

VYUŽITÍ BEZKONTAKTNÍ VODIVOSTNÍ DETEKCE PRO HPLC SEPARACI POLYKARBOXYLÁTOVÝCH DERIVÁTŮ CYKLENU

Anna Hamplová

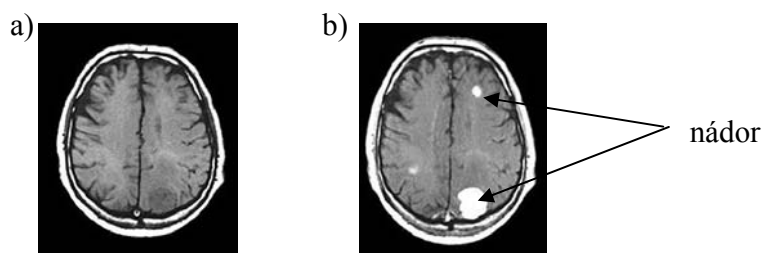
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie

Albertov 6, 128 43 Praha 2

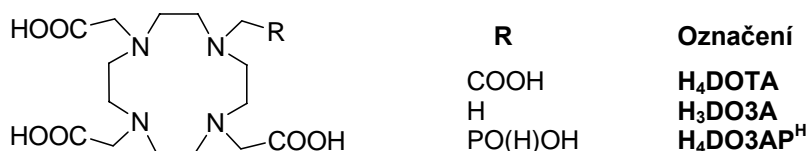
E-mail: annahamplova@gmail.com

Úvod

V současné době jsou nádorová onemocnění druhou nejčastější příčinou úmrtí a stávají se tak čím dál tím větší hrozbou. Včasné odhalení nádoru je přitom nejdůležitější podmínkou pro jeho úspěšnou léčbu. Již nyní má medicína k dispozici řadu účinných diagnostických metod, např. MRI (Magnetic Resonance Imaging). Pro dosažení lepšího zobrazení nádoru (Obr. 1) se používají kontrastní látky, jejichž základem je většinou gadolinitý ion. Pro použití v klinické praxi musí být tento pro tělo velmi toxický kov vázán v termodynamicky i kineticky dostatečně stabilním komplexu. Ligandy, užívané k tomuto účelu nejčastěji, jsou polykarboxylátové deriváty cyklohexanu (Obr. 2) schopné koordinovat ion gadolinia osmi koordinačně-kovalentními vazbami a vytvořit tak velmi stabilní komplex.



Obr. 1: Snímky mozku pořízené pomocí MRI bez použití kontrastní látky (a) a s použitím kontrastní látky (b), převzato z www.natur.cuni.cz/anorchem/19/Vyzkum.htm.



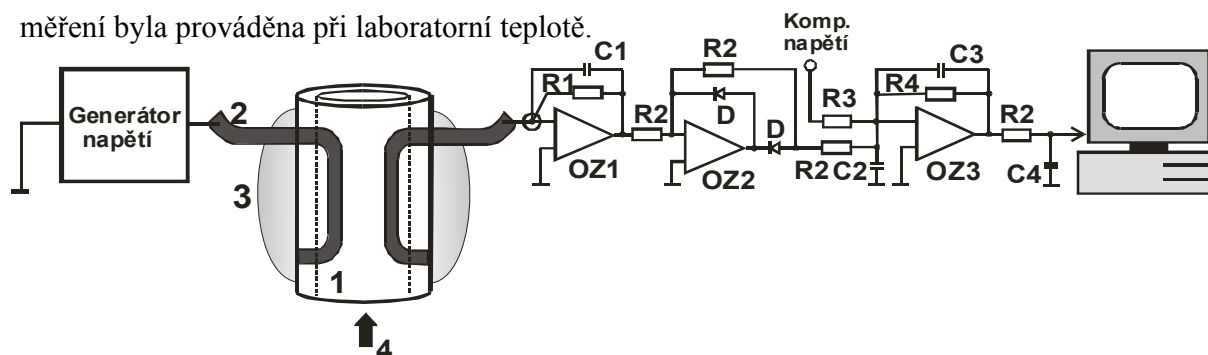
Obr. 2: Polykarboxylátové deriváty cyklohexanu.

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

Experimentální část

Pro přípravu mobilních fází byl použit methanol a acetonitril (čistota pro HPLC – LiChrosolv, Merck) a deionizovaná voda. Používané polykarboxylátové deriváty cyklenu byly syntetizovány na Katedře anorganické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze^{1,2,3}. Vzorky pro analýzu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byly připraveny rozpuštěním odpovídajících množství polykarboxylátových derivátů cyklenu ve 2 ml mobilní fáze a uchovávány v lednici.

Měření byla prováděna na kapalinovém chromatografu složeném z pumpy LCP 4000 (Ecom, ČR) a UV detektoru LCD 2084 (Ecom, ČR) a řízeném softwarem CSW 1.6 (Data Apex, ČR). K vývoji metody separace byly použity tyto kolony: RP Select B, $125 \times 4,0 \text{ mm}$ (Merck, SRN), Biospher PSI 200 NH, $150 \times 4,6 \text{ mm}$ (Labio, ČR), Ascentis RP-Amide, $250 \times 4,6 \text{ mm}$ (Supelco, USA) a Discovery HSF5, $150 \times 4,6 \text{ mm}$ (Supelco, USA). Dávkovaný objem vzorku byl $10 \mu\text{l}$, průtok mobilní fáze byl $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Mobilní fáze byla před použitím 15 minut sonifikována přístrojem Elmasonic S15H (P-LAB, ČR). Detekce byla prováděna při vlnové délce 200 nm. Ve druhé fázi práce byl za UV detektor připojen bezkontaktní vodivostní detektor (CCD) vyrobený na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze⁴ (Obr. 3). Jako zdroj vysokofrekvenčního sinusového napětí pro CCD (frekvence 100 kHz, amplituda 4 V) byl použit generátor FG 503 (Motech Industries, USA). Všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě.



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

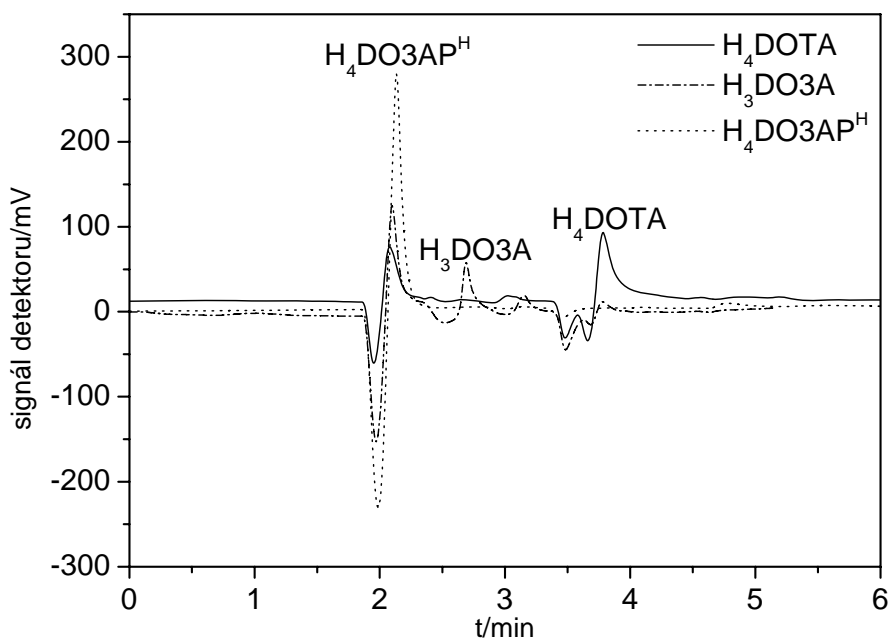
Výsledky a diskuse

Na základě struktury polykarboxylátových derivátů cyklenu lze předpokládat, že separace těchto látek může být založena jak na hydrofilních tak na hydrofobních interakcích. První experimenty byly provedeny na klasické reverzní fázi C8 (kolona RP Select B). Tato kolona má deaktivovány silanolové skupiny a proto je výrobcem doporučována pro separaci bazických látek. Analyzované látky však byly zadržovány jen velmi málo a k úspěšné separaci nedošlo. Polykarboxylátové deriváty cyklenu tedy není možné oddělit pouze na základě hydrofobních interakcí.

Jako druhá v pořadí byla pro separaci vyzkoušena stacionární fáze s navázanými aminopropylými řetězci (Biospher PSI 200 NH). Při použití mobilních fází obsahujících methanol a vodu až do obsahu methanolu 65% (obj.) byly polykarboxylátové deriváty cyklenu zadržovány natolik silně, že z kolony neeluovaly ani po 120 minutách analýzy. Až po změně mobilní fáze na směs acetonitril-voda (obsah acetonitrilu v rozmezí 35-85%), tzn. po zvýšení eluční síly mobilní fáze, začaly analyzované látky z kolony eluovat, nicméně k jejich separaci opět nedošlo. Mezi analyzovanými látkami a stacionární fází patrně dochází k poměrně silným hydrofilním interakcím, ale pouze na jejich základě nelze jednotlivé polykarboxylátové deriváty cyklenu od sebe oddělit.

Pro další vývoj metody separace vybrána N-alkylamidová kolona (Ascentis RP-Amide). U této stacionární fáze se mohou uplatnit jak hydrofilní tak hydrofobní interakce a pro analýzu bazických látek je doporučována přímo výrobcem. Bohužel ani na této koloně vhodné podmínky pro separaci polykarboxylátových derivátů cyklenu nebyly nalezeny.

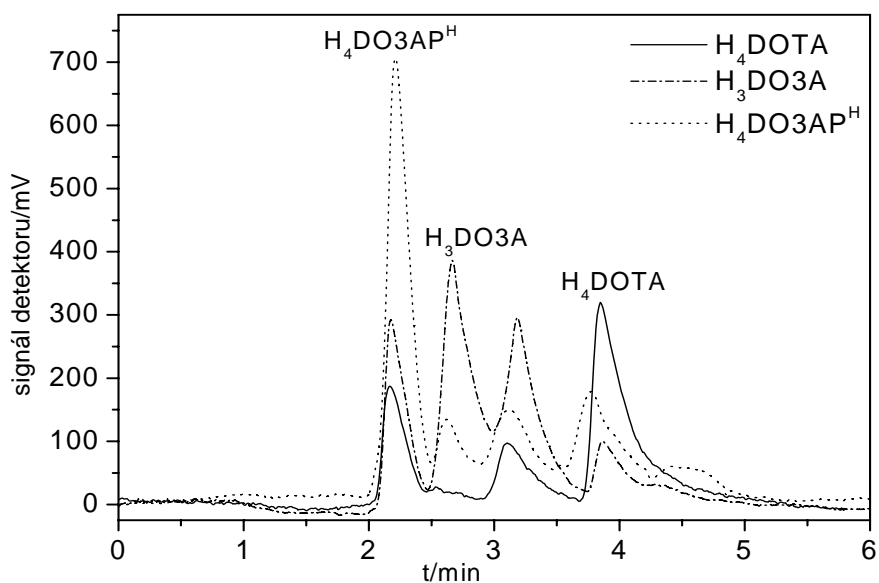
Úspěšné separace polykarboxylátových derivátů cyklenu se nakonec podařilo dosáhnout na pentafluorofenylpropylové stacionární fázi (Discovery HSF5). Na této koloně k separaci vedle hydrofobních a hydrofilních interakcí poměrně velkou měrou přispívá i tvorba vodíkových můstků. Z řady testovaných mobilních fází bylo nejlepších výsledků dosaženo při použití mobilní fáze methanol-voda (85:15). Problémem se ukázala být detekce, jelikož signál analyzovaných látek na UV detektoru byl velmi malý (viz. Obr. 4). Polykarboxylátové deriváty cyklenu totiž ve svých molekulách nemají žádný výrazný chromofor. Maximálně absorbují kolem 200 nm, což je bohužel oblast, ve které poměrně hodně absorbují i používané mobilní fáze.



Obr. 4: Chromatogramy látek H_4DOTA , H_3DO3A a H_4DO3AP^H (všechny o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) získané s použitím UV detekce při $\lambda = 200 \text{ nm}$.

Jedním z možných řešení problému detekce je použití bezkontaktního vodivostního detektoru (CCD), kterým je možné detegovat nabitě látky i ve velmi malých koncentracích. Tento detektor je již celkem běžně používán v kapilární zónové elektroforéze, ale pro HPLC zatím použit nebyl. Polykarboxylátové deriváty cyklenu jsou látky amfionické povahy, mající podle pH prostředí výsledný náboj od -4 do $+2$, což umožňuje jejich citlivou detekci bezkontaktním vodivostním detektorem. Nevýhodou CCD je, že signál nezávisí pouze na vodivosti analyzovaného roztoku, ale také na jeho permitivitě. Z tohoto důvodu i malá změna obsahu vody v mobilní fázi způsobuje velkou změnu signálu CCD, což vede např. k výrazným systémovým píkům.^{5,6}

Na Obr. 5 jsou chromatogramy analyzovaných látek při použití CCD. Díky větší citlivosti (signály analyzovaných látek byly zhruba třikrát větší než z UV detektoru) jsou navíc detekovatelné i nečistoty, např. v látce H_3DO3A je obsaženo malé množství H_4DOTA a látka H_4DO3AP^H obsahuje malé množství H_3DO3A . Tato metoda separace tak může sloužit ke sledování průběhu syntézy látky H_4DO3AP^H , která probíhá z H_4DOTA přes reakční meziprodukt H_3DO3A .



Obr. 5: Chromatogramy látek H_4DOTA , H_3DO3A a H_4DO3AP^H (všechny o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) získané s použitím CCD detekce.

Závěr

Bylo prokázáno, že HPLC je vhodná metoda pro separaci polykarboxylátových derivátů cyklu a byly nalezeny podmínky pro jejich dělení. Optimální mobilní fáze neobsahuje žádný pufr, tudíž umožňuje převést tuto metodu separace i do preparativního měřítka. Dále se potvrdilo, že CCD je výhodný pro detekci amfionických látek, pro málo absorbující látky předčí běžný UV detektor. Již nyní lze tuto metodu použít pro sledování průběhu syntézy H_4DO3AP^H .

Literatura

1. Desreux J. F.: *Inorg. Chem.* 19, 1319 (1980).
2. Dadabhoy A., Faulkner S.; Sammes P. G.: *J. Chem. Soc.- Perkin Trans.*, 2, 348 (2002)
3. Hermann a kol.: Nepublikované výsledky (2006)
4. Hoherčáková, Z., Opekar, F., Štulík, K.: *Electroanalysis* 17, 1924 (2005)
5. Kafková B., Bosáková Z., Tesařová E., Suchánková J., Coufal P., Štulík K.: *Chromatographia*, 56, 445 (2002)
6. Srbek J., Coufal P., Bosáková Z., Tesařová E.: *J. Sep. Sci.*, 28, 1263 (2005)