazamakrocyclů ovlivňuje hlavně velikost kruhu, stupeň substituce na dusíkových atomech, elektrické a prostorové vlastnosti těchto substituentů, koordinační číslo kationtu kovu, poměr kovu a ligandu, sůl použita pro komplexaci a pH reakce [19].

Esterové cykleny studované v této práci jsou prekurzory kyselých cyklenů, které se používají k výše zmíněným účelům. Některé významné kyselé cykleny jsou na **obrázku 3**.



H₄DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina)



H₃DO3A (1,4,7,10-tetraazacyclododekan-1,4,7-trioctová kyselina)

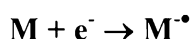
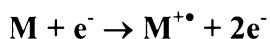
Obrázek 3 Kyselé cykleny používané hlavně při MRI jako kontrastní látka.

1.2 Hmotnostní spektrometrie

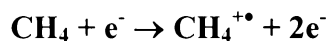
Hmotnostní spektrometrie [20] je fyzikálně chemická metoda pro určování hmotnosti atomů, molekul a jejich částí s nábojem, tedy iontů. V analytické chemii se tato metoda používá hlavně při stopové analýze organických látek k určení jejich struktury. Neutrální atomy a molekuly musí být nejprve ionizovány, protože k jejich rozdělení a detekci dochází na základě různých poměrů hmotnosti a náboje (m/z). Toto rozdělení probíhá v analyzátoru. Poté jsou ionty se stejným m/z měřeny v detektoru.

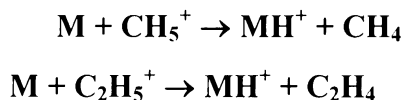
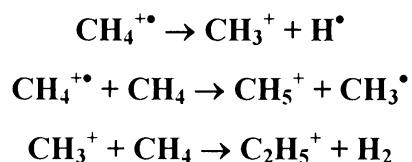
1.2.1 Ionizace

Hmotnost analyzovaných látek je možné určit až po jejich ionizaci. Ta se provádí různými způsoby. Obecně dělíme ionizaci na měkkou a tvrdou podle dodané energie. Mezi tvrdé ionizační techniky patří například ionizace nárazem elektronů. Ionty vznikají interakcí analyzované látky s proudem urychlených elektronů. Probíhající děje jsou popsány následujícími rovnicemi:



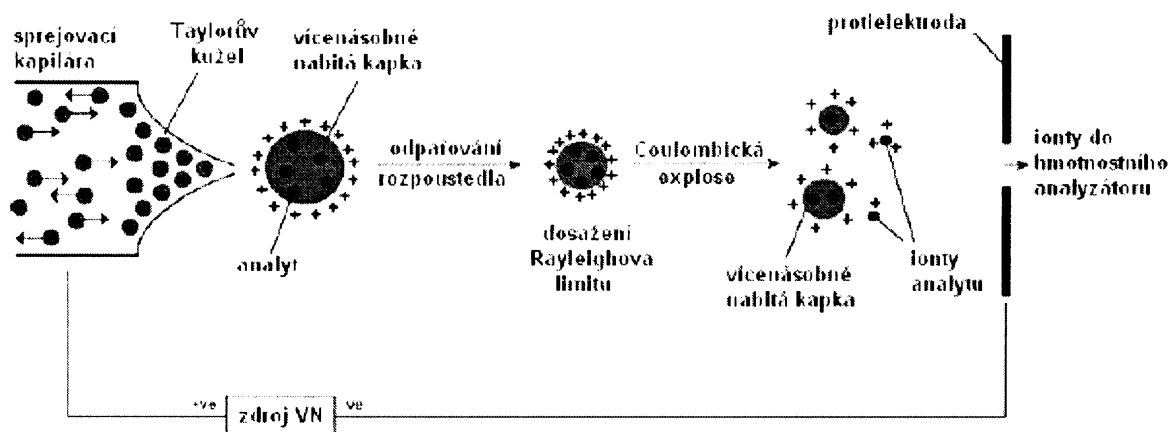
Díky vakuu udržovanému v iontovém zdroji se snižuje pravděpodobnost mezičásticových interakcí, takže převládá vznik radikalkationtů. Příkladem měkké ionizační techniky je chemická ionizace. Zdrojem ionizační energie jsou také urychlené elektrony, ale ionizaci zprostředkovává reakční medium. Vyšší tlak v iontovém zdroji výrazně zvyšuje pravděpodobnost mezičásticových interakcí. Jako reakční medium se nejčastěji používá methan. Při ionizaci probíhají následující reakce:





Princip sprejové ionizace spočívá v rychlém odsušení mikrokapeček spreje při převodu iontů z kapalně fáze do vakua. Patří mezi měkké ionizace. Při použití elektrospreje dochází k rozprášení kapalně fáze vlivem nehomogenního elektrického pole. Vznikající mikrokapečky mají vysokou povrchovou hustotu náboje. Horkým inertním plynem, většinou dusíkem, jsou tyto kapečky rychle vysušeny, čímž dojde k iontovému vypařování a vzniku iontů.

Tento způsob ionizace se často uplatňuje při spojení hmotnostního spektrometru s kapalinovou chromatografií. Princip elektrospreje popisuje **obrázek 4**. U metody termospreje vznikají mikrokapečky díky vysoké teplotě vstupní kapiláry. Kapečky mají vysokou hustotu náboje a jejich odpařením vzniknou ionty.



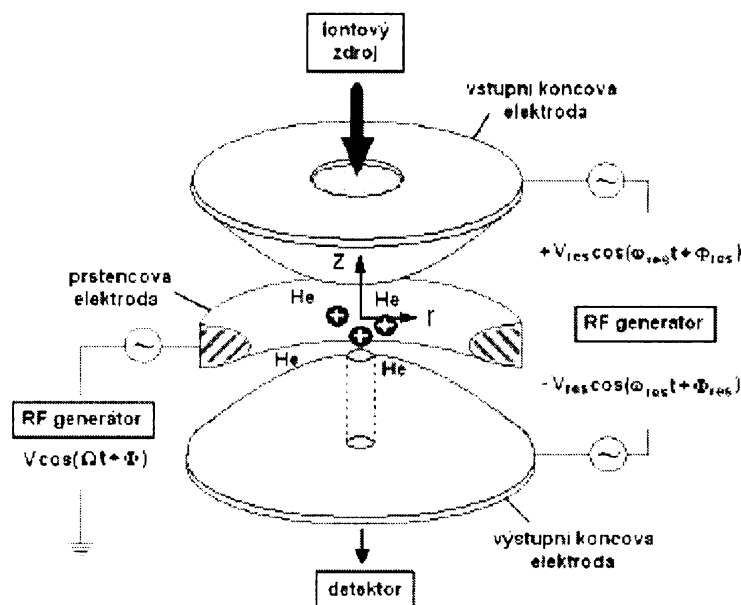
Obrázek 4 Princip ionizace elektrosprejem.

Dalšími ionizačními technikami jsou ionizace elektrickým polem, desorpce polem, ionizace ostřelováním vzorku rychlými atomy, ionizace rychlými ionty, plazmová desorpce a desorpční fotoionizace.

1.2.2 Analyzátoary

Ionty vzniklé ionizací analyzované látky musí být před detekcí rozděleny podle poměru hmotnosti ku náboji m/z , nebo podle kinetické energie. Toto rozdělení se provádí v analyzátoru. Jsou různé druhy analyzátorů, které se liší například hmotnostním rozsahem nebo dosažitelným rozlišením.

Magnetický hmotnostní analyzátor je elektromagnet, mezi jehož pólovými nástavci procházejí ionty. Ty se dělí na základě různých m/z , neboť v homogenním magnetickém poli ionty rozdílných m/z opisují dráhy o různých poloměrech. Kvadrupólový analyzátor dělí ionty také podle m/z . Je tvořen čtyřmi tyčemi kruhového nebo hyperbolického průřezu, které jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a vysokofrekvenčního napětí. Mezi tyčemi prolétávají ionty, které vlivem střídavého elektrického pole začnou oscilovat. Při určitém poměru stejnosměrné a střídavé složky napětí a dané hodnotě těchto napětí projdou pouze ionty o určitém m/z , ostatní jsou zachyceny tyčemi. Iontová past umožňuje uzavřít ionty o různých m/z do ohraničeného prostoru. Je tvořena dvěma uzemněnými kruhovými elektrodami, mezi nimiž je prstencová elektroda s vysokofrekvenčním napětím s proměnnou amplitudou. Ionty se v pasti pohybují po uzavřených kruhových drahách při malé amplitudě střídavého napětí. Při zvyšování amplitudy jsou ionty postupně s rostoucím m/z vypuzeny z pasti do detektoru. Iontová past je schématicky znázorněna na **obrázku 5**. Nejjednodušším hmotnostním analyzátoarem je analyzátor průletový. Rozděluje ionty o různých m/z podle doby letu evakuovanou trubicí. Dráha iontů je prodloužena reflektorem, elektrostatickým zrcadlem zdvojnásobujícím průletovou dráhu. Reflektrom tedy zvyšuje dosažitelné rozlišení analyzátoaru.



Obrázek 5 Schématické znázornění iontové pasti.

V elektrickém analyzátoru se ionty dělí podle kinetické energie. Mezi dvěma sférickými deskovými elektrodami, které jsou připojeny ke zdroji vysokého napětí, procházejí ionty. V homogenním elektrickém poli se dráha iontu zakřivuje. Poloměr dráhy iontu je dán jeho kinetickou energií a intenzitou elektrického pole.

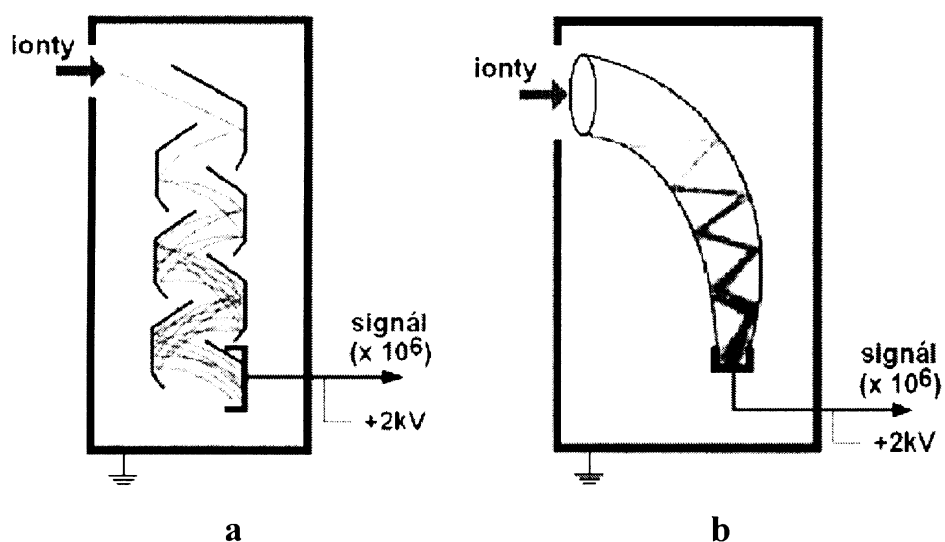
1.2.3 Detektory

Obecně rozlišujeme dvě kategorie detektorů. Detektory pro přímá měření, které měří elektrický proud vznikající dopadem iontů, se používají pro určení izotopického zastoupení prvků většinou ve specializovaných laboratořích. Násobičové detektory, které mohou změřit signál i jediného iontu, se používají standardně, a to buď elektronásobiče nebo fotonásobiče.

Elektronásobičové detektory s diskretním dynodovým polem sestávají z kovových destiček elektricky propojených. Ion, který dopadne na první dynodu, z ní

vyrazí elektrony, které se dopadem na další dynodu násobí. Pod vysokým napětím jsou elektrony urychlovány od jedné dynody k další, až jsou zachyceny kolektorem. Hodnota zesílení signálu je $10^7 - 10^8$.

Dalším typem jsou elektronásobičové detektory s kontinuální dynodou. Jsou tvořeny zakřivenou trubicí z olovnatého skla s vysokým odporem, která je na vnitřní straně pokryta oxidem berylnatým nebo hlinitým. Na začátek a na konec trubice je vloženo vysoké napětí. Tentokrát jsou elektrony vyraženy dopadajícími ionty z povrchu trubice a elektrickým polem jsou urychlovány ke kolektoru. Počet elektronů se násobí opakovanými nárazy na stěnu trubice. Oba typy elektronásobičových detektorů jsou na obrázku 6.



Obrázek 6 Elektronásobičový detektor s diskretním dynodovým polem (a) a s kontinuální dynodou (b).

Při detekci scintilačním fotonásobičovým detektorem jsou ionty nejprve směřovány na elektrodu pod vysokým napětím a z ní vyražené elektrony dopadají na

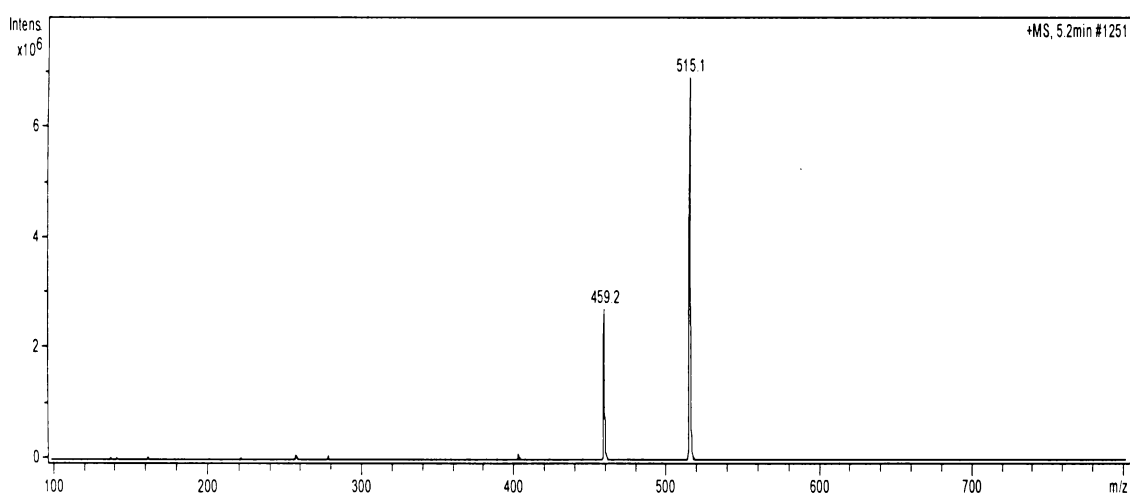
scintilační stínítko, kde jsou konvertovány na fotony, které se měří fotonásobičem. Tato metoda je sice složitější, ale má vyšší citlivost a delší životnost.

1.2.4 Hmotnostní spektrum

První, co vždy hledáme v hmotnostním spektru, je molekulární iont. Ten musí vždy splňovat tyto podmínky:

1. Iont s nejvyšší hmotností ve spektru
2. Iont s nepárovým elektronem
3. Korespondence s ostatními ionty ve spektru
4. Svým relativním zastoupením musí odpovídat postulované struktře

Příklad hmotnostního spektra je na **obrázku 7**.



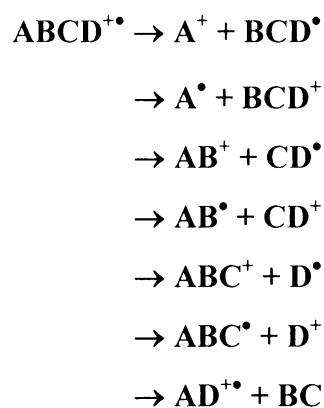
Obrázek 7 Hmotnostní spektrum s píkem molekulárního iontu tris(*terc.*-butylesteru) 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctové kyseliny ($m/z = 515,1$) a jeho fragmentu ($m/z = 459,2$).

Pokud je znám alespoň sumární vzorec, je možné určit počet cyklů c a dvojných vazeb dv pomocí následujícího vzorce (1), kde x je počet atomů uhlíku, y počet atomů vodíku a z počet atomů dusíku:

$$c + dv = x - \frac{1}{2}y + \frac{1}{2}z + 1 \quad (1)$$

1.2.5 Fragmentace

Díky ionizaci je molekula analyzované látky rozštěpena na různě velké části. Velikost těchto fragmentů závisí na velikosti ionizační energie a na energii, kterou má molekula ještě před vlastní ionizací. Při vzniku molekulárního iontu se odštěpí elektron s nejnižší ionizační energií. Označíme-li tento molekulární iont $ABCD^{+\bullet}$, pak můžeme fragmentaci popsat následujícím schématem:

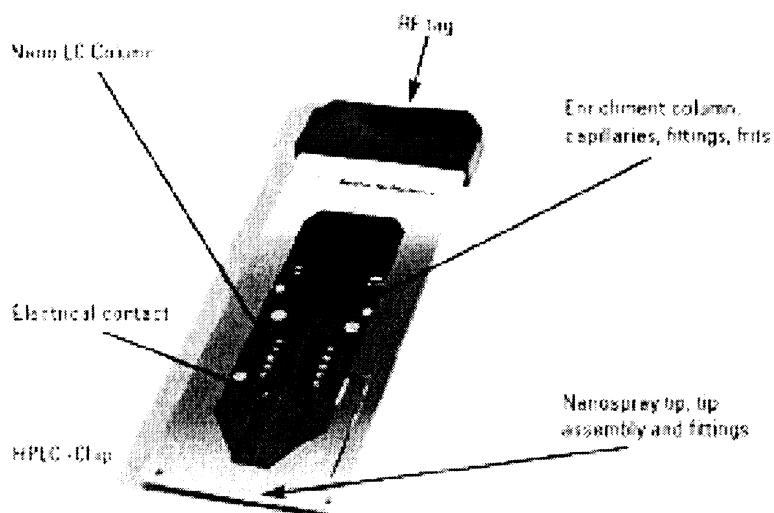


Fragmentací se většinou rozštěpí pouze jedna vazba. Pokud se při ní atomy přeskupí, zaniká vazeb více. Štěpením radikálkationtu vzniká radikál a kationt. Radikálem je většinou fragment s vyšší ionizační energií. O tom, jakou relativní intenzitu bude mít pík iontu v hmotnostním spektru, rozhoduje stabilita vzniklého iontu. Fragmenty se mohou dále rozpadat, pokud mají přebytek vnitřní energie. Většinou odštěpují neutrální molekulu. Pokud se při prvním stupni fragmentace odštěpil radikál,

je velmi malá pravděpodobnost, že se při druhém stupni odštěpí další radikál. Mnohem pravděpodobnější je ztráta neutrální molekuly. Pokud se v prvním stupni fragmentace odštěpí neutrální molekula, může se dále odštěpit radikál, ale pouze jednou, v dalších stupních se odštěpí neutrální molekuly.

1.2.6 Kapalinová chromatografie na čipu

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) byla miniaturizována na čip o rozměrech přibližně 130 x 40 x 1 mm. Na čipu s nanofluidním systémem je umístěna kolonka pro prekoncentraci vzorku, separační kolonka a sprejer pro nano-elektrosprejovou ionizaci, jak ukazuje **obrázek 8**. Tato inovace umožňuje snazší měření, vícenásobné použití, zmenšuje nároky na množství vzorku a činidel, zkracuje dobu analýzy a relativně analýzu zlevňuje.

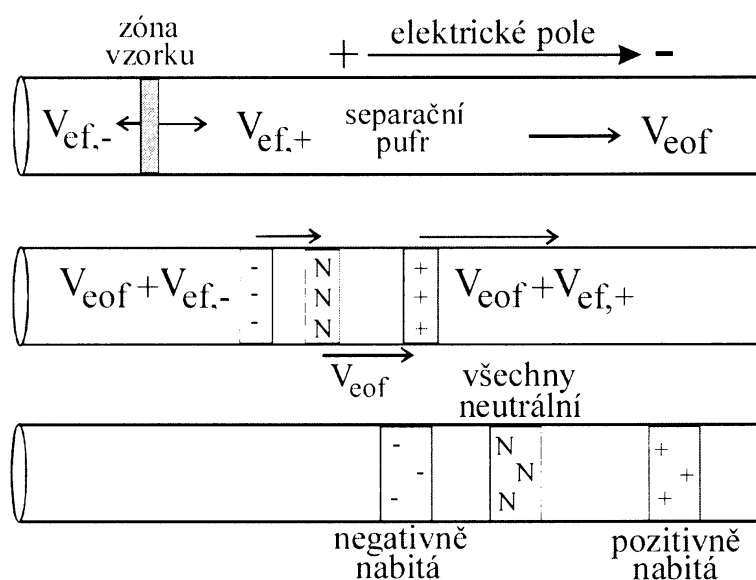


Obrázek 8 Čip pro kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí [22].

Dalšími výhodami čipové kapalinové chromatografie jsou spolehlivost, robustnost a vysoké pokrytí aminokyselinové sekvence proteinů, jelikož se tato metoda používá hlavně pro identifikaci peptidů a proteinů v proteomice [21]. Identifikace bílkovin je poněkud složitější než například určování struktury cyklenů. Bílkovina je nejprve specificky štěpena trypsinem na peptidy. Peptidy jsou poté separovány na LC – čipu a hmotnostní spektrometr deteguje sekvenci aminokyselin peptidu. Aby bylo možné přesně určit tuto sekvenci, měří se tandemové MS, kdy je vybrán určitý iont, který je znovu fragmentován a detegován. Tato technika vyžaduje použití iontové pasti jako analyzátoru. Dále pro identifikaci proteinu stačí určit relativně nízký počet peptidů (např. tři peptidy) a výsledek porovnat s databází, podle níž lze bílkovinu s jistotou identifikovat.

1.3 Kapilární zónová elektroforéza

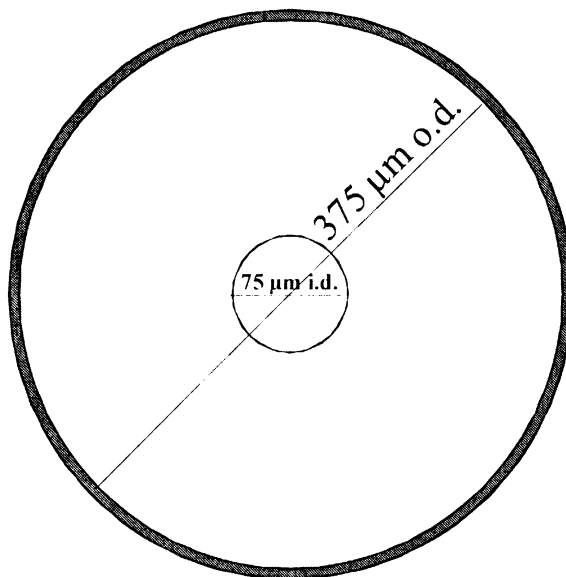
Tato metoda [23-31] je vhodná pro separaci a stanovení anorganických a organických látek. Analyzované látky musí být ve formě iontů, protože neutrální látky nelze touto metodou separovat. Ionty vznikají disociací nebo, v případě některých kationtů, protonizací. V kapiláře se dělí na základě rozdílných elektroforetických pohyblivostí, mobilit. Ionty jsou unášeny elektroosmotickým tokem pufru a zároveň jsou přitahovány ke katodě nebo k anodě, podle toho, jaký nesou náboj. Dále se ionty v kapiláře dělí podle jejich molekulové hmotnosti a tvaru. Neutrální látky se pohybují elektroosmotickým tokem. Tyto děje jsou popsány **obrázkem 9**.



Obrázek 9 Separace kationtů, neutrálních látek a aniontů v kapilární zónové elektroforéze během jednoho experimentu.

Ionty se separují v kapiláře z taveného křemene, která je na vnější straně pokryta žlutohnědým polyimidem. Tato vnější vrstva mnohonásobně zvyšuje pružnost kapiláry

a tím její odolnost při manipulaci s ní. Vnější průměr kapiláry je standardně 375 μm a vnitřní průměr je 25, 50, 75 nebo 100 μm . Na **obrázku 10** je průřez kapilárou.



Obrázek 10 Průřez křemennou kapilárou s polyimidovou vrstvou.

1.3.1 Elektroforetická pohyblivost

Jedním z dějů umožňujících dělení iontů v kapiláře je elektroforetická migrace vycházející z jejich elektroforetické pohyblivosti. Ionty migrují v elektrickém poli k opačně nabitě elektrodě. Jejich pohyb je tím rychlejší, čím větší je jejich náboj a čím jsou ionty menší. Tento vztah je vyjádřen rovnicí (2):

$$\mu_{ef} = \frac{Q}{6\pi\eta r}, \quad (2)$$

kde μ_{ef} je elektroforetická pohyblivost v cm^2/Vs , Q celkový náboj částice v C, η dynamická viskozita okolního prostředí v kg/ms a r poloměr částice v jednotkách m. Elektroforetická pohyblivost látek může být vztažena na prostředí a teplotu. Elektroforetická pohyblivost iontů silných elektrolytů vztažená k dané iontové síle a teplotě je aktuální pohyblivost. Limitní pohyblivost je pohyblivost iontů při nekonečném zředění. Pohyblivost slabých elektrolytů je dána jejich disociací a závisí tedy na pH prostředí. Když je tato pohyblivost vztažena k pH, iontové síle a teplotě separačního prostředí, nazývá se efektivní pohyblivost.

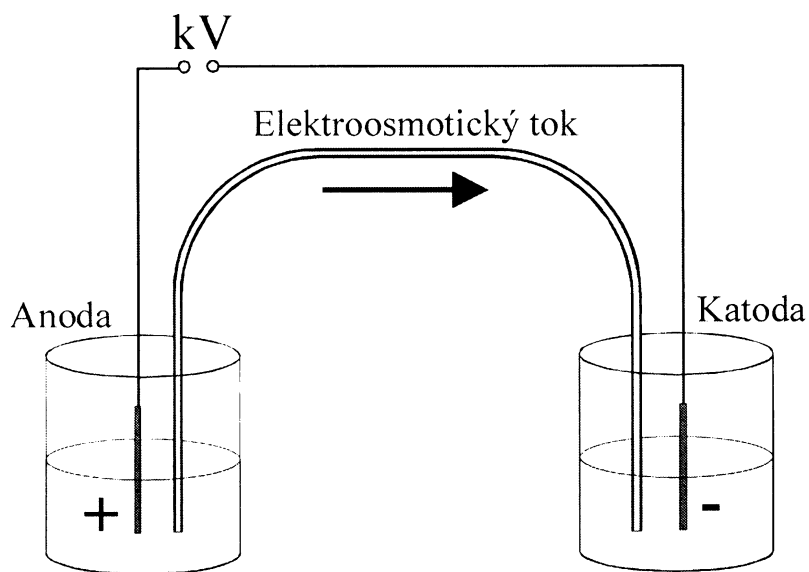
1.3.2 Elektroosmotický tok

Po vložení napětí mezi elektrody na koncích kapiláry dochází k pohybu kapaliny od anody k uzemněné katodě. Je to další děj, který ovlivňuje separaci iontů v kapilární zónové elektroforéze, a nazývá se elektroosmotický tok. Jeho vznik je znázorněn na **obrázku 11**. Hodnoty napětí vkládané mezi elektrody bývají poměrně vysoké, řádově desítky kV. Když je křemenná kapilára naplněna pufrem, jsou siloxanové skupiny na jejím vnitřním povrchu hydrolyzovány na silanolové, které jsou následně disociovány. Vnitřní povrch kapiláry je tedy pokryt záporným nábojem, který se následně pokrývá kladnými protony. Díky vloženému napětí se tyto protony po celé délce kapiláry neustále pohybují směrem ke katodě a strhávají s sebou celý obsah kapiláry. Průchodem elektrického proudu se kapilára zahřívá. Čím větší je průměr kapiláry a čím vodivější je separační pufr, tím více tepla vzniká. Aby byla zachována relativně stálá teplota kapiláry, je prostředí kolem kapiláry chlazeno proudem vzduchu.

Lineární rychlost elektroosmotického toku je přímo úměrná intenzitě elektrického pole a elektroosmotické pohyblivosti podle vztahu (3):

$$v_{eof} = \mu_{eof} \cdot E \quad , \quad (3)$$

kde v_{eof} je rychlost elektroosmotického toku v cm/s, μ_{eof} elektroosmotická pohyblivost v cm^2/Vs a E je intenzita elektrického pole ve V/m. Lineární rychlost závisí také na hodnotě pH. Čím vyšší je pH, tím větší je negativní náboj na stěně kapiláry a tím větší je rychlost elektroosmotického toku. Dále je ovlivněn koncentrací pufru. S rostoucí koncentrací pufru se snižuje rychlost elektroosmotického toku.



Obrázek 11 Schéma elektroosmotického toku.

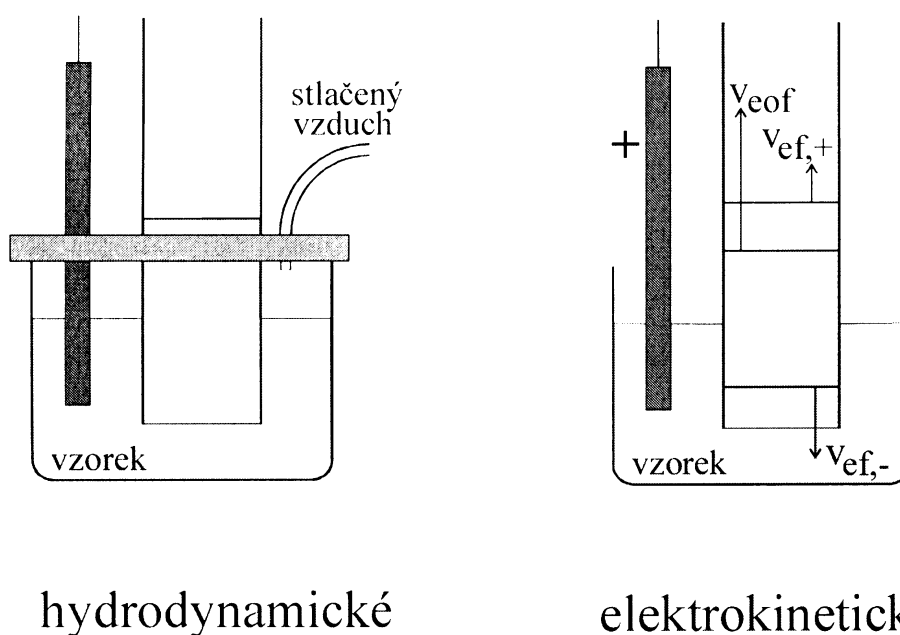
Ke zjištění rychlosti elektroosmotického toku se k dávkovanému vzorku přidává neutrální značkovač, který umožní výpočet rychlosti, nebo je možné použít stacionární injekční zónu, tzv. vodní zónu. Rychlost elektroosmotického toku v_{eof} je možné vypočítat podle vztahu (4):

$$v_{eof} = \frac{L_c \cdot L_d}{U} \cdot \frac{1}{t_{eof}}, \quad (4)$$

kde L_c je celková délka kapiláry v cm, L_d délka kapiláry k detektoru také v cm, U napětí vložené mezi elektrody v jednotkách V a t_{eof} migrační čas neutrálního značkovače v min.

1.3.3 Dávkování

Vzorek je možné dávkovat dvěma způsoby lišícími se druhem spádu. Při dávkování elektrokinetickém se vytvoří spád díky vložení napětí na elektrody. Nevýhodou tohoto způsobu dávkování je odlišné složení vzorku v kapiláře a v nádobce, neboť jsou nasáty spíše kationty, které jsou přitahovány katodou. Při hydrodynamickém dávkování se využívá přtlaku. Ten se vytvoří díky stlačenému vzduchu vháněnému do uzavřené nádoby se vzorkem, do kterého je ponořena kapilára.



Obrázek 12 Typy dávkování vzorku v kapilární zónové elektroforéze. Hydrodynamické dávkování umožňuje nadávkovat reprezentativní vzorek, elektrokinetické dávkování upřednostňuje kationty a znevýhodňuje anionty.

Složení vzorku je tentokrát stejné v kapiláře i v nádobce, ale na rozdíl od elektrokinetického dávkování je profil přední hrany vzorku parabolický. Oba typy dávkování jsou znázorněny na **obrázku 12**.

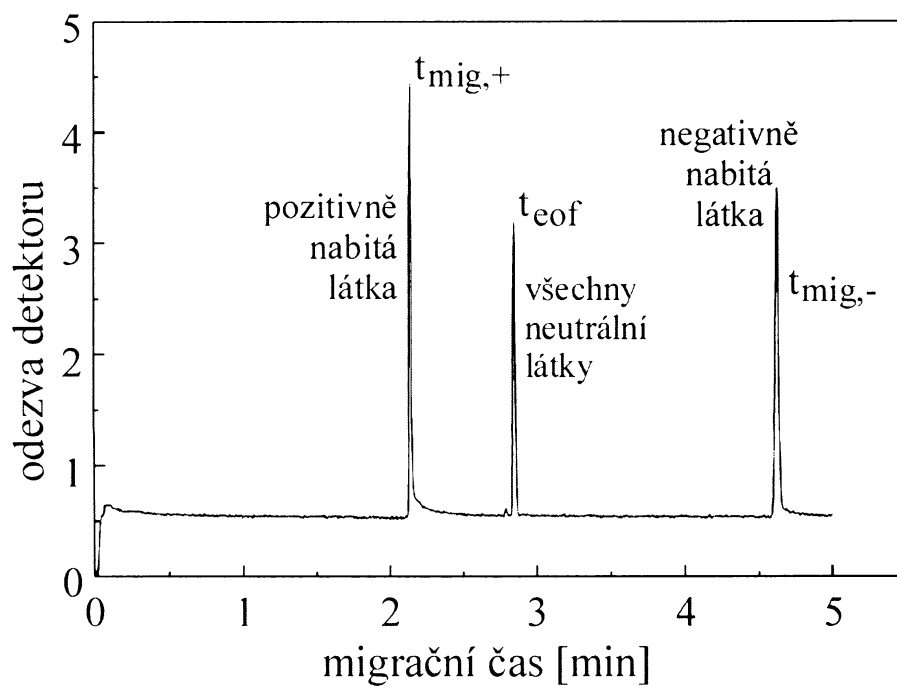
1.3.4 Detekce

K detekci látek se v kapilární zónové elektroforéze nejčastěji používá absorpční fotometrický detektor, který pracuje v ultrafialové a viditelné oblasti spektra. Detektor je umístěn blízko konce kapiláry na „okénku“, to je místo na kapiláře zbavené polyimidu. Polyimid velmi špatně propouští UV i VIS záření, proto je před použitím kapiláry na několikamilimetrovém úseku opálen a smyt. V tomto místě pak paprsky o dané vlnové délce procházejí roztokem v kapiláře a detektor měří absorbanci roztoku uvnitř kapiláry.

K detekci zón je použitelný také vodivostní detektor, který měří elektrickou vodivost procházejících zón. Výhodou této detekční metody je její univerzálnost.

1.3.5 Elektroferogram

Záznam analýzy na kapilární zónové elektroforéze se nazývá elektroferogram. Počet píků v elektroferogramu odpovídá počtu separovaných zón ve vzorku. Na svislé ose je vynesena absorbance a na vodorovné je možné odečítat migrační časy jednotlivých zón. Příklad elektroferogramu je na **obrázku 13**.



Obrázek 13 Elektroferogram kationtů, neutrálních látek a aniontů separovaných kapilární zónovou elektroforézou. Píky všech kationtů se nacházejí před píkem všech neutrálních látek a píky všech aniontů migrují až za píkem všech neutrálních látek.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je separovat cykleny pomocí nanokapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí a identifikovat je v hmotnostních spektrech, dále pak získané výsledky porovnat s experimentálními výsledky kapilární zónové elektroforézy.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje

Pevné cykleny pro přípravu vzorků byly odvažovány na analytických vahách Precisa 262 SMA-FR (Precisa Instrument AG – Dietikon, Švýcarsko). Rozpuštěné vzorky cyklenů byly před analýzou na kapilární zónové elektroforéze sonifikovány po dobu 8 min na ultrazvukové lázni ULTRASONIC LC 30 H (Elma, Pforzheim, Německo).

Kapilární zónová elektroforéza byla prováděna na přístroji PrinCE 250 autosampler (PrinCE Technologies B.V., Emmen, Nizozemí) a detekce pomocí UV/VIS spektrofotometrického detektoru Spektra 100 (Therma Separation Products, Texas, USA), který byl nastaven na vlnovou délku 200 nm. Vzorky byly analyzovány v nemodifikované kapiláře firmy CACO s.r.o. (Bratislava, Slovenská republika) o parametrech: vnitřní průměr $d_i = 75 \mu\text{m}$, vnější průměr $d_o = 380 \mu\text{m}$, délka kapiláry k detekčnímu okénku $L_d = 65,0 \text{ cm}$ a celková délka kapiláry $L_c = 79,1 \text{ cm}$. Pro sběr a vyhodnocení dat byly použity programy CSW32 v.1.4.11.66 Chromatography Station for Windows (DataApex Ltd., Praha, ČR) a Origin 6.1 v6.1052 (B232) (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

Přístroj pro hmotnostní spektrometrii byl od firmy Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo), typ XCT – Ion Trap a HPLC sestava Agilent 1100 Series. Byly používány dva typy HPLC čipu: se stacionární fází Zorbax 300SB - C18 a s grafitizovaným uhlíkem. Velikost částic u obou typů je $5 \mu\text{m}$. Na čipu jsou dvě kolony, analytická a prekoncentrační, analytická o délce 43 mm a průměru $75 \mu\text{m}$, prekoncentrační o délce 4 mm a s průtokem $4 \mu\text{l/min}$. Pro zpracování a vyhodnocení dat byl použit software Agilent 1100 Series LC/MSD Trap. HPLC systém má dvě pumpy, kapilární pumpu s průtokem $4 \mu\text{l/min}$, která žene vodu s přísávkem kyseliny mravenčí do prekoncentrační kolony, a nanopumpu s menším průtokem $0,3 \mu\text{l/min}$, která pumpuje směs vody a acetonitrilu (obojí s přísávkem kyseliny mravenčí) přes prekoncentrační kolonku do analytické kolony. U hmotnostního spektrometru pro

ionizaci byl použit nanosprej, jako analyzátor iontová past a pro detekci elektronásobič s konverzní dynodou. Při elektrosprejování byl hrot čipu pod napětím -1900 až -2000 V, sušící plyn měl průtok 4 l/min, sušící teplota byla 230 °C. Maximální doba akumulace iontů v iontové pasti byla 50 ms. Skenovací oblast byla nastavena na 100 – 800 m/z. U nanokapalinové chromatografie byly používány dva gradienty, dlouhý a krátký. Gradienty obou metod byly následující:

1) Dlouhý gradient

0 min	3% CH ₃ CN
20 min	55% CH ₃ CN
25 min	80% CH ₃ CN
28 min	80% CH ₃ CN
30 min	3% CH ₃ CN
40 min	3% CH ₃ CN

2) Krátký gradient

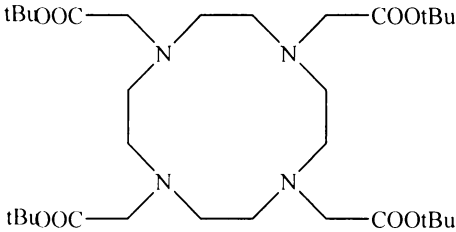
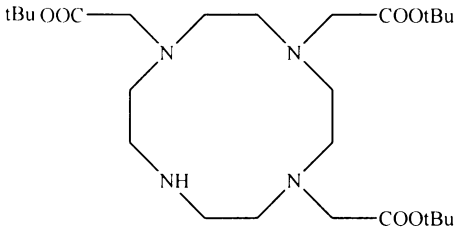
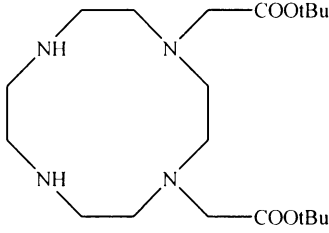
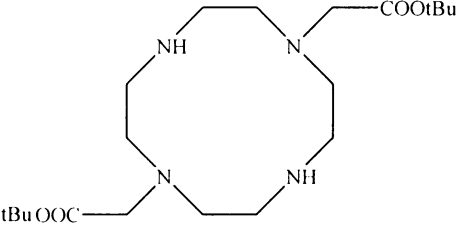
0 min	2% CH ₃ CN
0,75 min	2% CH ₃ CN
6,75 min	80% CH ₃ CN
6,76 min	2% CH ₃ CN

3.2 Chemikálie

Studované cykлены a jejich relativní molekulové hmotnosti jsou uvedeny v **tabulce 1**. Tyto cykлены byly syntetizovány na katedrách anorganické a organické chemie.

Methanol (čistoty pro kapalinovou chromatografii), kyselina mravenčí (p.a.) a acetonitril (čistoty pro gradientovou eluci) byly od firmy MERCK (Darmstadt, Německo). Octan amonný (p.a.) byl dodán firmou Penta (Praha, ČR) a thiomčovina (p.a.) byla od firmy Lachema (Brno, ČR).

Tabulka 1 Vzorce analyzovaných cyklenů tris(*trec.*-butylester) 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctové kyseliny (tBu₃DO3A), tetrakis(*trec.*-butylester) 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctové kyseliny (tBu₄DOTA), bis(*trec.*-butylester) 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4-dioctové kyseliny („cis”) a bis(t-butylester) 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,7-dioctové kyseliny („trans”) (tBu₂DO2A) a jejich relativní molekulové hmotnosti.

tBu ₄ DOTA		Mr = 628,8
tBu ₃ DO3A		Mr = 514,7
tBu ₂ DO2A (cis)		Mr = 400,6
tBu ₂ DO2A (trans)		Mr = 400,6

Handwritten signature

3.3 Příprava vzorků pro analýzu

Vzorky pro nanoLC-MS byly ředěny na koncentraci přibližně 2 mmol/l. Nejprve byl pevný vzorek rozpuštěn v 80% methanolu a poté ředěn v poměru 1 : 1000 destilovanou vodou s přidavkem kyseliny mravenčí, jejíž hmotnostní zlomek byl 0,1%. Při měření na nanoLC-MS byl jako mobilní fáze použit acetonitril ve směsi s destilovanou vodou. Obě složky mobilní fáze obsahovaly přidavek kyseliny mravenčí (0,1 %). Směs vody s acetonitrilem byla v různém poměru, neboť šlo o gradientovou eluci.

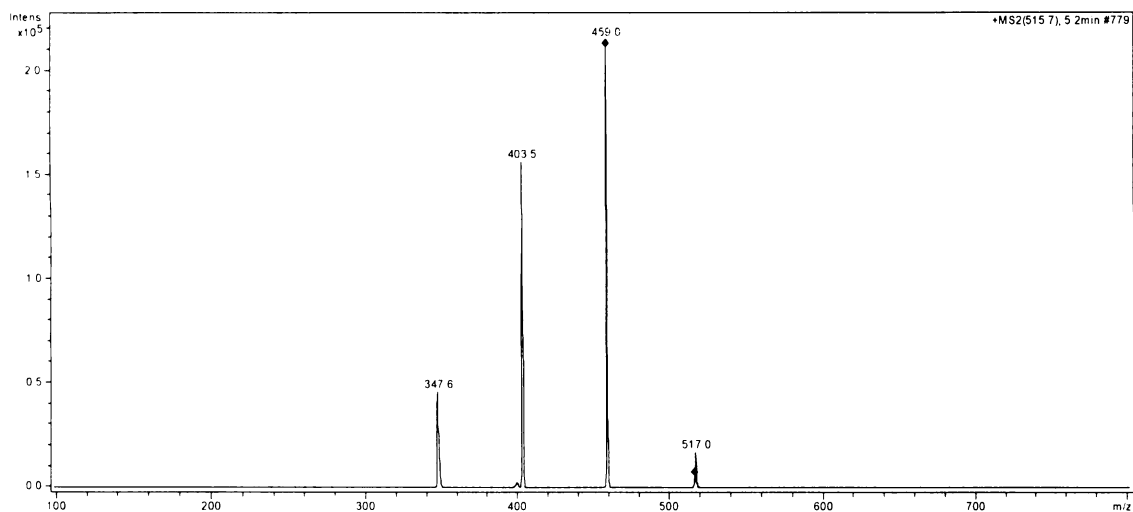
Pro CZE byly vzorky rozpuštěny v 80% methanolu na koncentraci 2 mmol/l, stejně jako pro nanoLC – MS, a dále již ředěny nebyly. Jako separační pufr byl v CZE použit 20mM octan amonný v methanolu o pH = 7,0. Značkovačem elektroosmotického toku byla thiomočovina rozpuštěná v separačním puffru.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

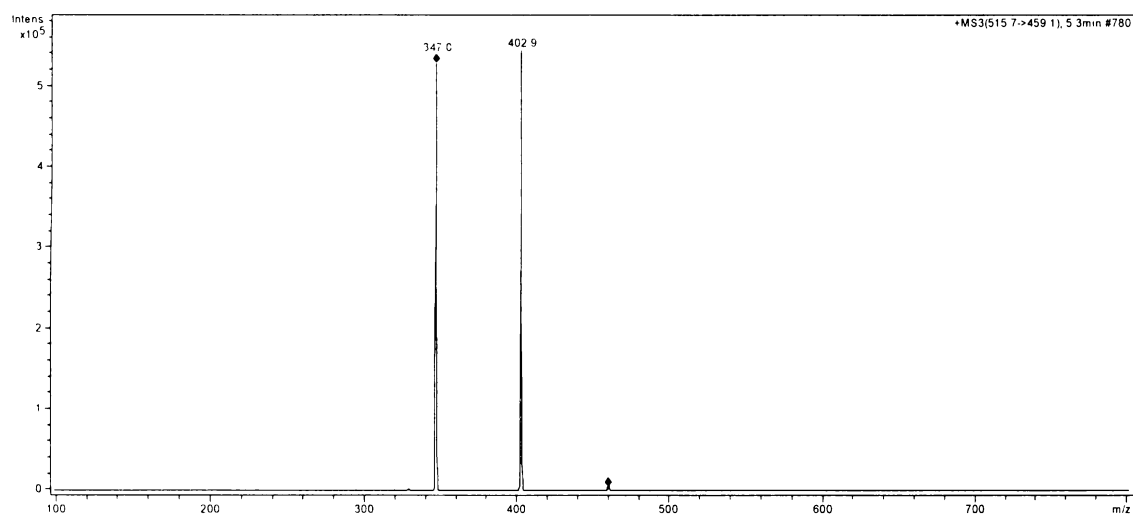
Během této práce bylo analyzováno deset různých vzorků. Byly separovány na dvou různých stacionárních fázích a měřeny dvěma metodami. Cykleny byly syntetizovány na katedrách anorganické a organické chemie PřF UK v Praze. Nejprve byly analyzovány vzorky tris(*tec.*-butylester) 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctové kyseliny (tBu_3DO3A), tetrakis(*tec.*-butylester) 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctové kyseliny (tBu_4DOTA) a bis(*tec.*-butylester) 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4-dioctové kyseliny („cis“) nebo bis(*t.*-butylester) 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,7-dioctové kyseliny („trans“) (tBu_2DO2A), u nichž byla zkoumána zejména jejich čistota. Dále to byly vzorky cyklenů označené jako vzorek V1 a vzorek V2, které mohou obsahovat směsi cyklenů. U těchto dvou vzorků byl předpoklad, že obsahují tBu_2DO2A a tBu_3DO3A . Zbývajících pět vzorků bylo označeno písmeny A, B, C, D a E a jednalo se o neznámé směsi cyklenů.

Pro identifikaci látky z hmotnostního spektra je potřeba nejprve spočítat relativní molekulovou hmotnost analytu, který ve vzorku předpokládáme. Porovnáním této hmotnosti s hodnotami m/z v hmotnostním spektru je možné najít molekulární iont. Z něj se pak vychází při další identifikaci. U většiny molekul lze odhadnout, která část se odštěpí při ionizaci, poté stačí jen spočítat relativní molekulovou hmotnost zbylého fragmentu a opět porovnat se spektrem. U látek neznámých lze použít metodu tandemové hmotnostní spektrometrie, tedy proměření MS^n spekter. Ta spočívá v proměření vybraného iontu z hmotnostního spektra MS^n technikou. Tento postup lze opakovat několikrát. Z dalších fragmentů již může být snazší určit neznámou látku. Pokud se to nepodaří, je nutné najít standard pro tuto látku, nebo spektrum porovnat s databází spekter. Standard je potřebný také v případě, kdy není známo, zda je molekula v konformaci cis nebo trans.

Příklad tandemové hmotnostní spektrometrie je na následujících obrázcích. MS^n spektra byla proměřena u tBu_3DO3A . Na **obrázku 14** je spektrum molekulárního iontu tBu_3DO3A ($m/z = 517,0$), v němž jsou vidět postupné ztráty *terc.*-butylových skupin ($\Delta m/z = 56,0$).



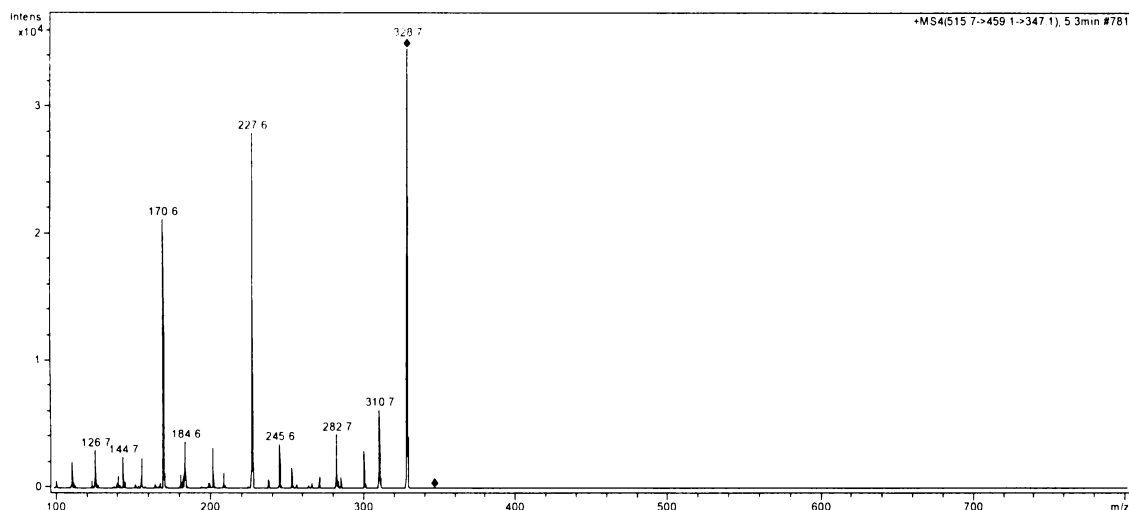
Obrázek 14 Hmotnostní spektrum molekulárního iontu $m/z = 515,7$. Tři sestupné píky jsou určeny postupnými ztrátami tří *terc.*-butylových skupin ($m/z = 56,0$).



Obrázek 15 Hmotnostní spektrum fragmentovaného iontu $m/z = 459,1$. Dva píky ve spektru značí ztráty zbylých dvou *terc.*-butylů ($m/z = 56,0$).

Na **obrázku 15** je spektrum iontu ($m/z = 517,0$) po první ztrátě *terc.*-butylu ($m/z = 459,1$). Píky v tomto spektru odpovídají zbylým dvěma ztrátám *terc.*-butylu, tedy ionty $m/z = 402,9$ a $m/z = 347,0$. Na **obrázku 16** je hmotnostní spektrum

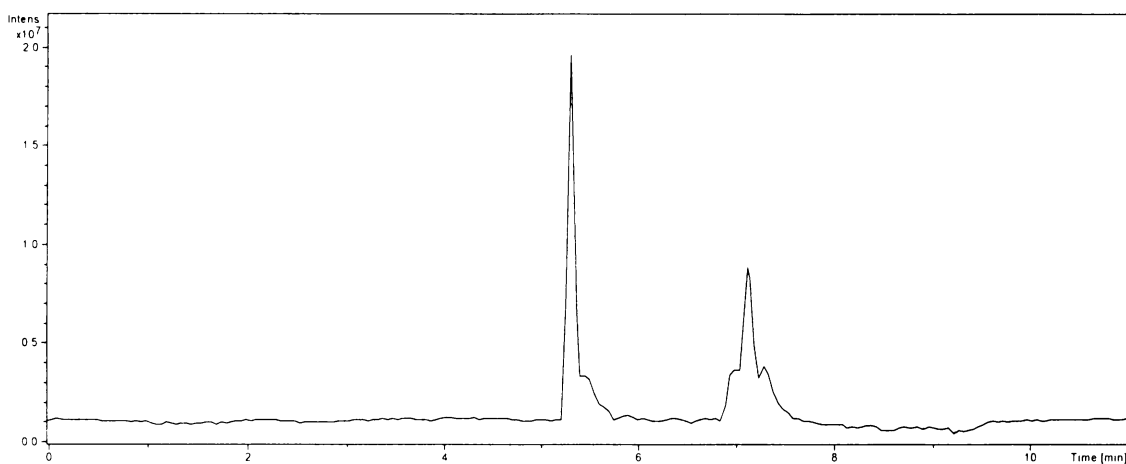
fragmentovaného iontu bez *tert.*-butylů ($m/z = 347,1$). S jistotou lze určit pouze pík s hodnotou $m/z = 170,6$, který odpovídá cyklenovému kruhu bez všech substituentů. Další píky ve spektru mohou patřit dvěma a více strukturám. Pouze dva píky $m/z = 126,7$ a $m/z = 144,7$ pod hodnotou 170,6 byly částečně identifikovány. Odpovídají látkám v pozadí a byly ověřeny pokusem se slepým vzorkem.



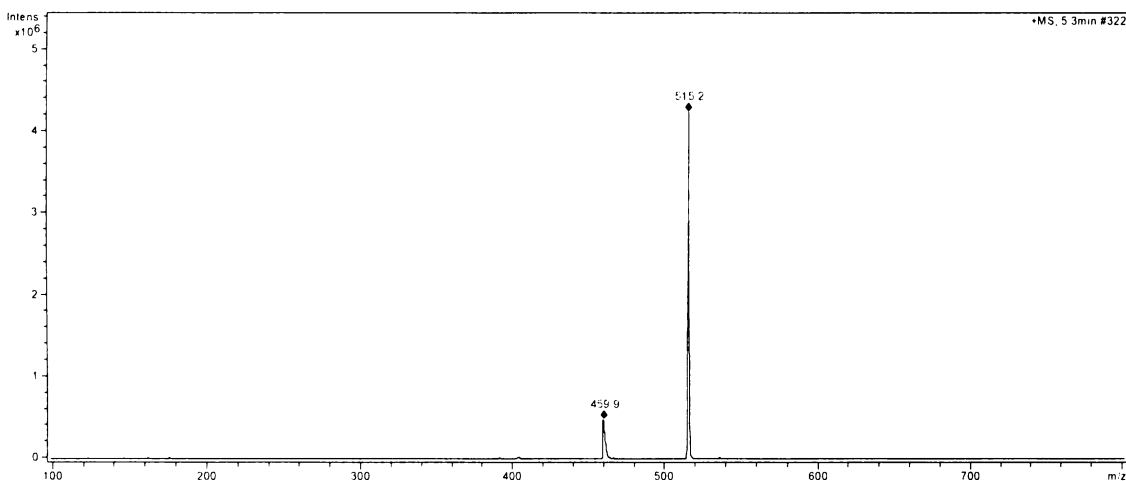
Obrázek 16 Hmotnostní spektrum fragmentovaného iontu $m/z = 347,1$. Pík s hodnotou $m/z = 170,6$ odpovídá cyklenovému kruhu bez substituentů. Další píky ve spektru nelze s jistotou identifikovat, neboť jejich hodnoty m/z odpovídají několika možným strukturám.

Výsledkem měření $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$ na nanoLC-MS byly chromatogram a hmotnostní spektrum na **obrázcích 17 a 18**. Vyšší pík chromatogramu odpovídá cyklenu, nižší pík odpovídá látkám z kontaminace, vzniklé přípravou vzorku v plastových mikrozkuvkách. Tato kontaminace se projevuje ve všech chromatogramech a byla ověřena slepým vzorkem. Hmotnostní spektrum na **obrázku 18** bylo naměřeno pro nejvyšší bod píku cyklenu v chromatogramu na **obrázku 17**. Pík s hodnotou $m/z = 515,2$ odpovídá molekulárnímu iontu, $m/z = 459,9$ je fragment vzniklý ztrátou jedné *tert.*-butylové skupiny. Podle chromatogramu i podle hmotnostního spektra lze usuzovat, že zkoumaný vzorek cyklenu má vysokou čistotu. Na chromatogramu není

žádný jiný pík, kromě látek z výše zmíněné kontaminace, a v hmotnostním spektru není patrný vliv pozadí.

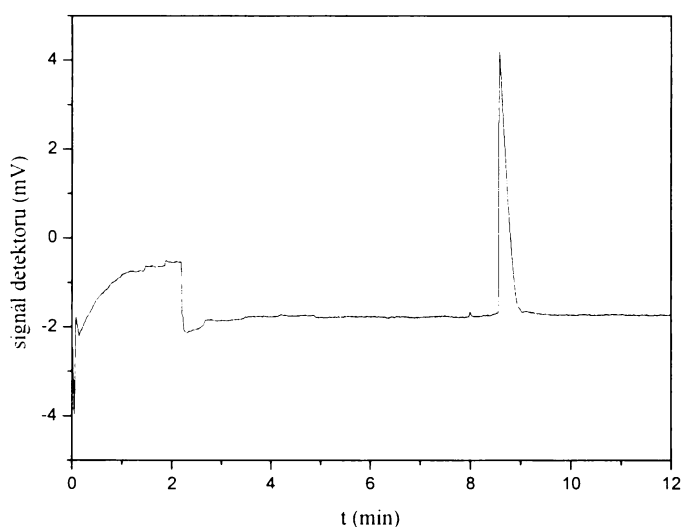


Obrázek 17 Chromatogram $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$. Pík vlevo odpovídá cyklenu, pík vpravo vznikl kontaminací vzorku z plastových mikrozkuvek, ve kterých byl vzorek připravován pro analýzu. Stacionární fáze v prekoncentrační a analytické kolonce na čipu byl grafitizovaný uhlík.



Obrázek 18 Hmotnostní spektrum $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$. Pík $m/z = 515,2$ odpovídá molekulárnímu iontu, pík $m/z = 459,9$ je jeho fragment vzniklý ztrátou jedné *terc.*-butylové skupiny.

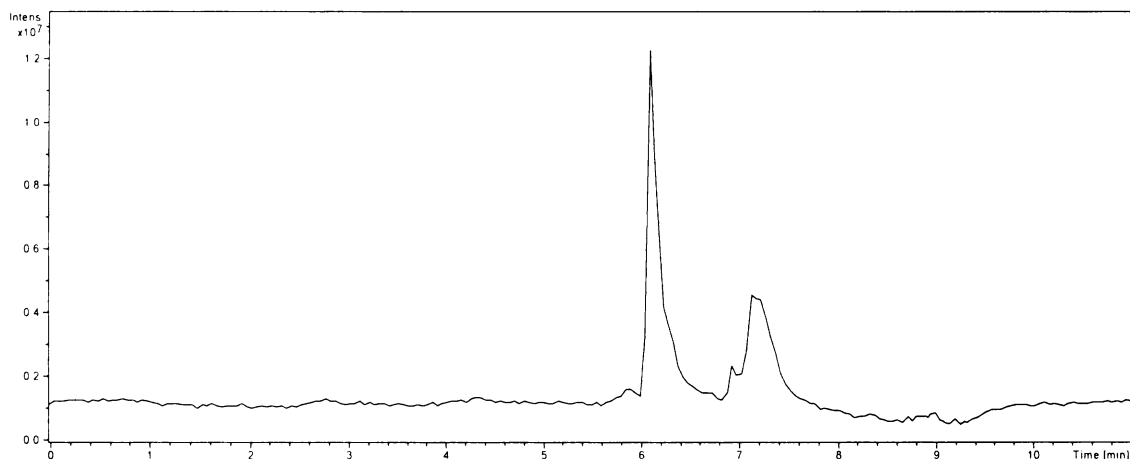
Analýzou téhož vzorku na kapilární zónové elektroforéze byl pozorován elektroferogram na **obrázku 19**. Roztok vzorku byl proměřen několikrát za sebou se stejným výsledkem. Jediný pík ukazuje na poměrně vysokou čistotu cyklenu. Aby bylo ověřeno, že se skutečně jedná pouze o tBu₃DO3A a ne o pík několika neseparovaných cyklenu či o nečistotu, byla analyzována také směs tBu₃DO3A a tBu₄DOTA, která byla dále prověřena metodou standardního přídávku. Takto ověřovány byly i další analýzy tBu₄DOTA a tBu₂DO2A.



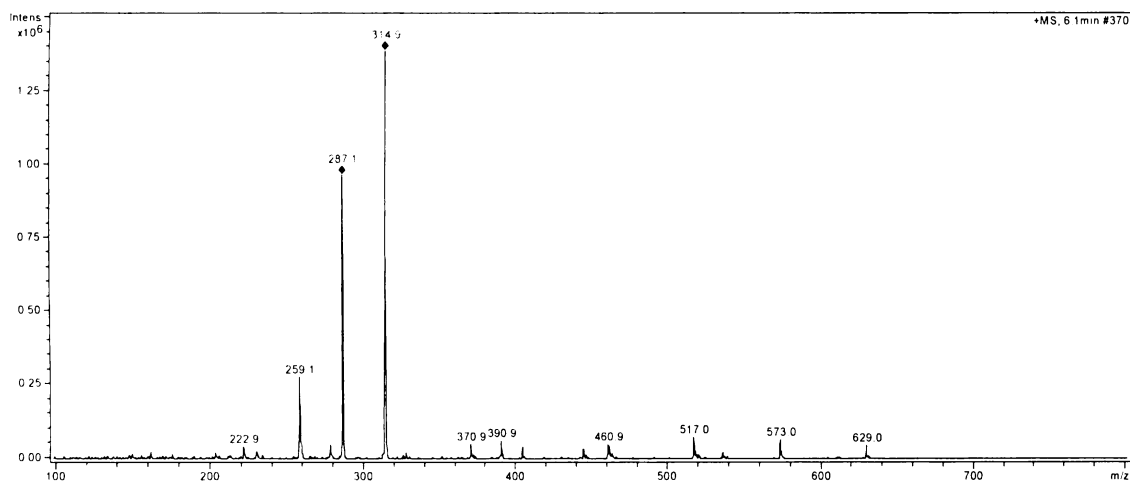
Obrázek 19 Elektroferogram tBu₃DO3A. Jediný pík svědčí o vysoké čistotě vzorku. Separací pufr, 20mM octan amonný v methanolu; separační napětí, 30 kV; proud, 16,3 μ A.

Analýzou tBu₄DOTA byl získán chromatogram na **obrázku 20**, jehož nejvyššímu bodu odpovídá hmotnostní spektrum na **obrázku 21**. Pík na **obrázku 20** vlevo byl podle hmotnostního spektra identifikován jako tBu₄DOTA, menší pík vpravo patří látkám uvolněným z plastových mikrozumavek při přípravě vzorku. V hmotnostním spektru je patrný molekulární iont s hodnotou $m/z = 629,0$, má ale malou intenzitu. Největší intenzitu ve spektru má pík s hodnotou $m/z = 314,9$, která také náleží

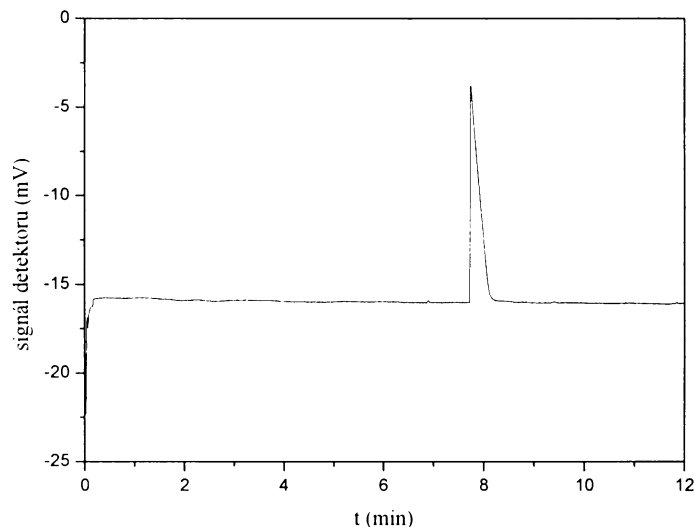
molekulárnímu iontu. Ten je ale dvakrát nabitý, a proto má poloviční hodnotu m/z . Další píky odpovídají fragmentům po ztrátě jednotlivých *terc.*-butylových skupin.



Obrázek 20 Chromatogram $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ separovaného na grafitizovaném uhlíku. Cyklenu opět odpovídá vyšší pík, druhý pík je projev kontaminace z plastových mikrozkuumavek.



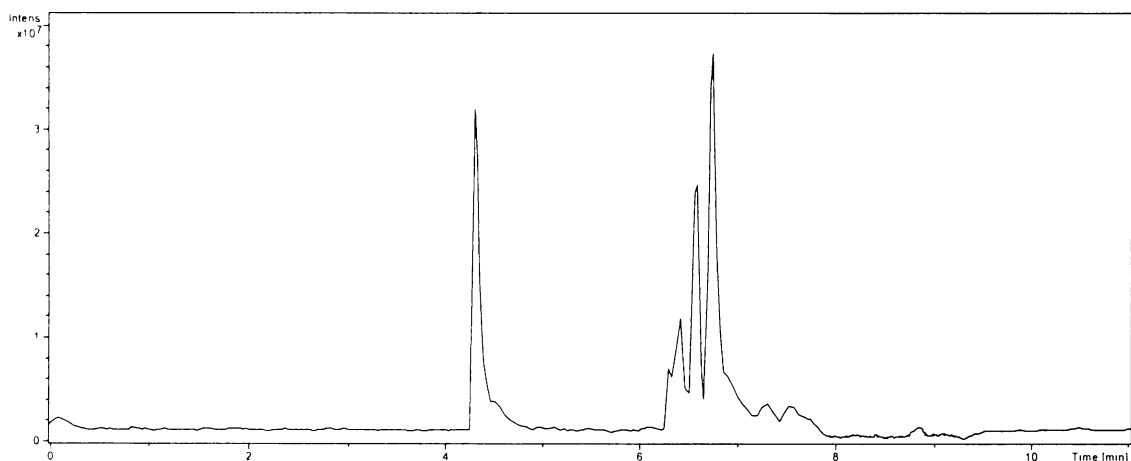
Obrázek 21 Hmotnostní spektrum $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$. Pík $m/z = 629,0$ odpovídá molekulárnímu iontu, stejně jako pík $m/z = 314,9$, který je dvakrát nabitý, a proto má poloviční hodnotu m/z . Další píky ve spektru odpovídají postupným ztrátám jednotlivých *terc.*-butylových skupin.



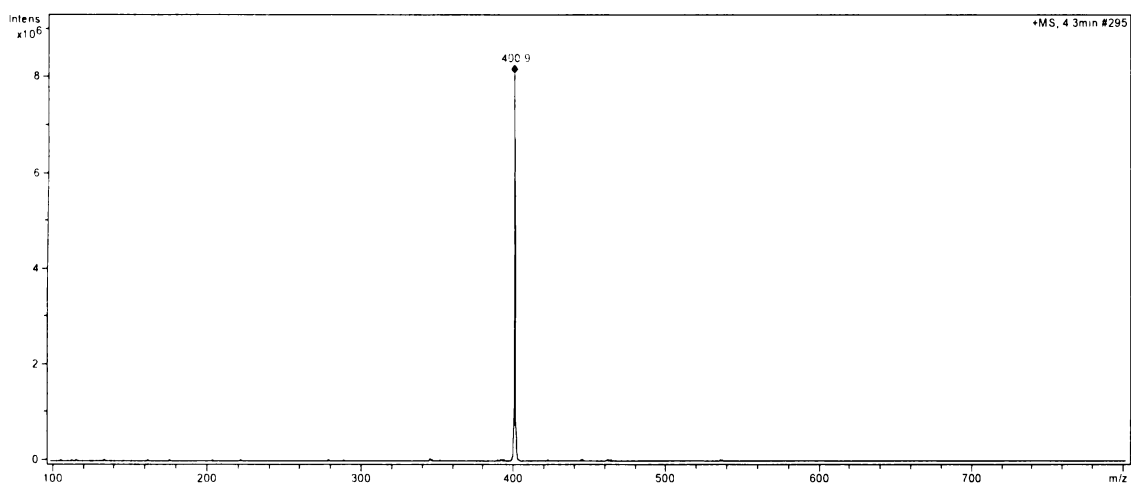
Obrázek 22 Elektroferogram tBu₄DOTA. Jediný detegovaný pík vypovídá o vysoké čistotě cyklenu. Separační pufr, 20mM octan amonný v methanolu; separační napětí, 30 kV; proud, 16,1 μ A.

Výsledek analýzy tBu₄DOTA na nanoLC-MS byl opět ověřen na kapilární zónové elektroforéze. Získaný elektroferogram je uveden na **obrázku 22**. Podle něj lze konstatovat, že vzorek tBu₄DOTA byl syntetizován s vysokou čistotou.

Chromatogram tBu₂DO₂A je na **obrázku 23**. Pík vlevo patří cyklenu, skupina píků vpravo jsou látky vymyté z polypropylenových mikrozkušavek. V nejvyšším bodě píku cyklenu bylo naměřeno hmotnostní spektrum uvedené na **obrázku 24**. Hodnota $m/z = 400,9$ odpovídá molekulárnímu iontu tBu₂DO₂A. Podle hmotnostního spektra a podle chromatogramu lze usoudit, že tento vzorek cyklenu je čistý. Z hmotnostního spektra lze také vyčíst, že tBu₂DO₂A je poměrně stálý, neboť při ionizaci vznikl pouze molekulární iont. Není možné určit, zda se u této látky jedná o formu cis nebo trans. K tomu by bylo nutné nejprve naměřit spektra standardů obou forem.



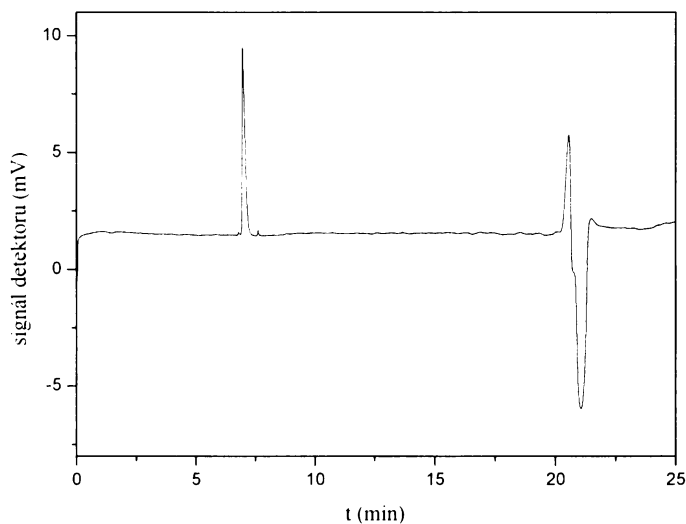
Obrázek 23 Chromatogram $t\text{Bu}_2\text{DO}_2\text{A}$ separovaného na grafitizovaném uhlíku. Separovaný pík vlevo je měřený cyklen, skupina píků vpravo odpovídá látkám z kontaminace z plastových mikrozkuvek.



Obrázek 24 Hmotnostní spektrum $t\text{Bu}_2\text{DO}_2\text{A}$. Pík s hodnotou $m/z = 400,9$ odpovídá molekulárnímu iontu.

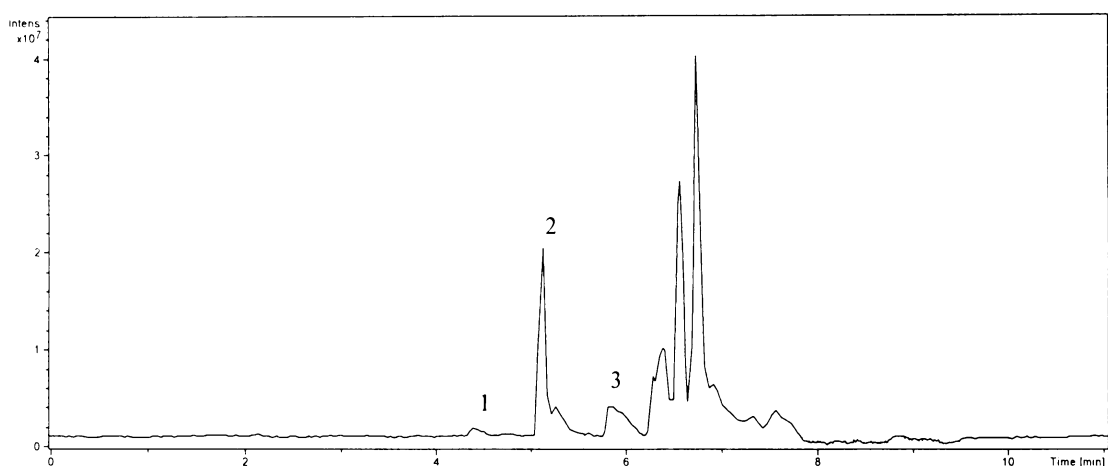
Výsledek z nanoLC-MS byl ověřen na kapilární zónové elektroforéze. Vzniklý elektroferogram je na **obrázku 25**. $t\text{Bu}_2\text{DO}_2\text{A}$ eluuje kolem sedmé minuty, vpravo je

systemový pík odpovídající nadávkované zóně, která migruje s elektroosmotickým tokem. Také touto metodou byla ověřena vysoká čistota vzorku, protože se zde nevyskytl žádný jiný pík.

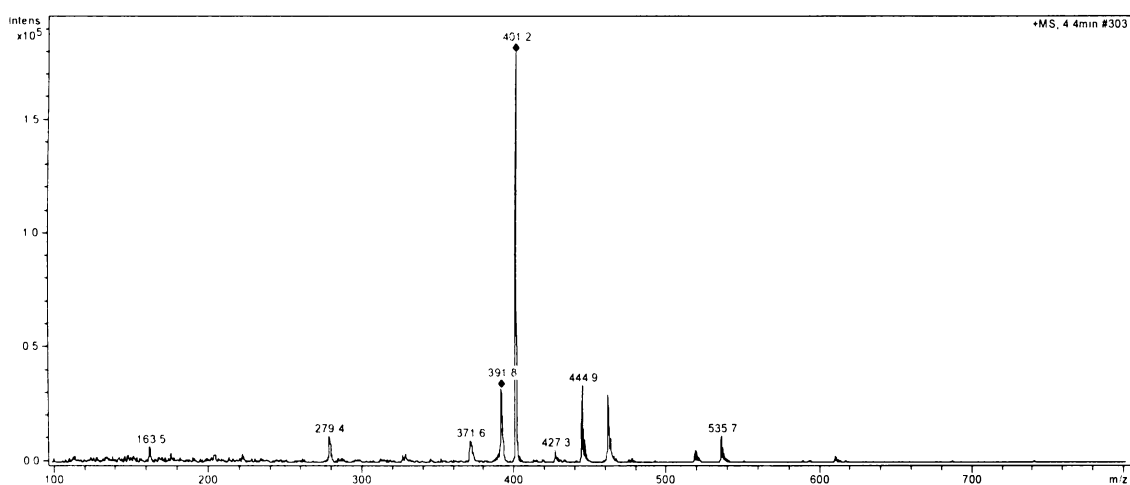


Obrázek 25 Elektroferogram $t\text{Bu}_2\text{DO}_2\text{A}$. Vysoká čistota cyklu byla potvrzena, systémový pík vpravo odpovídá nadávkované zóně pohybující se rychlostí elektroosmotického toku. Separční pufr, 20mM octan amonný v methanolu; separační napětí, 30 kV; proud, 17,2 μA .

Při měření vzorků V1 a V2, které byly syntetizované na katedře organické chemie PřF UK v Praze, bylo cílem potvrdit předpoklad, že obsahují směs cyklenů $t\text{Bu}_2\text{DO}_2\text{A}$ a $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$. Chromatogram vzorku V1 je na **obrázku 26**. Vzorek V1 obsahuje nejvíce $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$, méně $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ a $t\text{Bu}_2\text{DO}_2\text{A}$ je obsažen jen ve velice malém množství. Díky tomu je v hmotnostním spektru $t\text{Bu}_2\text{DO}_2\text{A}$ ve vzorku V1 na **obrázku 27** zřetelný vliv pozadí.

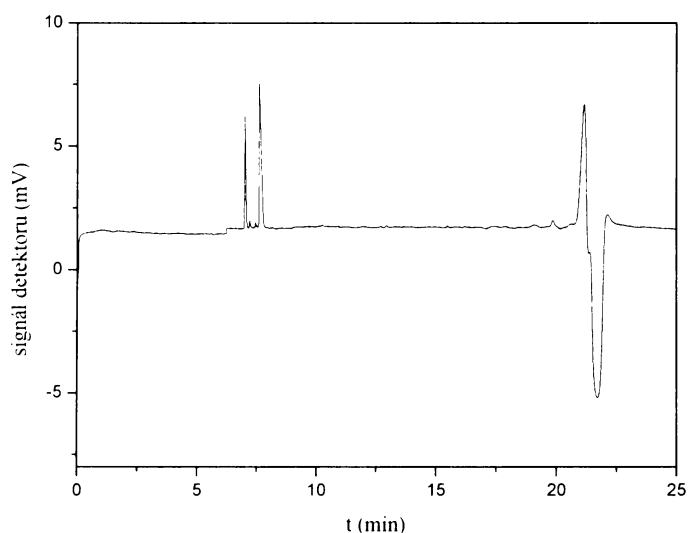


Obrázek 26 Chromatogram vzorku V1 separovaného na grafitizovaném uhlíku. Pík s číslem jedna je $t\text{Bu}_2\text{DO}_2\text{A}$, druhý pík odpovídá $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$ a pík $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ má číslo tři. Další píky pocházejí z kontaminace z polypropylenových mikrozkuvek.

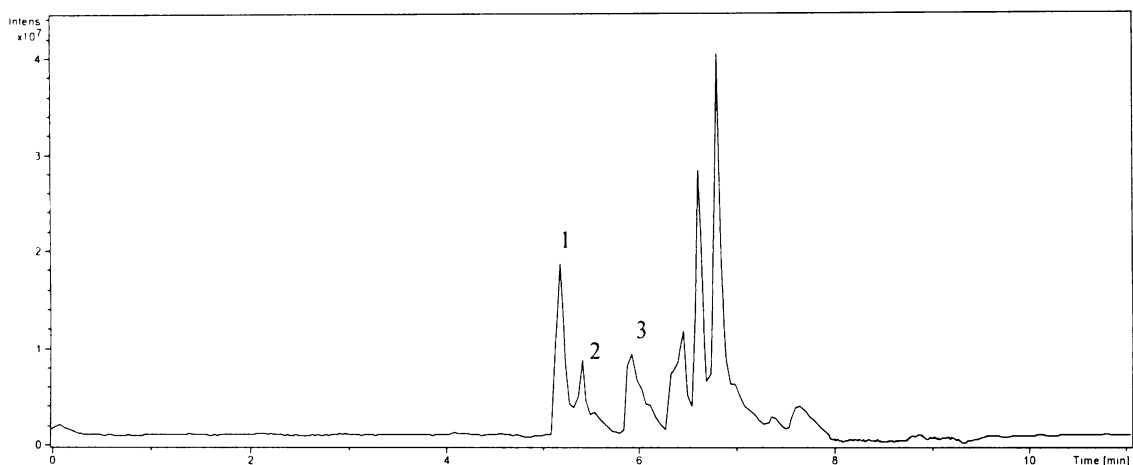


Obrázek 27 Hmotnostní spektrum $t\text{Bu}_2\text{DO}_2\text{A}$ ze vzorku V1. Díky malému zastoupení tohoto cyklu ve vzorku je patrný vliv pozadí.

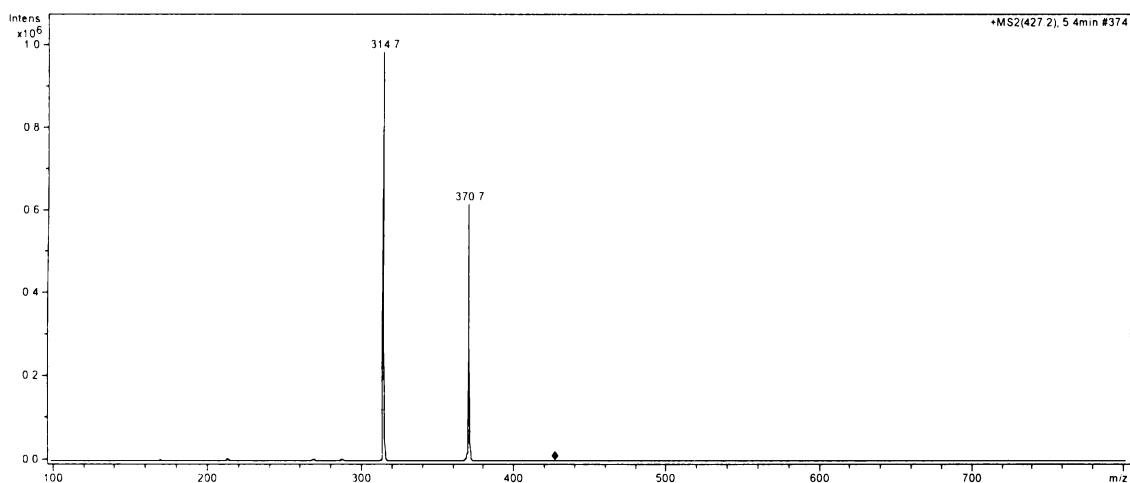
Proměřením vzorku V1 na kapilární zónové elektroforéze byl získán elektroferogram **na obrázku 28**. Touto metodou nebyl tBu₂DO2A detegován. Píky dvou látek separovaných elektroforézou odpovídají tBu₃DO3A a tBu₄DOTA. Vzorek V2, jehož chromatogram je na **obrázku 29**, obsahuje tBu₃DO3A a tBu₄DOTA. Za tBu₃DO3A eluuje ještě látka s hodnotou m/z = 426,9, která nebyla identifikována ani pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie, jejíž hmotnostní spektrum je na **obrázku 30**. Z experimentálních výsledků však nelze vyloučit možnost, že se jedná o substituovaný cyklen s relativní molekulovou hmotností vyšší než 800, protože byl tandemovou hmotnostní spektrometrií naměřen pík s hodnotou m/z = 314,7. Tato hodnota odpovídá dvojnásobně nabitému molekulárnímu iontu tBu₄DOTA, může tedy jít o podobný cyklen s většími substituenty.



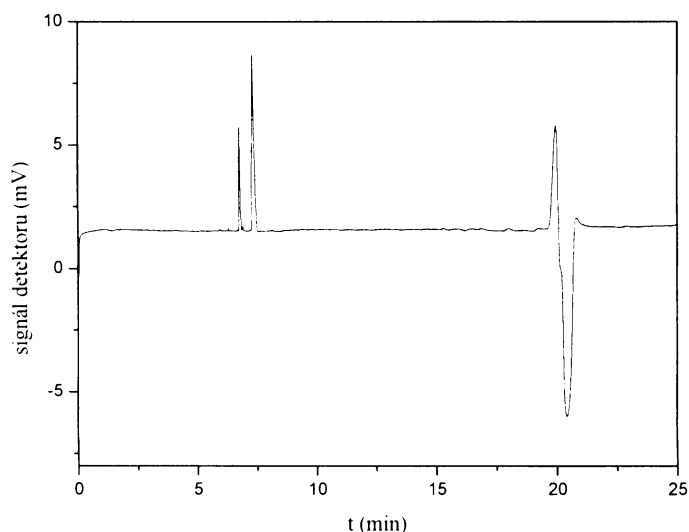
Obrázek 28 Elektroferogram vzorku V1. Před systémovým píkem odpovídajícím nadávkované zóně migrují tBu₄DOTA kolem sedmé minuty a tBu₃DO3A v osmé minutě, tBu₂DO2A není detegován. Separační pufr, 20mM octan amonný v methanolu; separační napětí, 30 kV; proud, 17,1 μ A.



Obrázek 29 Chromatogram vzorku V2 separovaného na grafitizovaném uhlíku. První pík je $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$, číslem dvě je označena neidentifikovaná látka s hodnotou $m/z = 426,9$ a pík s číslem tři je $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$.



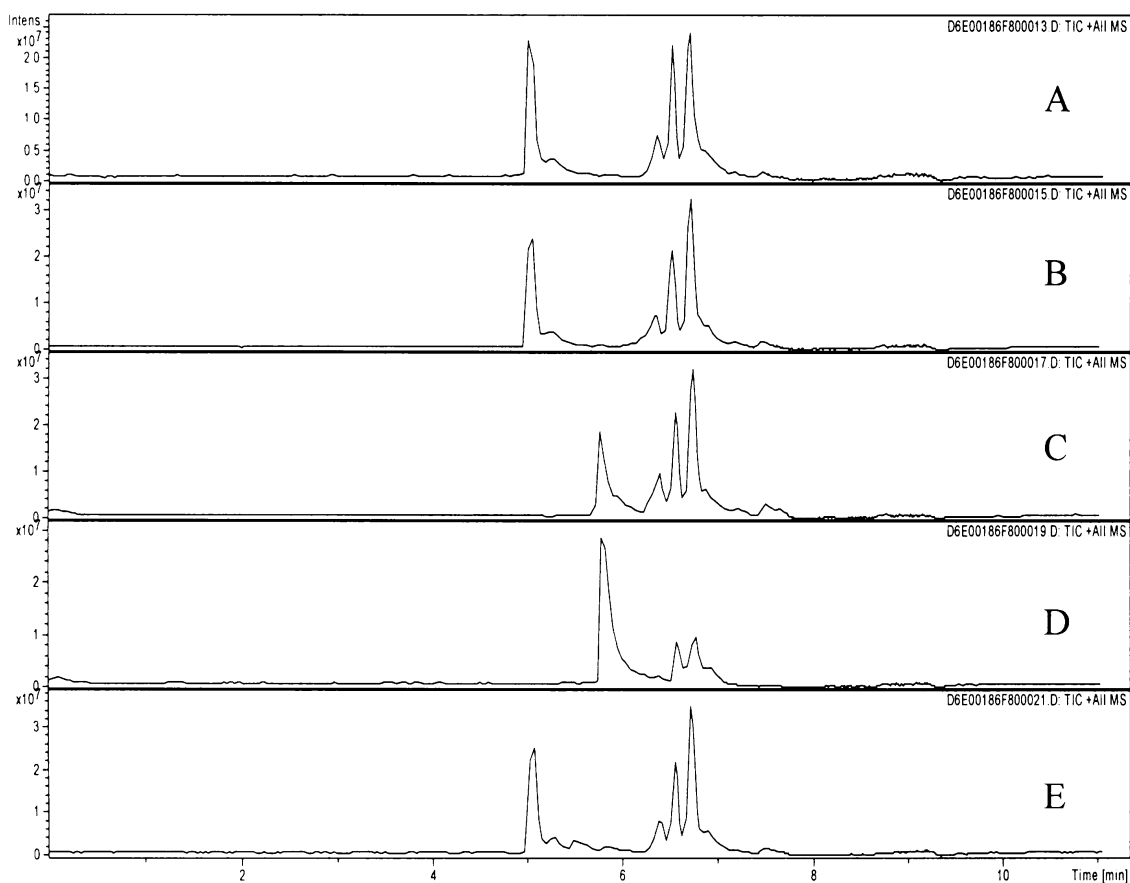
Obrázek 30 Tandemové hmotnostní spektrum iontu s hodnotou $m/z = 426,9$. Po rozštěpení iontu vznikly fragmenty s hodnotami $m/z = 370,7$ a $m/z = 314,7$.



Obrázek 31 Elektroferogram vzorku V2. Nejprve eluuje $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ a za ním $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$. $t\text{Bu}_2\text{DO}_2\text{A}$ opět nebyl detegován. Separační pufr, 20mM octan amonný v methanolu; separační napětí, 30 kV; proud, 17,2 μA .

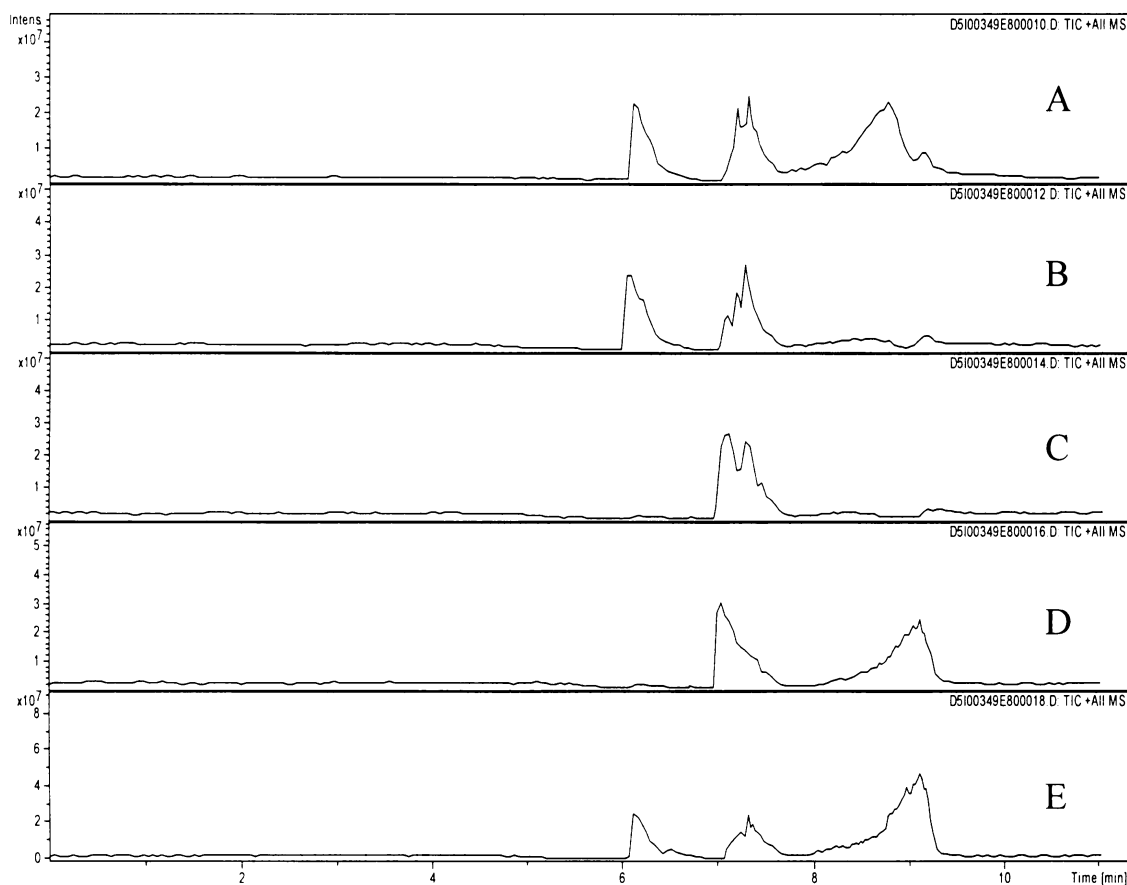
Kapilární zónovou elektroforézou, jejíž elektroferogram je na **obrázku 31**, nebyla neznámá látka detegována. Píky v elektroferogramu odpovídají $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$ a $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ stejně jako u vzorku V1. $t\text{Bu}_2\text{DO}_2\text{A}$ nebyl ve vzorku V2 detegován ani kapilární zónovou elektroforézou, ani nanoLC-MS.

Vzorky A, B, C, D a E, dodané k analýze katedrou anorganické chemie, byly analyzovány s cílem určit, které cykleny obsahují. Na **obrázku 32** jsou chromatogramy všech pěti vzorků separovaných opět na grafitizovaném uhlíku. Vzorky A, B a E obsahují nejvíce $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$, vzorky C a D $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$. V chromatogramu vzorku E jsou za píkem $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$, který má největší intenzitu, ještě tři malé píky odpovídající cyklenům. První z těchto tří je také $t\text{Bu}_3\text{DO}_3\text{A}$, druhý patří kyselině vzniklé z $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ ztrátou jednoho *terc.*-butylu. Třetí z malých píků odpovídá $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$.



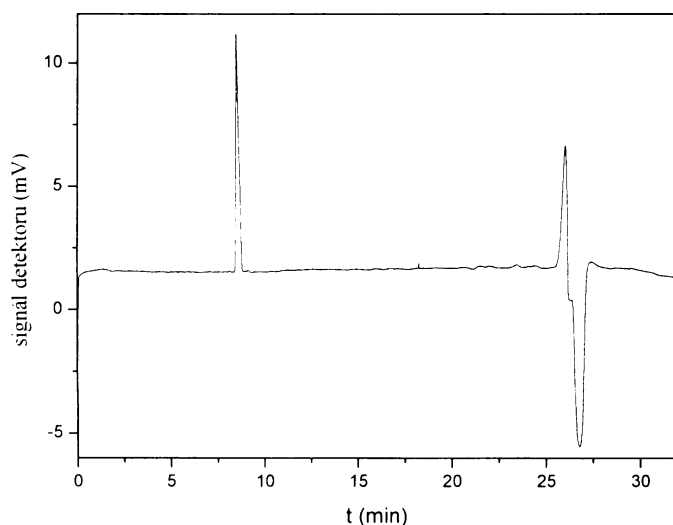
Obrázek 32 Chromatogramy vzorků A, B, C, D a E separovaných na grafitizovaném uhlíku. Podle hmotnostního spektra bylo zjištěno, že vzorky A, B, a E obsahují nejvíce $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ eluované kolem páté minuty, vzorky C a D $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ eluované kolem šesté minuty, skupina piků vpravo je opět způsobena kontaminací z polypropylenových mikrozkuvek.

Aby bylo možné porovnat vlastnosti dvou různých stacionárních fází, byly všechny vzorky proměřeny také s použitím stacionární fáze Zorbax 300SB - C18. Chromatogramy vzorků A, B, C, D a E z tohoto měření jsou uvedeny na **obrázku 33**.



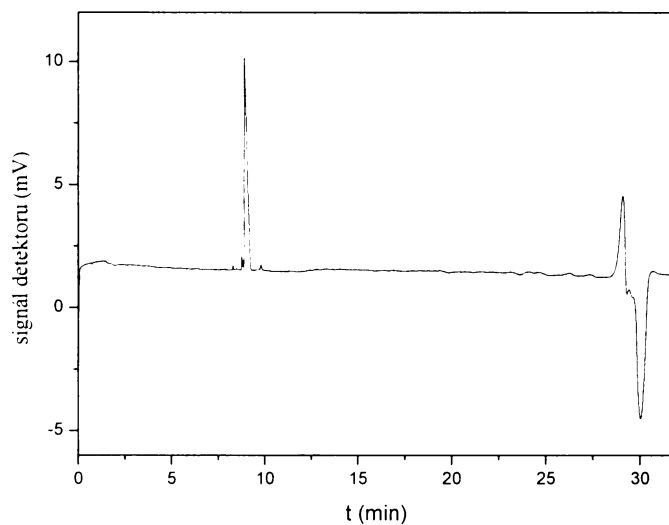
Obrázek 33 Chromatogramy vzorků A, B, C, D a E s použitím Zorbax 300SB - C18 jako stacionární fáze. $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ (eluovaný těsně po šesté minutě) u vzorků A, B a E byl separován, $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ nebyl oddělen od píků způsobených kontaminací z mikrozkušavek.

Je zřejmé, že na stacionární fázi C18 se separuje pouze $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$. $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ zůstává neoddělen od kontaminujících látek z polypropylenových mikrozkušavek. V pravé části chromatogramu vzorků A, D a E se zřetelně separoval pík (kolem deváté minuty), který podle hmotnostních spekter patří ftalátům a dalším látkám, kterými byly vzorky kontaminovány ze sept při dávkování. Tyto látky byly detegovány i na grafitizovaném uhlíku, ale jen v malém množství. Při porovnání stacionární fáze C18 s grafitizovaným uhlíkem bylo tedy zjištěno, že grafitizovaný uhlík separuje cykly mnohem lépe než stacionární fáze C18.

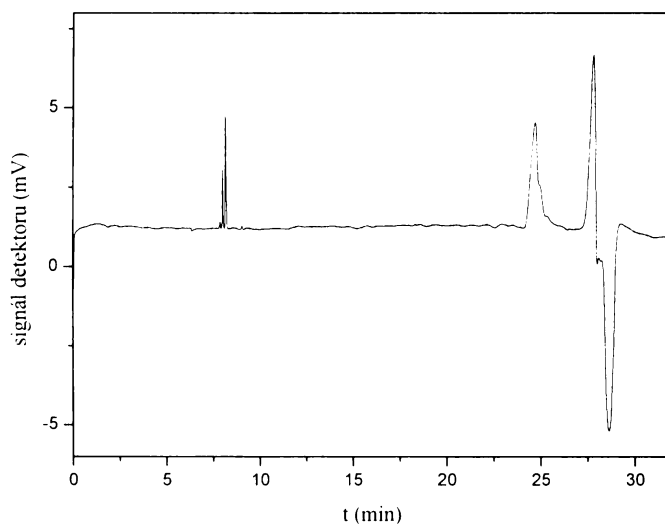


Obrázek 34 Elektroferogram vzorku A. Látka eluující kolem sedmé minuty je $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$. Separáčnı pufr, 20mM octan amonny v methanolu; separáčnı napětı, 30 kV; proud, 16,1 μA .

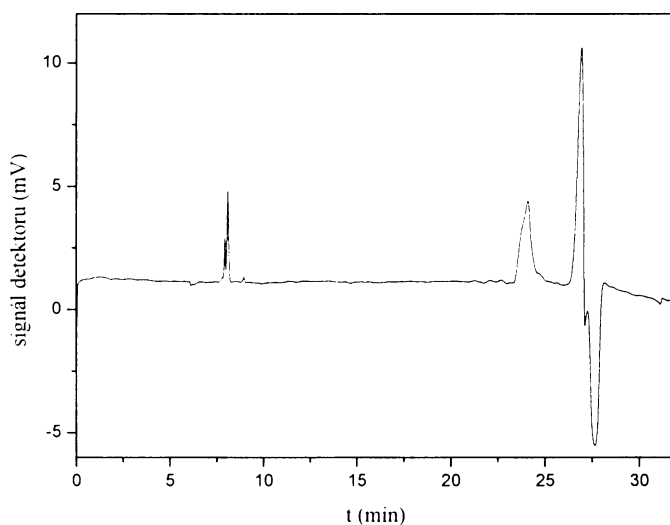
Také tyto vzorky byly analyzovány na kapilární zónové elektroforéze. Získané elektroferogramy jsou na **obrázcích 34 – 38**. Porovnáním výsledků kapilární zónové elektroforézy s chromatogramy z nanoLC-MS lze konstatovat shodu v látkách nalezených ve vzorcích A, B, C, D a E. Také kapilární zónová elektroforéza identifikovala ve vzorcích A, B a E cyklen $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ a ve vzorcích C a D cyklen $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$. Kapilární zónová elektroforéza navíc odhalila pouze ve vzorcích C a D další látku velmi podobnou svými migračními vlastnostmi analyzovaným cyklenům. Tato látka je patrná na **obrázcích 36 a 37** jako menší pík migrující před píkem vlastního cyklu kolem osmé minuty. Vzorek E obsahuje $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ a $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ a další neidentifikovanou látku ve velmi malém zastoupenı, která je podobná svými migračními vlastnostmi analyzovaným cyklenům.



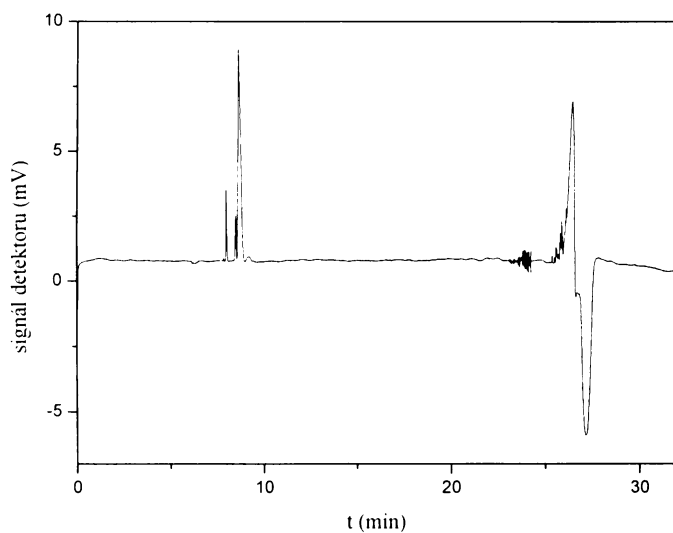
Obrázek 35 Elektroferogram vzorku B. Pík opět odpovídá $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$. Separační pufr, 20mM octan amonný v methanolu; separační napětí, 30 kV; proud, 16,1 μA .



Obrázek 36 Elektroferogram vzorku C. Látka elující kolem sedmé minuty je $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$. Před systémovým píkem odpovídajícím nadávkované zóně kolem 25. minuty eluuje ještě nečistota, která nebyla identifikována. Separační pufr, 20mM octan amonný v methanolu; separační napětí, 30 kV; proud, 16,2 μA .



Obrázek 37 Elektroferogram vzorku D. Pík vlevo je $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$, před systémovým píkem odpovídajícím nadávkované zóně eluuje neznámá nečistota. Separáční pufr, 20mM octan amonný v methanolu; separáční napětí, 30 kV; proud, 16,3 μA .



Obrázek 38 Elektroferogram vzorku E. Dva píky vlevo odpovídají $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ a $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ v tomto pořadí. Separáční pufr, 20mM octan amonný v methanolu; separáční napětí, 30 kV; proud, 16,3 μA .

5 ZÁVĚR

Vzorky cyklenů $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$, $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ a $t\text{Bu}_2\text{DO2A}$ byly pomocí nanoLC-MS separovány. Jejich identifikace byla ověřena tandemovou hmotnostní spektrometrií a kapilární zónovou elektroforézou. Podle získaných hmotnostních spekter, chromatogramů a elektroferogramů lze konstatovat vysokou čistotu těchto vzorků.

U vzorků V1 a V2 byl ověřován předpoklad, že obsahují $t\text{Bu}_2\text{DO2A}$ a $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$. Z výsledků obou analytických metod vyplývá, že $t\text{Bu}_2\text{DO2A}$ je v malém množství obsažen jen ve vzorku V1. Ve vzorku V2 nebyl tento cyklen detegován. V obou vzorcích jsou zastoupeny $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ a $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$.

Dále byly analyzovány směsné vzorky označené písmeny A až E. Z výsledků nanoLC-MS vyplývá, že $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$ obsahují vzorky A, B a E, $t\text{Bu}_4\text{DOTA}$ je ve vzorcích C, D a E. $t\text{Bu}_2\text{DO2A}$ nebyl nalezen v žádném z těchto pěti vzorků. Kapilární zónovou elektroforézou byly tyto výsledky potvrzeny.

Metoda nanoLC-MS je vhodná pro separaci a identifikaci esterových cyklenů. Po porovnání stacionárních fází na LC-čipu lze pro separaci doporučit spíše grafitizovaný uhlík. Výhodou čipové kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí je rychlost analýzy, nenáročnost na množství a koncentraci vzorku a poměrně snadná identifikace. Touto metodou nelze od sebe odlišit cis- a trans-izomery, aniž by byla známa hmotnostní spektra standardů obou látek. Další nevýhodou je poměrně velká náročnost finanční a instrumentální.

Ve srovnání s nanoLC-MS je za daných experimentálních podmínek kapilární zónová elektroforéza méně citlivá, což může být za určitých okolností považováno za výhodu. Hmotnostní spektrometrií jsou detegovány i látky, které se ve vzorku vyskytují v menším než stopovém množství. To může ztížit identifikaci ostatních látek. Podstatnou nevýhodou kapilární zónové elektroforézy je nutnost proměření standardu látky při její identifikaci, dále pak časová náročnost analýz a malá robustnost.

6 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

tBu ₃ DO3A.....	tris(<i>tec.</i> -butylester) 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctové kyseliny
tBu ₄ DOTA.....	tetrakis(<i>tec.</i> -butylester) 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctové kyseliny
tBu ₂ DO2A.....	bis(<i>tec.</i> -butylester) 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4-dioctové kyseliny („cis”) nebo bis(<i>terc.</i> -butylester) 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,7-dioctové kyseliny („trans”)
H ₄ DOTA.....	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
H ₃ DO3A.....	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina
μ_{ef}	elektroforetická pohyblivost v cm ² /Vs
μ_{eof}	elektroosmotická pohyblivost v cm ² /Vs
η	dynamická viskozita okolního prostředí v kg/ms
π	Ludolfovo číslo (= 3,14)
c	počet cyklů v molekule
CZE.....	kapilární zónová elektroforéza
d_i	vnitřní průměr kapiláry
d_o	vnější průměr kapiláry
dv	počet dvojných vazeb v molekule
E	intenzita elektrického pole ve V/m
HPLC.....	vysokoučinná kapalinová chromatografie
L_c	celková délka kapiláry v cm
L_d	délka kapiláry k detektoru v cm
m/z	poměr hmotnosti ku náboji
M_r	relativní molekulová hmotnost
nanoLC-MS.....	nanokapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
NMR/MRI.....	nukleární magnetická rezonance/Magnetic Resonance Imaging

Qcelkový náboj částice v C
 rpoloměr částice v m
 t (min).....migrační čas v min
 t_{eof}migrační čas neutrálního markeru v min
 Unapětí vložené mezi elektrody v jednotkách V
UV/VIS záření.....ultrafialové/viditelné záření
 v_{eof}rychlost elektroosmotického toku v cm/s
 xpočet atomů uhlíku v molekule
 ypočet atomů vodíku v molekule
 zpočet atomů dusíku v molekule

7 LITERATURA

1. van Alphen J., Recl. Trav. Chim. Pays-Bas 56 (1937) 343.
2. Barefield E. K., Wagner F., Hodges K. D., Inorg. Chem. 15 (1976) 1370.
3. Barefield E. K., Inorg. Chem. 11 (1972) 2273.
4. Weisman G. R., Reed D. P., J. Org. Chem. 61 (1996) 5186.
5. Li C., Wong W-T., J. Org. Chem. 68 (2003) 2956.
6. Bridger G. J., Skerlj R. T., Thornton D., Padmanabhan S., Martellucci S. A., Henson G. W., Abrams M. J., Yamamoto N., De Vreese K., Pauwels R., De Clercq E., J. Med. Chem. 38 (1995) 366.
7. Zhang X., van Eldik R., Inorg. Chem. 34 (1995) 5606.
8. Koola J. D., Kochi J. K., Inorg. Chem. 26 (1987) 908.
9. Nam W., Ho R., Valentine J. S., J. Am. Chem. Soc. 113 (1991) 7052.
10. Nam W., Valentine J. S., J. Am. Chem. Soc. 115 (1993) 1772.
11. Matsuoka S., Yamamoto K., Ogata T., Kusaba M., Nakashima N., Fujita E., Yanagida S., J. Am. Chem. Soc. 115 (1993) 601.
12. Li H., Anderson W. C., Chambers J. Q., Hobbs D. T., Inorg. Chem. 28 (1989) 863.
13. Nam W., Baek S. J., Lee K. A., Ahn B. T., Muller J. G., Burrows C. J., Valentine J. S., Inorg. Chem. 35 (1996) 6632.
14. Kelly C. A., Mulazzani Q. G., Blinn E. L., Rodgers M. A. J., Inorg. Chem. 35 (1996) 5122.
15. Blain S., Appriou P., Chaumeil H., Handel H., Anal. Chim. Acta 232 (1990) 331.
16. Louvet V., Handel H., Appriou P., Guglielmetti R., Eur. Polym. J. 23 (1987) 585.
17. Alexander V., Chem. Rev. 95 (1995) 273.
18. Loncin M. F., Desreux J. F., Merciny E., Inorg. Chem. 25 (1986) 2646.
19. Hancock R. D., Maumela H., Desousa A. S., Coord. Chem. Rev. 148 (1996) 315.
20. Němcová I., Engst P., Jelínek I., Sejbal J., Rychlovský P.: Spektrometrické analytické metody II., Karolinum, Praha (1998).
21. Hardouin J., Duchateau M., Caron R., Caron M., Rapid Commun Mass Spectrom. 20 (2006) 3236.

22. Agilent Technologies 2005, Application list, 5989 – 3627EN.
23. Štulík K. a kol.: Analytické separační metody, Karolinum, Praha (2004).
24. Kašička V., Chem. Listy 91 (1997) 320-329.
25. Foret F., Křivánková L., Boček P.: Capillary zone electrophoresis, VCH, Weinheim (1993).
26. Weinberger R.: Practical Capillary Electrophoresis, Academic Press, London (1993).
27. Guzman N. A.: Capillary Electrophoresis Technology, Marcel Dekker, New York (1993).
28. Jandík P., Bonn G.: Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions, VCH, Weinheim (1993).
29. Coufal P., Zuska J., van de Goor T., Smith V., Gaš B., Electrophoresis 24 (2003) 671.
30. Beckers J. L., Boček P., Electrophoresis 24 (2003) 518.
31. Sarmini K., Kenndler E., J. Chromatogr. A 792 (1997) 3.