

UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Jana Lišková

Analytická studie redukce rhenistanu amonného vybranými redukčními
činnidly

Analytical study of reduction of ammonium perrhenate using selected
reduction agents

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Ivan Jelínek, CSc.

Konzultant: RNDr. Martin Štícha, Ph.D.

Praha, 2018

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem Analytická studie redukce rhenistanu amonného vybranými redukčními činidly vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

v Praze dne 31. srpna 2018

.....

podpis

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu diplomové práce panu doc. RNDr. Ivanovi Jelínkovi, CSc. za odborné vedení práce, za cenné rady a věcné připomínky a také za čas, který mi věnoval.

Dále bych chtěla poděkovat panu RNDr. Martinovi Štíchovi, Ph.D. a panu prof. RNDr. Františkovi Opekarovi, CSc. za jejich hodnotné rady a vstřícnost při konzultacích.

Abstrakt

Tato práce je zaměřena na studium redukce rhenistanu amonného méně častými redukčními činidly. Jako méně častá redukční činidla byla zvolena kyselina askorbová a acetylhydrazin. Redukce byly sledovány pomocí metody kapilární zónové elektroforézy a UV–VIS spektrometrie.

Měření proběhla v kyselém i bazickém prostředí. V případě metody kapilární zónové elektroforézy byl sledován úbytek plochy píku rhenistanu amonného po přidání redukčního činidla. U metody UV–VIS spektrometrie byla sledována míra absorpce rhenistanu amonného.

Dále byla sledována možnost posunu rovnováhy reakce ve prospěch produktů redukce vlivem přídavku komplexotvorného činidla. Jako ligand byl použit pyrogallol (benzen-1,2,3-triol). Jako redukční činidlo byl zvolen acetylhydrazin. Redukce byla sledována metodou kapilární zónové elektroforézy. Identita vzniklého komplexu byla potvrzena s pomocí ESI/MS.

Klíčová slova

rhenium, komplexní sloučeniny rhenia, kyselina askorbová, acetylhydrazin, kapilární zónová elektroforéza, UV–VIS spektrometrie, hmotnostní spektrometrie

Abstract

This thesis is focused on analysis of reduction of ammonium perrhenate using less frequent reducing agents. Ascorbic acid and acetylhydrazine were chosen as less common reducing agents. Reductions were observed leveraging capillary zone electrophoresis and UV/Vis spectroscopy.

Measurements were carried out both in acidic and in basic environments. Reduction of peak area of ammonium perrhenate was observed using capillary zone electrophoresis after addition of reducing agent. Rate of absorption of ammonium perrhenate was monitored with UV/Vis spectroscopy.

Furthermore, the possibility of shifting the equilibrium of the reaction to the benefit of the reduction products was monitored by the addition of the complexing agent. Pyrogallol (benzene-1,2,3-triol) was used as the ligand and acetylhydrazine was selected as the reducing agent. The reduction was monitored by capillary zone electrophoresis. The identity of the resulting complex was confirmed with ESI/MS.

Keywords

rhenium, rhenium complexes, ascorbic acid, acetylhydrazine, capillary zone electrophoresis, UV/Vis spectroscopy, mass spectrometry

Obsah

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Úvod | 4 |
| 2 | Teoretická část | 6 |
| 2.1 | Nukleární medicína | 6 |
| 2.1.1 | Radiofarmakum | 6 |
| 2.1.2 | Radionuklid | 6 |
| 2.2 | Rhenium | 7 |
| 2.2.1 | Výskyt a chemické vlastnosti rhenia | 7 |
| 2.2.2 | Příprava a využití radionuklidů rhenia | 7 |
| 2.2.3 | Komplexní sloučeniny rhenia | 7 |
| 2.3 | Kyselina askorbová | 8 |
| 2.3.1 | Chemické vlastnosti a struktura kyseliny askorbové | 8 |
| 2.3.2 | Farmakologické vlastnosti kyseliny askorbové | 9 |
| 2.4 | Hydrazin a acetylhydrazin | 10 |
| 2.4.1 | Chemické vlastnosti a struktura | 10 |
| 2.4.2 | Toxicita | 10 |
| 2.5 | Chemická kinetika | 11 |
| 2.6 | Metody separace a charakterizace rheniových komplexů | 13 |
| 2.6.1 | Kapilární zónová elektroforéza (CZE) | 13 |
| 2.6.2 | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) | 15 |
| 2.6.3 | Hmotnostní spektrometrie (MS) | 16 |
| 2.7 | Ostatní spektrální metody | 17 |
| 2.7.1 | UV–VIS spektrometrie | 17 |
| 2.7.2 | IČ spektrometrie | 19 |
| 2.7.3 | Nukleární magnetická rezonance (NMR) | 20 |
| 3 | Cíl diplomové práce | 22 |
| 4 | Experimentální část | 23 |
| 4.1 | Použité chemikálie | 23 |
| 4.2 | Použitá instrumentace a postupy | 23 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.2.1 | Postup měření redukce rhenistanu amonného | 24 |
| 4.3 | Zpracování kalibračních závislostí | 28 |
| 5 | Výsledky a diskuze | 29 |
| 5.1 | Měření redukce rhenistanu amonného s použitím kyseliny askorbové jako redukčního činidla | 29 |
| 5.1.1 | Pomocí metody kapilární zónové elektroforézy | 29 |
| 5.1.2 | Pomocí metody UV–VIS spektrometrie | 39 |
| 5.2 | Měření redukce rhenistanu amonného s použitím acetylhydrazinu jako redukčního činidla | 40 |
| 5.2.1 | Pomocí metody kapilární zónové elektroforézy | 40 |
| 5.3 | Charakterizace vybraných komplexů rhenia s organickými ligandy pomocí pokročilých instrumentálních analytických technik | 47 |
| 5.3.1 | Posun rovnováhy redukce rhenistanu amonného vlivem přídavku komplexotvorného činidla | 47 |
| 6 | Závěr | 50 |
| | Příloha A – Naměřená data | 56 |
| | Příloha B – Publikace | 60 |

Seznam použitých zkratek

| | |
|---------|---|
| APCI | chemická ionizace za atmosférického tlaku |
| APPI | fotonizace za atmosférického tlaku |
| CHES | kyselina 2-(cyklohexylamino)ethansulfonová |
| CZE | kapilární zónová elektroforéza |
| DHA | kyselina dehydroaskorbová |
| DMF | dimethylformamid |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| DTGS | deuterovaný triglycinsulfát |
| ELSD | odpařovací detektor rozptylu světla (z anglického evaporative light scattering detector) |
| EOF | elektroosmotický tok (z anglického electroosmotic flow) |
| ESI/MS | hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací |
| FIR | vzdálená infračervená spektroskopie (z anglického far infrared) |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| HPMC | hydroxypropyl methylcelulóza |
| HVLP | hromadně vyráběný léčivý přípravek |
| IPLP | individuálně připravovaný léčivý přípravek |
| L-AA | kyselina L-askorbová |
| MALDI | ionizace laserem za účasti matrice (z anglického matrix-assisted laser desorption/ionization) |
| MDHA | monodehydroaskorbátový radikál |
| MIR | střední infračervená spektroskopie (z anglického middle infrared) |
| MRI | magnetická rezonance (z anglického magnetic resonance imaging) |
| MS | hmotnostní spektrometrie |
| NIR | blízká infračervená spektroskopie (z anglického near infrared) |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| NP-HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie na normálních fázích |
| RP-HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácených (reverzních) fázích |
| SÚKL | Státní ústav pro kontrolu léčiv |
| TGS | triglycinsulfát |
| TOF | průletový analyzátor (z anglického Time-of-Flight) |
| TRIS | tris(hydroxymethyl)aminomethan |

1 Úvod

Využití radiofarmak v nukleární medicíně má dnes nezastupitelnou roli. V poslední době je snaha zavést pro léčbu maligních a degenerativních onemocnění dva izotopy rhenia. Izotop ^{186}Re ($E_{max} = 1,07 \text{ MeV}$, $t_{1/2} = 90 \text{ h}$), který je užitečný pro podání s větším nosičem (např. celé protilátky), a ^{188}Re ($E_{max} = 2,12 \text{ MeV}$, $t_{1/2} = 17 \text{ h}$), který je vhodný pro podávání s malými molekulami, jako jsou fragmenty protilátek, peptidy atd. [1, 2]

Komplexy označené ^{186}Re a ^{188}Re byly vyvinuty pro radioterapeutickou léčbu onemocnění kvůli žádoucím nukleárním vlastnostem těchto radioizotopů a také protože rhenium má podobné chemické vlastnosti jako technecium, které je dobře zavedeným diagnostickým činidlem. Nicméně, chemie rhenia není tolik prozkoumaná jako chemie technecia a také je od chemie technecia poměrně odlišná. Vývoj radiofarmak Re tedy není založen na známém chemickém a biologickém chování rhenia, tak jako je tomu u radiofarmak technecia ^{99m}Tc . Chemické rozdíly zahrnují větší stabilitu vyšších oxidačních stavů Re (a tím i větší tendenci redukovaných radiofarmak Re podstupovat reoxidaci na perrhenát) a větší substituční inertnost redukovaných Re komplexů. [1, 2]

Dalším důvodem pro vývoj těchto komplexů byl vývoj generátoru $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, který se ukázal jako vhodný a ekonomický zdroj terapeutického radionuklidu. Zejména dostupnost tohoto generátoru činí ^{188}Re jedním z nejvíce slibných kandidátů na vývoj radiofarmak pro použití v radioterapii. Navzdory rozšiřující se dostupnosti tohoto generátoru, nemůže být produkce rheniových radiofarmak realizována bez nové, jednoduché a účinné chemie na bázi kitu pro zabudování radionuklidu do biologických zaměřovacích molekul. Nejvýznamnější dosud uváděné přístupy zahrnují přímé označování protilátek a peptidů za použití redukovaných cystinových vazeb jako rhenium-chelatační skupiny a různé bifunkční chelatační činidla. Žádný z nich ještě plně nesplňuje kritéria pro ideální robustní sestavu. Mezi tato kritéria patří rychlá, čistá, vysoká radiochemická výtěžnost za mírných podmínek s minimální potřebou ruční manipulace a čištění, a vysokou stabilitou in vivo. [3, 4, 5].

Sloučeniny, které mají být označeny rheniem, se obvykle připravují redukcí rhenia v perrhenátové formě na nižší oxidační stupeň v přítomnosti vybraného ligandu. Pro zlepšení stability komplexů vytvořených reakcí redukovaného rhenia s ligandem je často nutné přidat ke směsi antioxidant, např. kyselinu askorbovou. [6]

Nejpoužívanějším redukčním činidlem je chlorid cínatý, dalšími běžně používanými redukčními činidly jsou borohydrid sodný, hydroxylamin hydrochlorid nebo hydrazin hydrochlorid. Tato redukční činidla jsou však vysoce toxická, proto je dnes snaha zavést v nukleární medicíně taková redukční činidla, která by byla pokud možno co nejméně toxická a zároveň stejně účinná jako dosud používaná redukční činidla. Proto byly v této práci zkoumány kyselina askorbová a acetylhydrazin. [6, 7]

Pro analýzu rheniových radiofarmak, zejména pro stanovení radiochemického výnosu komplexace, byla běžně používána tenkovrstvá chromatografie s radiometrickou detekcí. Nicméně tato metoda není vhodná ani pro separaci značených komplexů podobného charakteru, ani pro stanovení fyzikálně-chemických konstant komplexních sloučenin. Pro tento účel byly úspěšně aplikovány elektromigrační metody (obvykle kapilární elektroforéza) při studiu komplexů rhenia a technecia. [6].

Publikace 1 v příloze B se věnovala experimentu, při němž byl syntetizován rheniový komplex reakcí rheniového prekursoru s pyrogallolem (benzen-1,2,3-triol) v acetonitrilu (methylcyanid) s přídavkem triethylaminu. Hlavní části reakční směsi (rhenistan, pyrogallol, rhenium(VII)-pyrogallolový komplex) byly detegovány pomocí kapilární zónové elektroforézy s UV-VIS detekcí. Jako nosné elektrolyty v CZE byly použity borátový pufr (pH 6,20–11,60) a fosfátový pufr (pH 7,50–11,80). Cílem bylo zjistit chování reakční směsi v prostředích s různým pH. Měření závislosti efektivní elektroforetické mobility na pH ukázalo, že rhenium(VII)-pyrogallolový komplex se chová konstantně v borátovém i fosfátovém pufru. To potvrdilo, že rheniový komplex má charakter silného elektrolytu.

Problematicke redukce rhenistanu amonného s pomocí voltametrických metod byla věnována bakalářská práce *Studium faktorů ovlivňujících redukcí rhenistanu*. [7]

2 Teoretická část

2.1 Nukleární medicína

Nukleární medicína je samostatným lékařským oborem, který se zabývá použitím radiofarmak k diagnostickým a terapeutickým účelům. [8]

2.1.1 Radiofarmakum

Radiofarmakum je jakýkoliv léčivý přípravek, který obsahuje jeden nebo více radionuklidů (radioaktivních izotopů), které slouží k lékařským účelům.

Radiofarmaka patří do skupiny léčiv, při jejichž výrobě, přípravě, manipulaci a používání je nutno dbát zvláštních požadavků, které nejsou běžné u jiných léčiv.

Základními složkami radiofarmak jsou nosič a účinná složka. Léčivý přípravek = účinná složka. [9]

2.1.2 Radionuklid

V nukleární medicíně se využívají pouze radionuklidy uměle připravené.

Radionuklid je navázán na vhodný nosič (farmakum). Používají se různé druhy nosičů, mohou to být chemické či biologicky aktivní látky od organických solí po molekuly organických látek a komplexních solí, buňky, krevní elementy, protilátky, peptidy, imunoglobuliny.

Množství použitého radionuklidu se vlivem radioaktivní přeměny exponenciálně snižuje s časem. Z toho vyplývá, že u radiofarmak je, oproti jiným léčivům, obsah látky nesoucí vlastní účinek přípravku v čase proměnlivý.

Důležitými vlastnostmi radionuklidu je doba, za kterou se sníží jeho aktivita na polovinu (poločas přeměny), druh a energie ionizujícího záření.

K výrobě klinických radiofarmak, zejména k diagnostickým účelům, se používají radionuklidy s krátkým poločasem přeměny, proto jejich individuální příprava (IPLP) probíhá přímo na klinickém pracovišti v laboratořích k tomu určených.

Radiofarmaka s delším poločasem přeměny se vyrábějí jako hromadně vyráběný léčivý přípravek (HVLP). [9]

2.2 Rhenium

2.2.1 Výskyt a chemické vlastnosti rhenia

Elementární rhenium bylo objeveno v roce 1925 (Idou a Walterem Noddackovými) a je jedním z nejvzácnějších prvků, který se vyskytuje přirozeně jako směs dvou neradioaktivních (stabilních) izotopů ^{185}Re (37,4%) a ^{187}Re (62,6%).

Radioaktivní izotopy, které se využívají ve farmacii pro přípravu radiofarmak, jsou ^{186}Re a ^{188}Re . [10]

Rhenium se ve sloučeninách vyskytuje ve všech oxidačních stavech, nejstabilnější a nejsnadněji přístupné jsou (VII), (V), a (I).

2.2.2 Příprava a využití radionuklidů rhenia

Radioizotopy ^{186}Re a ^{188}Re mají svou nezastupitelnou roli v radioterapii díky vhodným jaderným vlastnostem a chemické podobnosti s techneciem.

Produkce ^{186}Re může být provedena dvěma způsoby: jedna za použití reakce ^{185}Re (n, γ) ^{186}Re v jaderném reaktoru a druhá za použití reakce ^{186}W (p, n) ^{186}Re .

Z hlediska specifické aktivity je první metoda použitelná, jestliže je k dispozici jaderný reaktor s vysokým tokem, druhý způsob je proveditelný za předpokladu, že máme k dispozici cyklotron. ^{188}Re je snadno dostupné z generátoru radionuklidového systému $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, který je vhodný pro klinické účely použití. [3, 4]

Použití rheniových radioizotopů při léčbě rakoviny (a jiných onemocnění) v současné době dosáhlo pokročilé fáze. [11]

2.2.3 Komplexní sloučeniny rhenia

Komplexy rhenia se běžně připravují z rhenistanu ReO_4^- avšak v tomto oxidačním stavu rhenium není schopno tvořit komplexy. Z tohoto důvodu je nejprve potřeba rhenium zredukovat na některý z nižších oxidačních stavů a poté jej stabilizovat pomocí vhodného ligandu.

Příprava rheniových radiofarmak z perrhenátových iontů získaných z různých nuklidových generátorů (^{188}Re) nebo z cílů ozářených reaktorem (^{186}Re) je velmi podobná. Ve všech případech musí být kovové ionty redukovány vhodným redukčním činidlem a koordinovány ligandovými systémy, které stabilizují nižší oxidační stavy kovů a významně

určují vzorce biologických distribucí léčiv. Takové postupy se běžně provádějí v takzvaných „instant kits“, to znamená, že se do předem připravených směsí odpovídajících ligandů, redukčních činidel, stabilizátorů a katalyzátorů přidá vhodné množství radioaktivních roztoků $^{186}\text{ReO}_4^-$ nebo $^{188}\text{ReO}_4^-$. [4, 2]

Tento typ reakce musí být optimalizován a očekávané výtěžky a čistota produktů by měly být reprodukovatelné na $>95\%$. Výsledná léčiva by měla být připravena k injekci po kontrole kvality chromatografií, přednostně bez dalších purifikačních kroků.

Pátrání po komplexech rhenia s požadovanými distribucemi in vivo a vývoj vhodných „kitů podobných“ syntetických postupů vyžaduje přesné znalosti chemie těchto přechodných kovů. To zahrnuje základní chování a redox chování, stejně jako koordinační chemii s biologicky relevantními ligandy. [4]

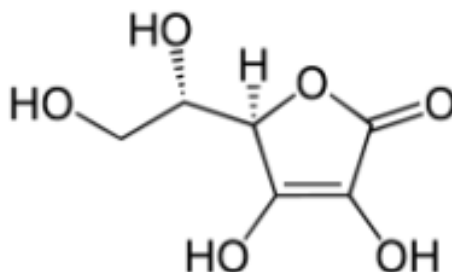
2.3 Kyselina askorbová

2.3.1 Chemické vlastnosti a struktura kyseliny askorbové

Kyselina L-askorbová (L-AA, vitamin C), je ve vodě rozpustná látka se silně redukčními účinky. Člověk si ji nedokáže syntetizovat sám, protože postrádá L-gulonolaktonoxidázovou aktivitu, musí ji tedy přijímat z potravy a to zejména z citrusových plodů, brokolice a rajčat. [12]

L-AA je nestálá látka, rychle se rozkládá a ztrácí účinnost. Rozklad kyseliny askorbové urychluje světlo, teplo, vzdušný kyslík a styk s některými kovy, zejména s mědí a železem. [13, 14]

Na obrázku 1 je znázorněna chemická struktura kyseliny askorbové.

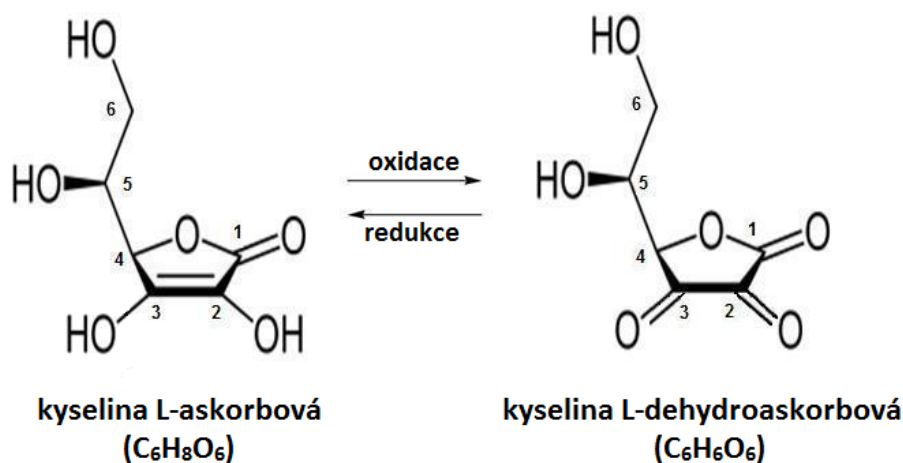


Obrázek 1: Chemická struktura L-AA. Převzato z [14].

Oxidací kyseliny askorbové nejprve vzniká monodehydroaskorbátový radikál - MDHA. Z monodehydroaskorbátového radikálu se tvoří kyselina askorbová a kyselina dehydroaskorbová.

Kyselina dehydroaskorbová - DHA (produkt oxidace kyseliny askorbové) - je nestabilní při fyziologickém pH, takže je většina askorbátu udržována v redukovaném stavu jako ochrana před jeho ztrátami. [15]

Na obrázku 2 je uvedena oxidace kyseliny askorbové.



Obrázek 2: Oxidace kyseliny askorbové. Převzato z [15], upraveno.

2.3.2 Farmakologické vlastnosti kyseliny askorbové

Farmakologické vlastnosti kyseliny askorbové, uvedené v příbalovém letáku léčiva acidum ascorbicum biotika, jsou:

“Kyselina askorbová se účastní oxidačně–redukčních, hydroxylačných, amidačních a jiných reakcí v organismu.

Je důležitá v metabolismu kostí a pojivových tkání, protože se podílí na syntéze kolagenu a na inkorporaci sulfátu do mukopolysacharidů.

Má cytotoxické účinky na rakovinné buňky, přičemž pravděpodobným mechanismem účinku je aktivace DNA–ázy a destrukce DNA případně prooxidační účinek v těchto rakovinných buňkách deficientních na katalázu.” [16]

2.4 Hydrazin a acetylhydrazin

2.4.1 Chemické vlastnosti a struktura

Hydrazin ($\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$; $M_m = 32.05 \text{ g/mol}$) je bezbarvá, olejovitá, toxická kapalina, která má teplotu varu $13,5 \text{ }^\circ\text{C}$ a má podobný zápach jako čpavek. [17]

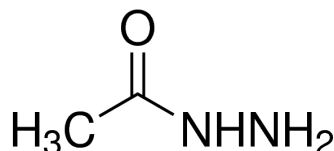
Hydrazin se rychle vstřebává inhalačně a perkutánně. Vylučuje se močí, primárně ve své monoacetylované a diacetylované formě. Akumulace hydrazinu nebyla dosud u lidí pozorována. [17]

Hydrazin a jeho deriváty jsou převážně meziprodukty ve výrobě herbicidů a farmaceutických produktů. Používají se jako pěnové látky při výrobě pěnových plastů a rovněž dokáží zabránit korozi v zařízeních na výrobu páry. [17]

Acetylhydraziny (acetylhydrazidy) jsou typy hydrazinů. Patří do třídy organických sloučenin a mohou být považovány za deriváty dusíku karboxylových kyselin, které mají obecnou strukturu $\text{R}-\text{CO}-\text{NR}^1-\text{NR}^2\text{R}^3$, kde R^1 , R^2 a R^3 mohou být organické zbytky nebo vodík. Jsou analogické s amidem, ale $-\text{OH}$ část karboxylové kyseliny je nahrazena hydrazinem spíše než amoniakem (méně vodíku v místě připojení). [18]

Acetylhydrazin se používá jako antibiotikum pro léčbu mykobakterií tuberkulózy. [17]

Na obrázku 3 je znázorněna chemická struktura acetylhydrazinu.



Obrázek 3: Chemická struktura acetylhydrazinu. Převzato z [18].

2.4.2 Toxicita

Hydrazin je toxický při požití, vdechování a při styku s pokožkou těla. Po perorálním podání hydrazinu a v závislosti na použité dávce, mohou nastat u člověka symptomy, jako jsou bolest hlavy, závratě, nevolnost se zvracením, poškození svalové koordinace, ospalost, porucha smyslů, poruchy dýchacího a srdečního rytmu a ztráta vědomí. [17]

Po vystavení člověka působení páry hydrazinu byly vypořádány symptomy jako nevolnost se zvracením, lokální podráždění očí (zejména spojivky) a podráždění sliznice horních cest dýchacích, což vede k dýchacím potížím. [17]

U osob, které byly dlouhodobě vystaveny působení hydrazinu, nebyla prokázána zvýšená incidence nádorů. [17]

Acetylhydrazin vzniká hydrolýzou isoniazidu při katalýze amidázou. Isoniazid je lék proti tuberkulóze, který může u 20 % pacientů způsobit hepatotoxicitu, což je obvykle spojeno se zánětlivou odpovědí. Jedním z kroků patogeneze hepatického poškození vyvolaného isoniazidem je metabolická aktivace acetylhydrazinu, která je závislá na cytochromu P450. [19]

Tvorba acetylhydrazinu, schopného produkovat aktivní elektrofilu napadající DNA, je pravděpodobně zahrnuta v mechanismu účinku acetylfosfabenzidu. [19]

Bylo zjištěno, že acetylhydrazin je mnohem méně cytotoxický než hydrazin. [19]

2.5 Chemická kinetika

Chemická kinetika se zabývá rychlostí chemických reakcí, výpočtem složení v závislosti na čase a reakčními mechanismy.

Reakce se zpravidla provádějí izotermicky pro zajištění reprodukovatelnosti a specifčnosti. Aby reakce mohla proběhnout, musí být překonána tzv. aktivační energie, k tomu jsou používány katalyzátory a vyšší teplota. [20]

Kinetická (rychlostní) rovnice

Rychlostní rovnice umožňuje předpovědět rychlost reakce na základě znalosti hodnoty rychlostní konstanty a složení reakční směsi. Konečný tvar rychlostní rovnice umožňuje provádět klasifikaci reakcí podle reakčního řádu. Jednoduchá reakce je dána jednou reakcí a jednou kinetickou rovnicí. [20, 21] Obecně:

$$r = f(c_A, c_B, \dots; T) \quad (1)$$

Často vyhovuje zjednodušený zápis

$$r = k(T) \cdot c_A^\alpha \cdot c_B^\beta \dots \quad (2)$$

kde k je rychlostní (kinetická) konstanta, která je závislá na teplotě T , α a β jsou dílčí řády a $n = \alpha + \beta \dots$ je (celkový) řád reakce. Rozměr rychlostní konstanty je $(\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3})^{1-n} \cdot \text{s}^{-1}$.

Poločas reakce je taková doba $t_{1/2}$, za kterou klesne koncentrace c látky A na polovinu.

$$c_A(t_{1/2}) = \frac{c_A(0)}{2} \quad (3)$$

Jednoduchá reakce

Nejjednodušší typ reakce je reakce jedné látky na produkt:



Koncentrace látky A v čase t je dána rovnicí 8, která se odvodí dosazením do rovnice 2.

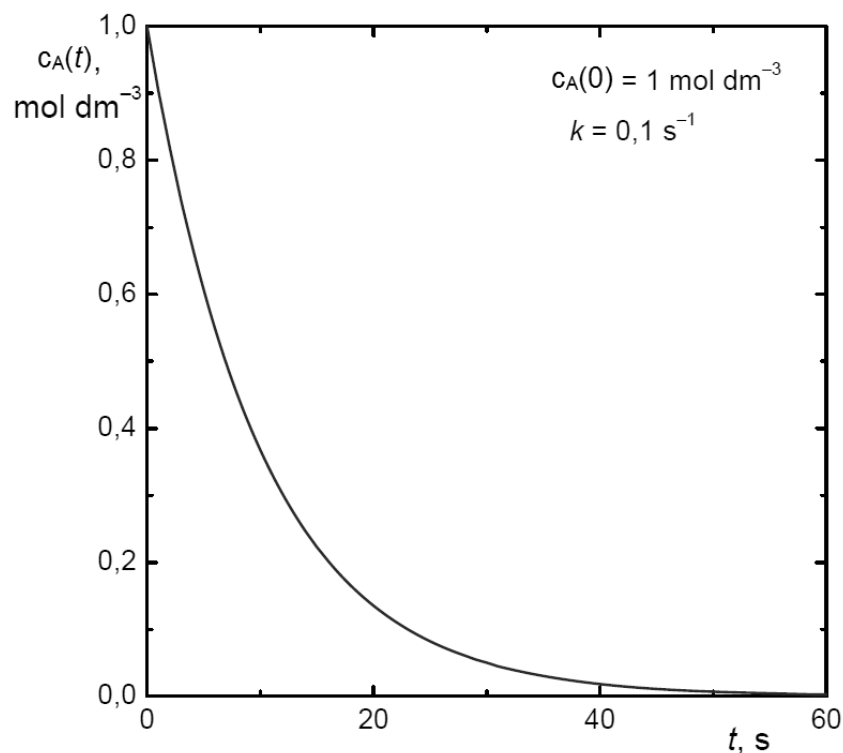
$$r = k(T) \cdot c_A(t) \quad (5)$$

$$-\frac{dc_A}{dt} = k(T) \cdot c_A(t) \quad (6)$$

$$\ln \frac{c_A(0)}{c_A(t)} = k(T) \cdot t \quad (7)$$

$$c_A(t) = c_A(0) \cdot e^{-k(T) \cdot t} \quad (8)$$

Graficky znázorněno na obrázku 4.



Obrázek 4: Kinetika prvního řádu. Převzato z [22], upraveno.

2.6 Metody separace a charakterizace rheniových komplexů

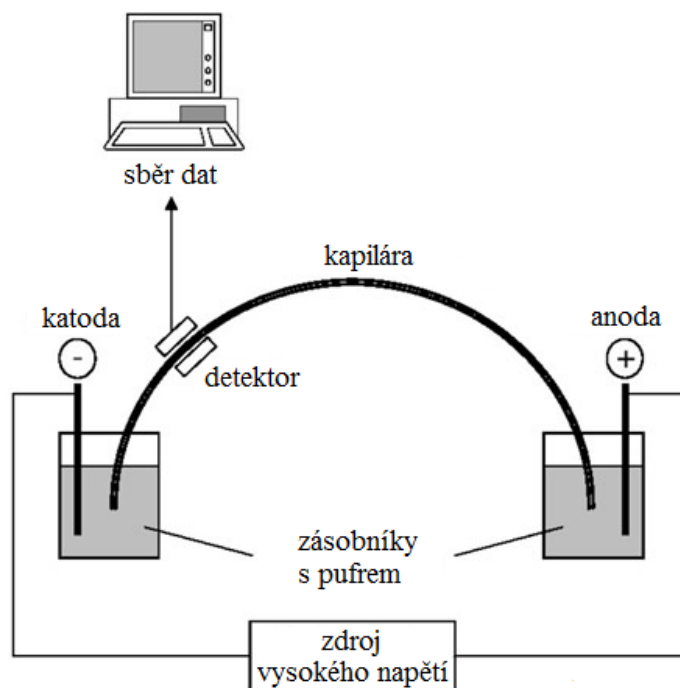
2.6.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza (CZE; z anglického capillary zone electrophoresis) je analytická technika, která odděluje ionty na základě jejich elektroforetické mobility s použitím aplikovaného napětí. [23]

Elektroforetická mobilita závisí na náboji molekuly, viskozitě základního elementu a poloměru atomu. Rychlost, s jakou se částice pohybuje, je přímo úměrná použitému elektrickému poli - čím větší je intenzita pole, tím rychlejší je mobilita. Elektrickým polem se pohybují pouze nabitě částice, neutrální částice nejsou ovlivněny a pohybují se s elektroosmotickým tokem. Menší částice s větším nábojem se pohybují v kapiláře rychleji než větší částice s menším nábojem. [23]

Kapilární elektroforéza je jednou z nejčastěji používaných separačních metod v analytické chemii, protože poskytuje rychlejší výsledky oproti jiným separačním metodám používaných v analytické chemii a poskytuje oddělení s vysokým rozlišením. Jedná se o užitečnou techniku, protože je k dispozici široká škála detekčních metod. [23]

Na obrázku 5 je uvedeno schéma principu kapilární zónové elektroforézy.



Obrázek 5: Schéma kapilární zónové elektroforézy. Převzato z [23], upraveno.

Elektroforetická mobilita

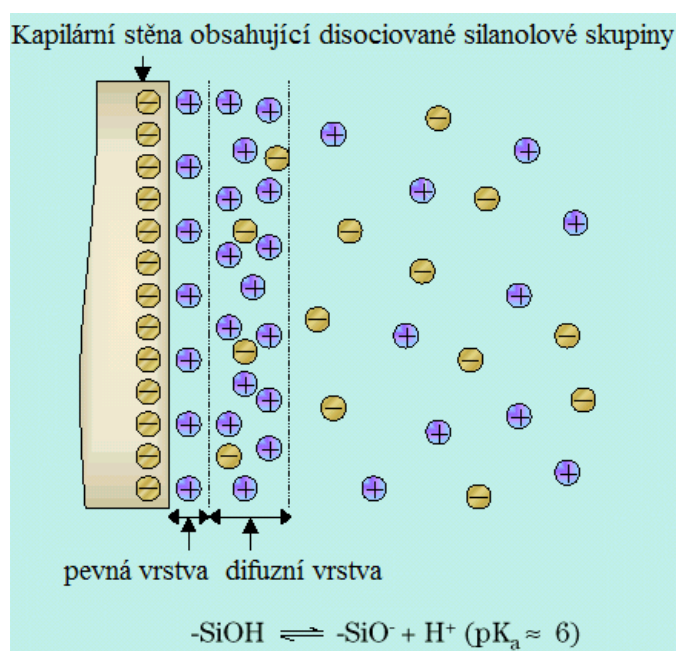
Elektroforetická mobilita je děj, při kterém se ionty vzorků pohybují pod vlivem aplikovaného napětí. Kationty se pohybují směrem k záporně nabitě katodě, anionty se pohybují směrem ke kladně nabitě anodě a neutrální druhy zůstávají zachyceny ve stacionární fázi. [24]

Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF) je pohyb pufu kapilárou směrem ke katodě v důsledku aplikovaného elektrického pole.

K elektroosmotickému toku dochází, protože stěny kapilárních trubek jsou elektricky nabitě. Povrch křemenné kapiláry obsahuje velké množství silanolových skupin ($-\text{SiOH}$). Při hodnotách pH vyšších než 4 silanolové skupiny ionizují za vzniku negativně nabitých silanátových iontů ($-\text{SiO}^-$).

Na obrázku 6 je uvedeno schéma elektroosmotického toku. Kationty z pufu jsou přitahovány silanátovými ionty, některé z těchto kationtů se pevně váží na silanátové ionty a tvoří pevnou vrstvu. Vzhledem k tomu, že kationty v pevné vrstvě pouze částečně neutralizují negativní náboj na stěnách kapilár, roztok přiléhající k pevné vrstvě se nazývá difuzní vrstva a obsahuje více kationtů než aniontů.



Obrázek 6: Schéma elektroosmotického toku. Převzato z [25], upraveno.

Společně jsou tyto dvě vrstvy známé jako dvojitá vrstva. Solvované kationty v difuzní vrstvě migrují směrem ke katodě, čímž vzniká elektroosmotický tok.

Anionty v difuzní vrstvě, které jsou také rozpuštěné, se pokoušejí přesunout směrem k anodě. Protože je kationtů více než aniontů, elektroosmotický tok se pohybuje ve směru katody. [24, 26]

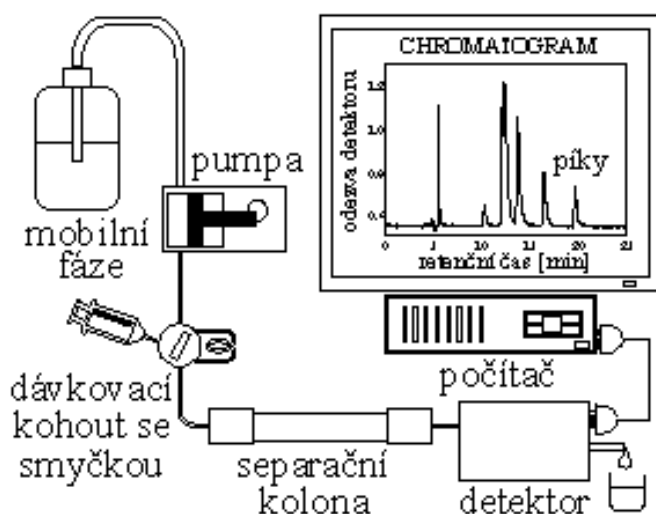
2.6.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC; z anglického high performance liquid chromatography) je v podstatě vylepšená forma sloupcové chromatografie. Namísto toho, aby rozpouštědlo procházelo kolonou pod gravitací jako je tomu u sloupcové chromatografie, u HPLC je rozpouštědlo vytlačováno z rezervoáru za vysokých tlaků až do 400 atmosfér, což je mnohem rychlejší.

Další významné zlepšení oproti sloupcové chromatografii se týká detekčních metod, které lze použít. Nejčastěji se využívají detektory – refraktometrický, UV, fluorimetrický, transportní, MS a ELSD¹ detektor. Tyto metody jsou vysoce automatizované a velmi citlivé. [27, 28]

Principiálně rozlišujeme dva druhy HPLC – kapalinovou chromatografii na normálních fázích (NP–HPLC) a kapalinovou chromatografii na obrácených (reverzních) fázích (RP–HPLC).

Na obrázku 7 je uvedeno schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie.



Obrázek 7: Schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Převzato z [29].

¹z anglického evaporative light scattering detector, odpařovací detektor rozptylu světla

2.6.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je destruktivní analytická technika, která se používá k identifikaci neznámých sloučenin ve vzorku a pro objasnění struktury a chemických vlastností různých molekul.

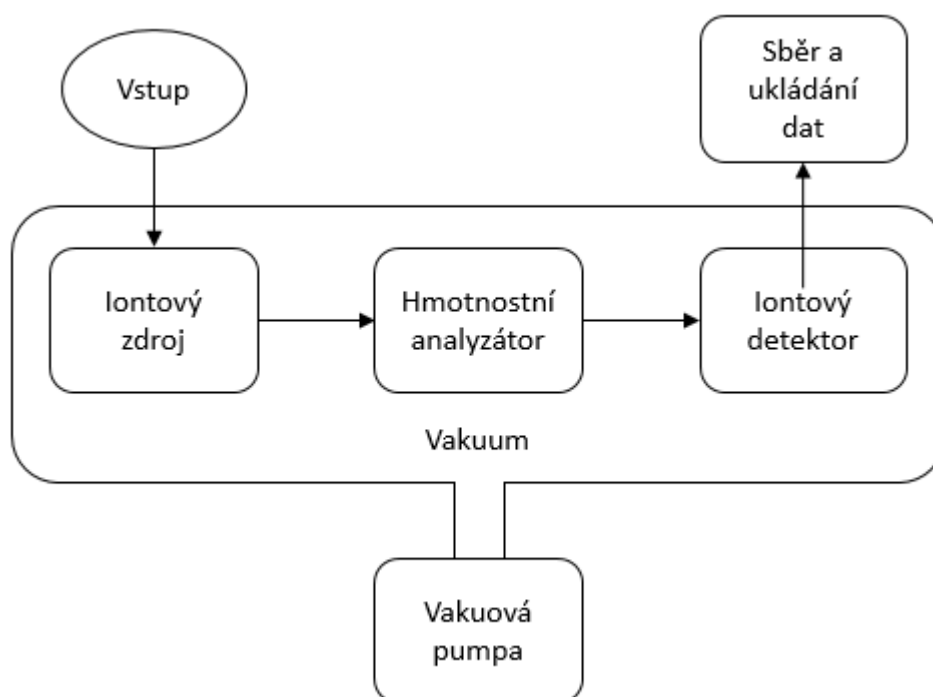
Principem hmotnostního spektrometru je generace iontů ze zkoumaného vzorku, které se poté detegují podle jejich specifického poměru hmotnosti k náboji (m/z) a pak se zaznamenává relativní hustota každého iontu. [30, 31]

Základní části hmotnostního spektrometru

Hmotnostní spektrometr je složen ze tří základních částí – iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru iontů. Všechny tyto části jsou většinou uzavřené ve vysokém vakuu.

Dalšími částmi hmotnostního spektrometru jsou – vakuový systém, zařízení pro zavádění vzorků (sonda), iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů, počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr a ukládání dat. [30]

Na obrázku 8 je znázorněno schéma hmotnostního spektrometru.



Obrázek 8: Schéma hmotnostního spektrometru.

- Iontový zdroj

Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (tzv. ionizace), které jsou dále analyzovány hmotnostním analyzátozem. Konstrukce iontového zdroje se liší podle použité ionizační techniky.

Nejpoužívanějšími ionizačními technikami jsou – ESI (ionizace elektrosprejem), APPI (fotonizace za atmosférického tlaku), APCI (chemická ionizace za atmosférického tlaku). [30]

- Hmotnostní analyzátozem

Hmotnostní analyzátozem slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vakua podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Tohoto rozdělení iontů podle poměru m/z lze dosáhnout s využitím různých fyzikálních principů.

Nejběžněji používanými analyzátozem v hmotnostní spektrometrii jsou – magnetický analyzátozem, průletový analyzátozem (Time-of-Flight, TOF), sektorový analyzátozem s dvojí fokusací, kvadrupólový analyzátozem, iontová past, orbitrap. [30]

- Iontový detektor

Iontový detektor slouží k detekci iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů.

Detegovat ionty lze pomocí Faradayovy klece, elektronového násobiče či fotonásobiče. [30]

2.7 Ostatní spektrální metody

2.7.1 UV–VIS spektrometrie

UV–VIS spektrometrie je analytická metoda, která se zabývá měřením a interpretací elektronových spekter molekul látek, které absorbují elektromagnetické záření v oblasti vlnových délek 200 až 800 nm. [32]

Pokud látky absorbují záření s vlnovou délkou menší než 380 nm, jedná se o ultrafialové záření, které se jeví lidskému oku jako bezbarvé. Oblast viditelného světla se nachází v rozsahu vlnových délek 380 až 770 nm. Látky, které se nacházejí v této oblasti, se jeví lidskému oku jako barevné. [32, 33]

Oblast záření s vlnovou délkou menší než 200 nm se nazývá vakuová ultrafialová oblast. Záření v této oblasti je pohlcováno vzduchem, proto je pro sledování absorpce nutné použít speciální evakuovanou aparaturu. [32, 33]

Měření absorpce v oblasti UV–VIS spektra je možné pomocí různých typů přístrojů, které mají různé přístrojové vybavení a tedy i různé způsoby měření:

1. kolorimetrie – je jednou z nejstarších metod měření absorpce světla, využívající jen viditelné oblasti spektra. Detekce se provádí okem. [32]
2. fotometrie – také využívá jen viditelné oblasti spektra. Podle způsobu detekce se dělí na subjektivní, kde detektorem je oko, a objektivní, u které se detekce provádí fotoelektricky. [32]
3. spektrofotometrie – umožňuje získat spektra ve viditelné i ultrafialové oblasti. Z primárního zdroje se získává monochromatické záření pomocí monochromátorů. Detekce záření je objektivní. [32]

Principem spektrofotometru je ozařování roztoku v kvytě monochromatickým světlem, které je molekulou analytu absorbováno. Na detektor záření dopadá roztokem neabsorbované záření, jehož intenzita je v detektoru měřena. [33]

Na obrázku 8 je znázorněno schéma spektrofotometru.



Obrázek 9: Schéma spektrofotometru. Převzato z [34], upraveno.

2.7.2 IČ spektrometrie

Infračervená spektrometrie je analytická metoda, která se zabývá měřením a vyhodnocováním absorpčních spekter molekul, které absorbují záření v oblasti vlnových délek 800 nm – 100 μ m. [32]

Podle vlnových délek záření rozlišujeme infračervenou spektroskopii na blízkou (NIR, z anglického near infrared) – 800 až 2500 nm, střední (MIR, z anglického middle infrared) – 2,5 až 50 μ m a vzdálenou (FIR, z anglického far infrared) – 50 až 100 μ m. [32]

Při působení záření v NIR a MIR oblasti dochází k rotačně vibračním přechodům, v jejichž důsledku se mění rotační i vibrační stav molekuly. Záření v oblasti FIR vyvolává změnu rotačních stavů molekul, u nichž je malá potřeba energie. [32, 35]

Principem IČ spektrometrie je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem. Při absorpci dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly, v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. [36, 37]

Pro měření infračervených spekter se používají dva různé přístroje – disperzní a ne-disperzní spektrometr. [32, 35]

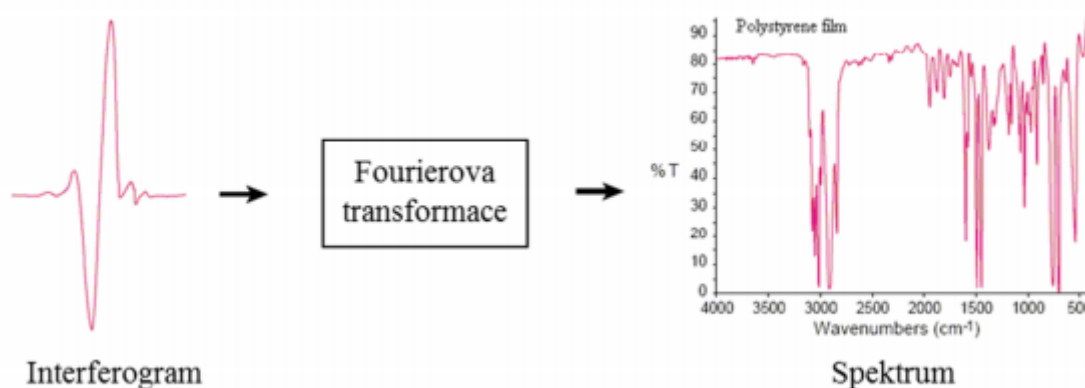
IČ spektroskopie má využití převážně v kvalitativní analýze, ale lze ji také použít ke kvantitativní analýze. Na rozdíl od UV–VIS spektrometrie, IČ spektrometrie má velký význam pro identifikaci organických a v menším měřítku i anorganických sloučenin. [38]

Spektrum v IČ oblasti je velmi dobrým nástrojem kvalitativní analýzy, protože umožňuje poměrně dobrou identifikaci látek na základě hledání charakteristických funkčních skupin a porovnání části spektra spadající do oblasti fingerprintu. [38]

Pro čisté látky nebo jednoduché směsi je identifikace nejspolehlivější. Výsledky IČ analýzy je však nutné kombinovat i s jinými metodami jako například s hmotnostní spektrometrií, UV–VIS spektrometrií nebo s magnetickou rezonancí. [38]

Pokud chceme dosáhnout kvantitativního vyhodnocení vzorku, musí se ze spektra měřené látky separovat jednoznačný a dostatečně intenzivní absorpční pás. Pro IČ spektra jsou charakteristické úzké pásy, užší než při UV–VIS spektrometrii. Pro odečet absorbancí (transmitancí) se používá metoda základní linie. Závislost mezi absorbancí a koncentrací stanovované látky udává Lambert–Beerův zákon. [38]

Získaný signál se převede matematickou operací, Fourierovou transformací, na infračervené spektrum. [32, 35] Na obrázku 10 je znázorněna Fourierova transformace interferogramu na infračervené spektrum.

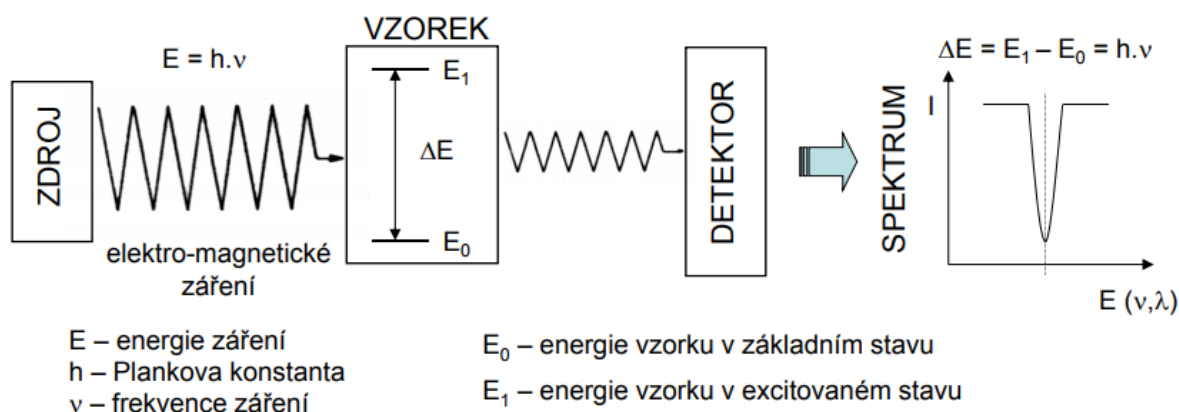


Obrázek 10: Fourierova transformace interferogramu na infračervené spektrum. Převzato z [38].

2.7.3 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Nukleární magnetická rezonance je jednou z nejsložitějších analytických a zobrazovacích metod, které se využívají v praxi. Jedná se o spektroskopickou metodu založenou na měření absorpce elektromagnetického záření (rádiové frekvence asi od 4 do 900 MHz). Na rozdíl od UV–VIS a IR absorpce nejsou do tohoto procesu zahrnuty vnější elektrony, ale jádra atomů.

Principem NMR je interakce jader s nenulovým magnetickým spinem s vysokofrekvenčním elektromagnetickým vlněním. Absorbované záření způsobuje přechody mezi energetickými stavy vzniklými rozštěpením jednoduchých stavů s nenulovým spinem v magnetickém poli. Na obrázku 11 je znázorněn princip NMR spektroskopie. [39]



Obrázek 11: Princip NMR spektroskopie. Převzato z [39].

NMR lze aplikovat pouze na atomy, jejichž jádro má spinový moment, tj. pouze na atomy, jejichž jádra mají lichý počet protonů nebo neutronů. [39]

Jelikož lokální magnetické pole je ovlivněno okolím atomu, lze tak studovat vlastnosti okolí sondujícího atomu. [39]

Tato metoda je v analytické chemii vhodná zvláště pro studium struktury uspořádání molekul ve vzorku. Interpretací NMR spekter je možné identifikovat známé látky, potvrdit struktury produktů, kvantifikovat složení směsi, studovat dynamické procesy, určovat struktury neznámých látek, určovat sekundární, terciární a kvartérní struktury biomakromolekul. [39]

MRI (magnetická rezonance) je zobrazovací lékařská technika, která je založena na NMR. MRI se stala základem lékařské diagnostiky. Jedná se o neinvazivní a nedestruktivní diagnostický nástroj pro zobrazování měkkých tkání jako je mozek, srdce a další svaly a pro objevení nádorů v mnoha orgánech.

3 Cíl diplomové práce

Cílem této diplomové práce je využití CZE a UV–VIS spektrofotometrie pro sledování průběhu redukce rhenistanu amonného vybranými redukčními činidly, kterými jsou kyselina askorbová a acetylhydrazin.

Dílním cílem je využití hmotnostní spektrometrie pro charakterizaci vybraných komplexů rhenia s organickými ligandy.

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

- acetylhydrazin 90% (Sigma Aldrich, Německo)
- benzen-1,2,3-triol (pyrogallol) 99% (Alfa Aesar, Německo)
- Beta-Alanin 99% (Sigma Aldrich, Německo)
- dihydrogenfosforečnan sodný 99% (Lach-Ner, Česká republika)
- hydroxid lithný 98% (Lach-Ner, Česká republika)
- hydroxid sodný 97% (Sigma Aldrich, Německo)
- kyselina askorbová 99% (Sigma Aldrich, Německo)
- kyselina boritá 99,5% (Lach-Ner, Česká republika)
- kyselina citrónová 99,8% (Lach-Ner, Česká republika)
- kyselina 2-(cyklohexylamino)ethansulfonová (CHES pufr) 99% (Sigma Aldrich, Německo)
- kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, Česká republika)
- kyselina octová 99% (Sigma Aldrich, Německo)
- octan sodný 98,5% (Lach-Ner, Česká republika)
- tetraboritan sodný 99% (Lach-Ner, Česká republika)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan 99,8% (Sigma Aldrich, Německo)
- rhenistan amonný 99% (Sigma Aldrich, Německo)

4.2 Použitá instrumentace a postupy

Pevné látky byly odváženy s použitím mikrováh Sartorius 7085011 (Sartorius GmbH, Gottingen, Německo).

Dále byl použit pH metr Jenway 3540 pH/Conductivity Meter.

Pro měření metodou CZE byl použit přístroj Agilent Technologies 7100 (USA). Jako separační kolona byla použita křemenná kapilára od firmy Agilent Technologies (USA) o vnitřním průměru 50 μm a vnějším průměru 375 μm , délka k detektoru byla 40 cm a celková délka 50 cm.

Pro CZE měření ve velmi krátké separační kapiláře bylo použito experimentální zařízení (konstrukce prof. Opekar) s tlakovým dávkovačem a UV-VIS absorpčním detektorem.

Byla použita křemenná kapilára o celkové délce 16,5 cm, vnitřním průměru 25 μm a délce k detektoru 11,5 cm.

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí softwaru Agilent ChemStation (USA).

V tabulce 1 jsou uvedené použité nosné elektrolyty pro metodu CZE.

Tabulka 1: Použité nosné elektrolyty

| Nosný elektrolyt | Složení | pH |
|------------------|---|------|
| NE1 | 20mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ + 20mM H_3BO_3 | 9,07 |
| NE2 | 10mM HCl + 20mM $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$ | 3,52 |
| NE3 | 5mM $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 10mM $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 3,79 |
| NE4 | 20mM CH_3COONa + 20mM CH_3COOH | 4,45 |
| NE5 | 20mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 4,64 |
| NE6 | 20mM CHES pufr | 9,63 |
| NE7 | 50mM HAc + 20mM TRIS | 4,50 |

Při měření metodou UV–VIS byl použit jednopaprskový spektrometr Thermo Evolution 60 od firmy Thermo Scientific (USA).

Dále byly použity křemenné kyvety o objemu 3 ml s definovanou optickou délkou 1 cm. Výsledky byly vyhodnocovány pomocí počítačového softwaru Vision Lite Scan 5 od firmy Thermo Scientific (USA).

UV–VIS kinetická měření byla odečítána ve vybraných časových intervalech a ve vlnových délkách od 200 do 700 nm s krokem 5 nm.

ESI/MS měření byla prováděna na hmotnostním spektrometru Esquire 3000 s iontovou pastí od společnosti Bruker Daltonics (Německo). Přístroj byl kontrolován a ovládán prostřednictvím softwaru Esquire Control 5.3.11 a experimentální data byla zpracovávána pomocí programu Data Analysis 3.3.56 od firmy Bruker Daltonics (Německo). Jako čerpadlo byla použita injekční pumpa Cole Parmer (USA).

4.2.1 Postup měření redukce rhenistanu amonného

Měření úbytku rhenistanu amonného s použitím kyseliny askorbové jako redukčního činidla bylo provedeno dvěma různými metodami – pomocí kapilární zónové elektroforézy a metody UV–VIS spektrometrie.

Dále bylo k rhenistanu amonnému přidáno komplexotvorné činidlo, tvořící pevný komplex s redukovanou formou rhenia. Identifikace vzniklého komplexu byla provedena pomocí ESI/MS.

Kapilární zónová elektroforéza

Před začátkem každého měření byla nejprve provedena kalibrace a promytí přístroje. CZE byla promyta vodou po dobu pěti minut, poté proběhlo promytí pomocí nosného elektrolytu po dobu dvou minut a v případě potřeby pomocí 100mM hydroxidu sodného také po dobu dvou minut. Poté byly naplněny vialky nosným elektrolytem a vloženy do otočného karuselu do pozice 3 a 4. Do pozice 7 byla umístěna vialka s rhenistanem amonným o koncentraci 0,75 mmol/l jako testovacím vzorkem. Poté byly nastaveny parametry metody.

Pro kyselé prostředí: napětí -25 kV, tlak 30 mba v případě použití kyseliny askorbové jako redukčního činidla, 60 mba pro acetylhydrazin, doba dávkování vzorku 20 s, vlnová délka 200, 210, 230 a 256 nm, doba analýzy 20 minut.

Pro zásadité prostředí: napětí 25 kV, tlak 30 mba v případě použití kyseliny askorbové jako redukčního činidla, -60 mba pro acetylhydrazin, doba dávkování vzorku 20 s, vlnová délka 200, 210, 230 a 256 nm, doba analýzy 20 minut.

Po spuštění analýzy byla sledována hodnota protékajícího proudu, hodnota tlaku při dávkování vzorku a pohyb elektroosmózy.

V dalším kroku byla proměřena kalibrační řada rhenistanu amonného s použitím několika různých nosných elektrolytů viz tabulka 1. Z těchto nosných elektrolytů byl poté vybrán jeden kyselý a jeden zásaditý jako optimální.

Pro kyselé prostředí byl vybrán NE4. Pro bazické prostředí NE1 v případě použití kyseliny askorbové jako redukčního činidla, NE6 pro acetylhydrazin.

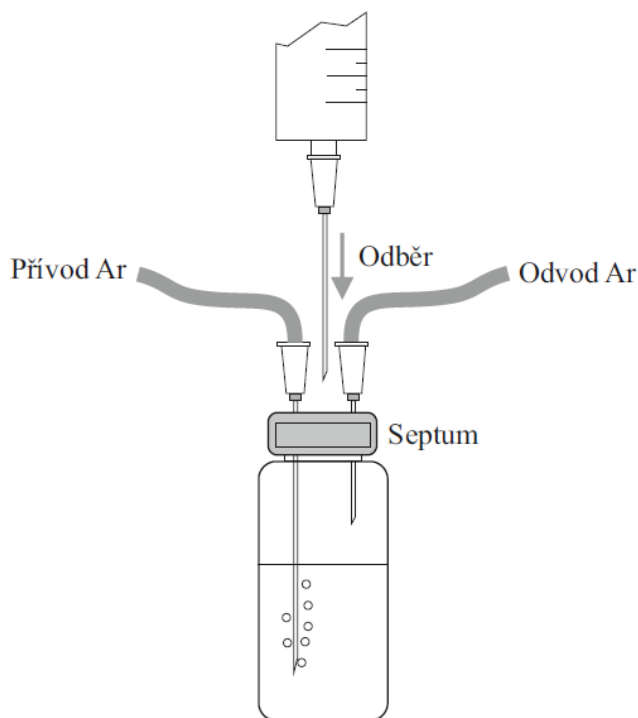
Jako optimální koncentrace rhenistanu amonného byla zvolena 0,20 mg/ml (0,75mM) a tato koncentrace byla používána pro všechna další měření.

Dále byla proměřena kalibrační řada kyseliny askorbové v kyselém i bazickém prostředí za použití stejných nosných elektrolytů. V tomto případě byla zvolena a použita pro další měření koncentrace 2,82 mg/ml (16 mmol/l).

Pro kinetická měření redukce rhenistanu amonného s použitím kyseliny askorbové jako redukčního činidla pomocí metody kapilární zónové elektroforézy byla vždy připravena směs obsahující 200 μ l rhenistanu amonného o koncentraci 0,75 mmol/l a 100 μ l kyseliny askorbové o koncentraci 16 mmol/l. Do této reakční směsi bylo vždy přidáno 100 μ l 20mM acetátového pufru jako stabilizátoru pH. Tato směs byla poté proměřena v NE1 a NE4.

Pro ověření možného vlivu vzdušného kyslíku na průběh redukce rhenistanu kyselinou askorbovou byl průběh redukce sledován za anaerobních podmínek a postup přípravy

reakční směsi modifikován následujícím způsobem: Pro odstranění rozpuštěného vzdušného kyslíku z vodných roztoků a jejich uchovávání v inertní atmosféře byly použity 20ml a 10ml skleněné nádobky se septem, s přívodní a odvodní injekční jehlou pro průtok argonu. Na obrázku 12 je znázorněno zařízení pro sledování redukce rhenistanu kyselinou askorbovou v inertní atmosféře argonu.



Obrázek 12: Schéma aparatury kyseliny askorbové pod inertním plynem.

Voda, zásobní roztok rhenistanu amonného a roztok acetátového pufru byly pro odstranění rozpuštěného kyslíku 20 minut probublávány argonem (průtok 5 ml/min) a uchovávány v inertní atmosféře.

Čerstvý zásobní roztok kyseliny askorbové byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství kyseliny askorbové v 10 ml vody předem zbavené rozpuštěného kyslíku, výsledný roztok uchováván v inertní atmosféře.

Reakční směs byla připravena smísením odpovídajících objemů roztoků rhenistanu amonného, kyseliny askorbové a acetátového pufru v 10ml skleněné nádobce s nastaveným průtokem argonu 2 ml/min. Po smísení byl z nádobky odebrán alikvot reakční směsi pro CZE analýzu. Pro snížení odpařeného množství vody z reakční směsi během sledování průběhu reakce byl průtok argonu nádobkou snížen na 0,5 ml/min a přívodní injekční jehla byla povysunuta tak, aby nezasahovala do roztoku.

Dále bylo proměřeno několik koncentrací kyseliny askorbové v kyselém i bazickém prostředí a byl sledován úbytek rhenistanu amonného. Pro sledování úbytku rhenistanu amonného byly zvoleny koncentrace 0,75; 1,5; 7,5; 15; 75; 225; 375; 600 a 750 mmol/l.

V následujícím kroku byl proměřen vliv koncentrace acetylhydrazinu na redukci rhenistanu amonného.

Pro metodu kapilární zónové elektroforézy byla vždy připravena reakční směs obsahující 200 μ l rhenistanu amonného o koncentraci 0,75 mmol/l a 50 μ l acetylhydrazinu o různé koncentraci. K této směsi bylo vždy přidáno 150 μ l 20mM acetátového pufru. Použité koncentrace acetylhydrazinu jsou 0,75; 1,5; 7,5; 15; 75; 225; 375; 600 a 750 mmol/l.

Příprava acetylhydrazinu proběhla následovně. Ze zásobního roztoku bylo odpipetováno 50 μ l acetylhydrazinu, zváženo a poté k němu přidáno odpovídající množství vody. Z tohoto roztoku bylo poté odpipetováno 50 μ l a přidáno k 0,75mM rhenistanu amonnému a 20mM acetátovému pufru.

UV–VIS spektrometrie

Křemenné 3ml kyvety byly naplněny reakční směsí a slepým vzorkem a umístěny do vestavěného měniče kyvet.

Nejprve byla proměřena reakční směs obsahující 16mM kyselinu askorbovou a 20mM acetátový pufr, jako slepý vzorek byl použit tentýž 20mM acetátový pufr.

Druhou reakční směsí byla směs 0,75mM rhenistanu amonného, 16mM kyseliny askorbové a 20mM acetátového pufru. Pro tuto reakční směs byly použity čtyři různé slepé vzorky - 20mM acetátový pufr; 20mM acetátový pufr ve směsi s 16mM kyselinou askorbovou; 0,75mM rhenistan amonný; voda.

Kinetická měření byla odečítána pomocí počítačového softwaru Vision Lite Scan 5 od firmy Thermo Scientific (USA) ve vybraných časových intervalech a ve vlnových délkách od 200 do 700 nm s krokem 5 nm.

Hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací

Hmotnostní spektra byla snímána v módu negativních iontů v rozsahu 260–1000 Da. Při všech měřeních dosahoval tlak rozprašovacího plynu 18 psi při průtokové rychlosti 5 l·min⁻¹. Teplota při desolvataci byla 300 °C a kapilární napětí bylo nastaveno na 4000 V. Roztok vzorků byl dávkován injekční pumpou přímo do rozprašovače při průtoku 8 μ l·min⁻¹.

4.3 Zpracování kalibračních závislostí

Pro určení meze detekce a meze stanovitelnosti byla použita analýza rozptylu dat kalibračních závislostí. Obecný tvar rovnice regresní přímky:

$$y = A \cdot x + B \quad (9)$$

Určení směrodatné odchylky $s_{y,x}$, kde x je nezávisle proměnná (koncentrace) a y je závisle proměnná (naměřený signál).

$$s_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - Y_i)^2}{n - 2}} \quad (10)$$

kde y_i jsou naměřené hodnoty signálu, Y_i jsou hodnoty signálu vypočítané z rovnice regresní přímky 9 pro dané koncentrace x_i . Jelikož platí, že korelační koeficient R^2 lineární regrese je u všech naměřených kalibračních křivek v rozmezí 0,95 a 1,05, je možné použít pro určení meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) následující rovnice. [40]

$$LOD = \frac{3 \cdot s_{y,x} - B}{A} \quad (11)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_{y,x} - B}{A} \quad (12)$$

5 Výsledky a diskuze

5.1 Měření redukce rhenistanu amonného s použitím kyseliny askorbové jako redukčního činidla

Měření úbytku rhenistanu amonného s použitím kyseliny askorbové jako redukčního činidla bylo provedeno dvěma různými metodami – pomocí kapilární zónové elektroforézy a metody UV–VIS spektrometrie.

5.1.1 Pomocí metody kapilární zónové elektroforézy

Z důvodu zjištění, zda má pH prostředí vliv na redukci rhenistanu amonného kyselinou askorbovou, bylo měření provedeno v kyselém i bazickém prostředí. Pro bazické prostředí byl zvolen jako nosný elektrolyt NE1, pro kyselé prostředí NE4 (viz tabulka 1).

Bazické prostředí

Měřeno za podmínek:

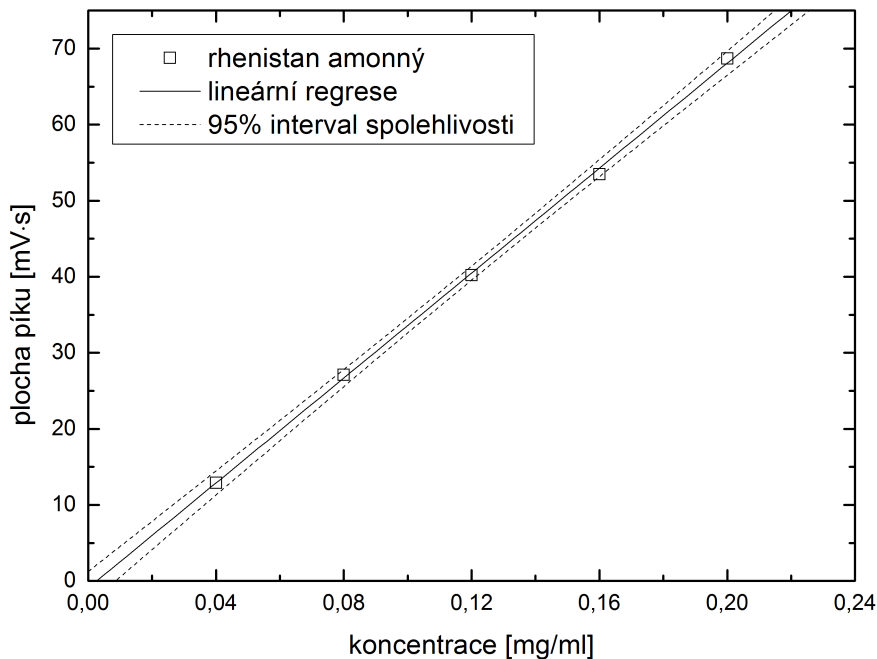
- $U = 25 \text{ kV}$,
- $I = 10 \text{ } \mu\text{A}$,
- $P = 30 \text{ mba}$,
- dávkování vzorku po dobu 20 s,
- odečítáno při vlnové délce 200 nm pro rhenistan amonný a 256 nm pro kyselinu askorbovou.

V tabulce 2 jsou uvedené naměřené hodnoty ploch píků kalibrační řady rhenistanu amonného při použití NE1 jako nosného elektrolytu.

Tabulka 2: Naměřené hodnoty plochy píku rhenistanu amonného.

| Koncentrace [mg/ml] | Plocha píku [mV · s] |
|------------------------|-------------------------|
| 0,04 | 12,8 |
| 0,08 | 26,2 |
| 0,12 | 40,2 |
| 0,16 | 53,5 |
| 0,20 | 68,7 |

Na obrázku 13 je uveden graf kalibrační závislosti rhenistanu amonného. Z této závislosti je patrné, že plocha píku roste lineárně s rostoucí koncentrací rhenistanu amonného.



Obrázek 13: Kalibrační závislost rhenistanu amonného s použitím NE1 jako nosného elektrolytu. Odečítáno při vlnové délce 200 nm. Rovnice regresní přímky: $y = 345 \cdot x - 0,92$. Hodnota korelačního koeficientu R^2 lineární regrese je 0,999.

Určení LOD a LOQ dosazením do rovnic 10, 11 a 12.

$$s_{y,x} = 0,645 \text{ mV} \cdot \text{s} \quad (13)$$

$$LOD = \frac{3 \cdot 0,645 + 0,92}{345} \quad (14)$$

$$LOD = 0,008 \text{ mg/ml} \quad (15)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot 0,645 + 0,92}{345} \quad (16)$$

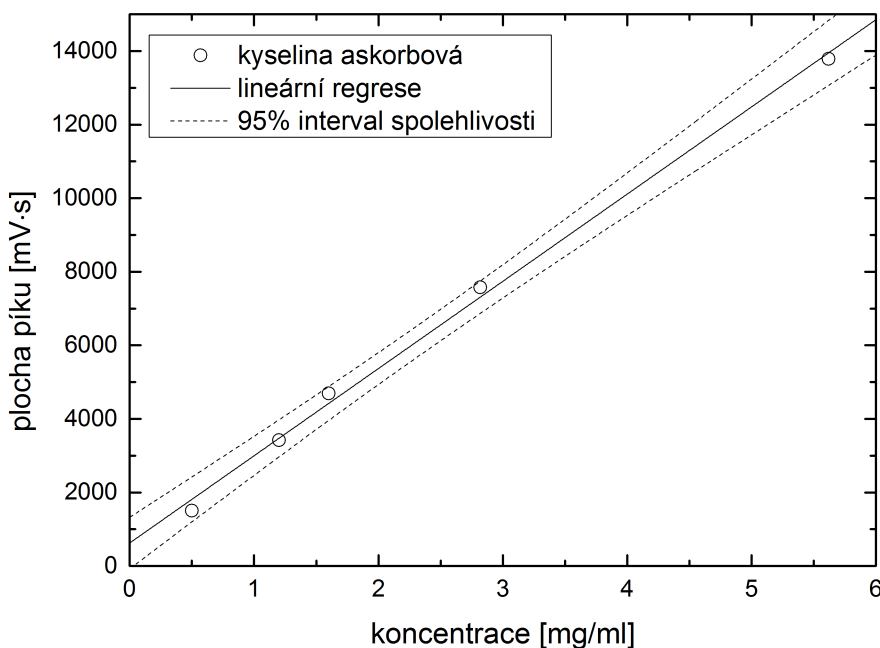
$$LOQ = 0,021 \text{ mg/ml} \quad (17)$$

V tabulce 3 jsou uvedené naměřené hodnoty ploch píků kalibrační řady kyseliny askorbové. Měření proběhlo v NE1.

Na obrázku 14 je uveden graf kalibrační závislosti kyseliny askorbové. Z této závislosti je patrné, že plocha píku roste lineárně s rostoucí koncentrací kyseliny askorbové.

Tabulka 3: Naměřené hodnoty plochy píku kyseliny askorbové.

| Koncentrace [mg/ml] | Plocha píku [mV · s] |
|---------------------|----------------------|
| 0,50 | 1 501,9 |
| 1,20 | 3 419,0 |
| 1,60 | 4 691,6 |
| 2,82 | 7 573,0 |
| 5,62 | 13 783,8 |



Obrázek 14: Kalibrační závislost kyseliny askorbové. Měřeno v NE1, odečítáno při vlnové délce 256 nm. Rovnice regresní přímky: $y = 2371,3 \cdot x + 626,1$. Hodnota korelačního koeficientu R^2 lineární regrese je 0,997.

Určení LOD a LOQ dosazením do rovnic 10, 11 a 12.

$$s_{y,x} = 299,2 \text{ mV} \cdot \text{s} \quad (18)$$

$$LOD = \frac{3 \cdot 299,2 - 626,1}{2371,3} \quad (19)$$

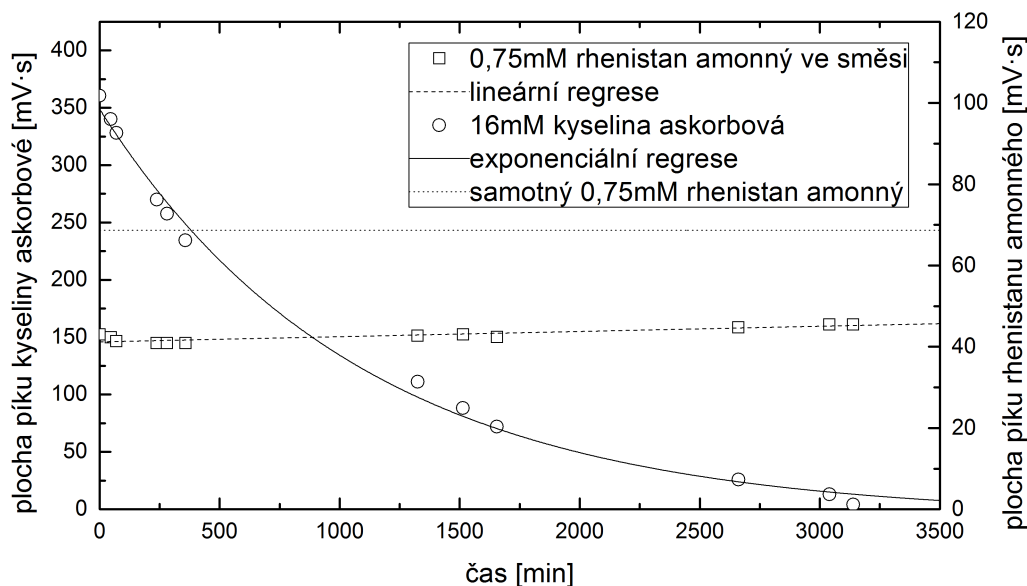
$$LOD = 0,114 \text{ mg/ml} \quad (20)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot 299,2 - 626,1}{2371,3} \quad (21)$$

$$LOQ = 0,998 \text{ mg/ml} \quad (22)$$

Dále byla proměřena reakční směs obsahující 0,75mM rhenistan amonný a 16mM kyseliny askorbové v NE1. K této reakční směsi bylo přidáno 100 μ l 20mM acetátového pufru pro zachování stálé hodnoty pH.

V grafu na obrázku 15 je uvedena závislost plochy píku kyseliny askorbové a rhenistanu amonného na čase. Toto kinetické měření bylo odečítáno při vlnové délce 200 nm pro rhenistan amonný a 256 nm pro kyselinu askorbovou. Jako nosný elektrolyt byl zvolen NE1. Naměřená data jsou uvedena v tabulce 10 v příloze A.

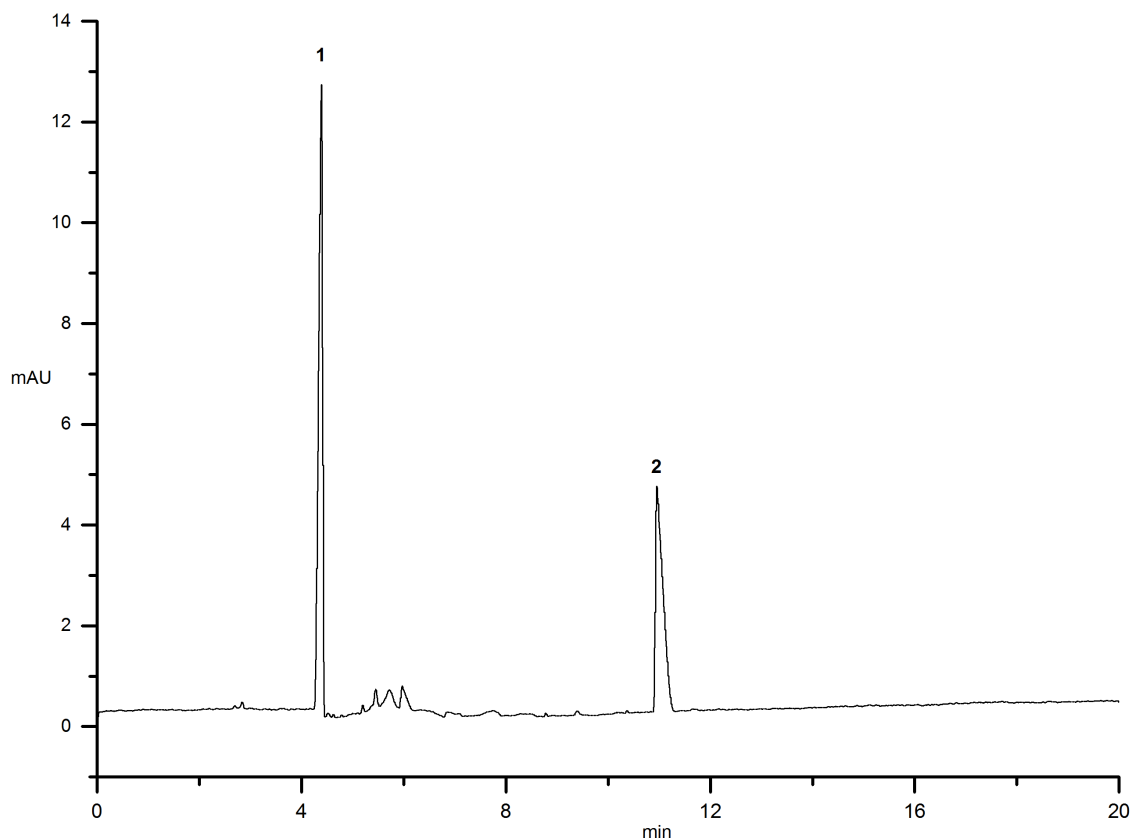


Obrázek 15: Závislost plochy píku kyseliny askorbové a rhenistanu amonného na čase při použití NE1 jako nosného elektrolytu. Kinetické měření bylo odečítáno při vlnové délce 200 nm pro rhenistan amonný a 256 nm pro kyselinu askorbovou. Přímkou s konstantní hodnotou 68,7 mV·s odpovídá referenčnímu roztoku rhenistanu amonného bez přidání redukčního činidla.

Z grafu je patrné, že se plocha píku rhenistanu amonného s časem téměř nemění, nicméně došlo k úbytku plochy rhenistanu amonného po přidání kyseliny askorbové jako redukčního činidla. Plocha píku rhenistanu amonného o koncentraci 0,75 mmol/l bez reakčního činidla byla 68,7 mV·s. Po přidání kyseliny askorbové je tato plocha v průměru 42,8 mV·s. Kyselina askorbová tedy zredukovala plochu rhenistanu amonného o 38 %.

Dále na grafu vidíme, že plocha píku kyseliny askorbové s rostoucím časem klesá. Úbytek plochy píku kyseliny askorbové s rostoucím časem je důsledkem oxidace kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou.

Na obrázku 16 je uveden ukázkový elektroferogram této reakční směsi. V grafu na obrázku je vyznačen pík kyseliny askorbové (1) a rhenistanu amonného (2).



Obrázek 16: Ukázkový elektroferogram reakční směsi 0,75mM rhenistan amonný + 16mM kyselina askorbová ve 20mM acetátovém pufru. Měřeno v prostředí NE1.

Kyselé prostředí

Měřeno za podmínek:

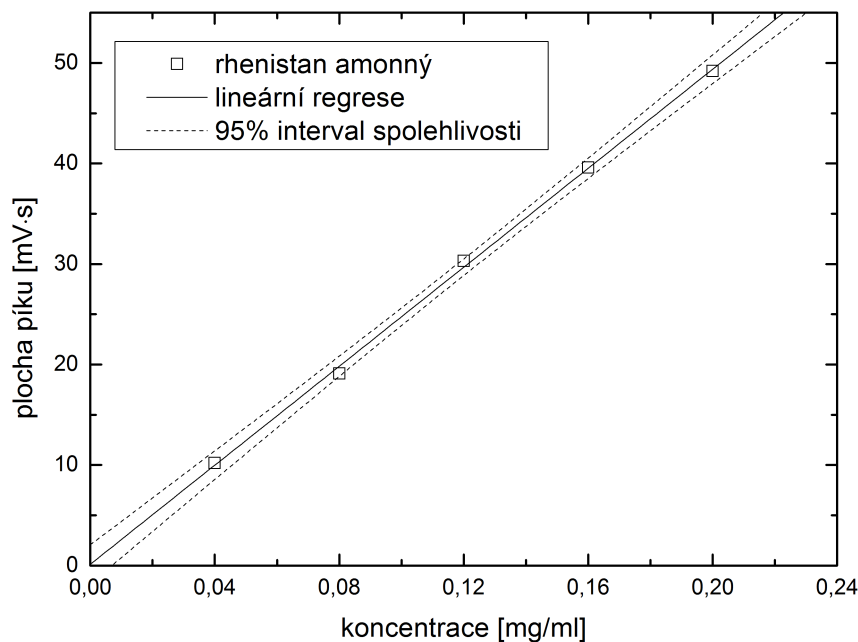
- $U = -25$ kV,
- $I = 11$ μ A,
- $P = 30$ mba,
- dávkování vzorku po dobu 20 s,
- odečítáno při vlnové délce 200 nm pro rhenistan amonný a 256 nm pro kyselinu askorbovou.

V tabulce 4 jsou uvedené naměřené hodnoty ploch píků kalibrační řady rhenistanu amonného při použití acetátového pufru jako nosného elektrolytu.

Na obrázku 17 je uveden graf kalibrační závislosti rhenistanu amonného. Z grafu je patrné, že s rostoucí koncentrací rhenistanu amonného roste plocha píku lineárně.

Tabulka 4: Naměřené hodnoty plochy píku rhenistanu amonného.

| Koncentrace [mg/ml] | Plocha píku [mV · s] |
|---------------------|----------------------|
| 0,04 | 10,2 |
| 0,08 | 19,1 |
| 0,12 | 30,3 |
| 0,16 | 39,6 |
| 0,20 | 49,2 |

Obrázek 17: Kalibrační závislost rhenistanu amonného s použitím NE4 jako nosného elektrolytu. Odečítáno při vlnové délce 200 nm. Rovnice regresní přímky: $y = 246,25 \cdot x + 0,13$. Hodnota korelačního koeficientu R^2 lineární regrese je 0,999.

Určení LOD a LOQ dosazením do rovnic 10, 11 a 12.

$$s_{y,x} = 0,578 \text{ mV} \cdot \text{s} \quad (23)$$

$$LOD = \frac{3 \cdot 0,578 - 0,13}{246,25} \quad (24)$$

$$LOD = 0,007 \text{ mg/ml} \quad (25)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot 0,578 - 0,13}{246,25} \quad (26)$$

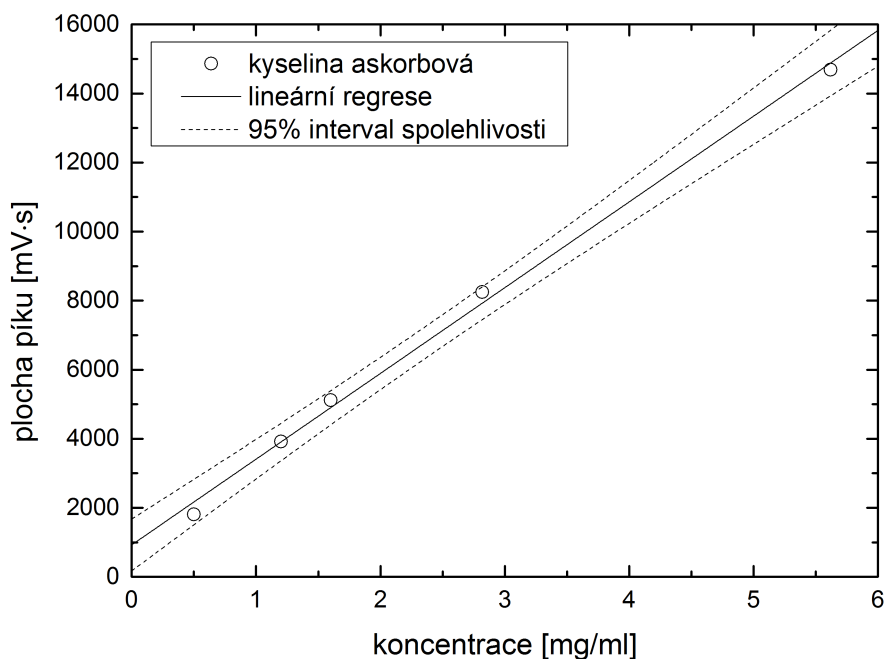
$$LOQ = 0,023 \text{ mg/ml} \quad (27)$$

V tabulce 5 jsou uvedené naměřené hodnoty ploch píků kalibrační řady kyseliny askorbové při použití NE4 jako nosného elektrolytu.

Tabulka 5: Naměřené hodnoty plochy píku kyseliny askorbové.

| Koncentrace [mg/ml] | Plocha píku [mV · s] |
|------------------------|-------------------------|
| 0,50 | 1 810,8 |
| 1,20 | 3 917,8 |
| 1,60 | 5 119,6 |
| 2,82 | 8 244,2 |
| 5,62 | 14 691,1 |

Na obrázku 18 je uveden graf kalibrační závislosti kyseliny askorbové. Z této závislosti je patrné, že plocha píku roste lineárně s rostoucí koncentrací kyseliny askorbové.



Obrázek 18: Kalibrační závislost kyseliny askorbové s použitím NE4 jako nosného elektrolytu. Odečítáno při vlnové délce 256 nm. Rovnice regresní přímky: $y = 2483,6 \cdot x + 925,2$. Hodnota korelačního koeficientu R^2 lineární regrese je 0,997.

Určení LOD a LOQ dosazením do rovnic 10, 11 a 12.

$$s_{y,x} = 322,5 \text{ mV} \cdot \text{s} \quad (28)$$

$$LOD = \frac{3 \cdot 322,5 - 925,2}{2483,6} \quad (29)$$

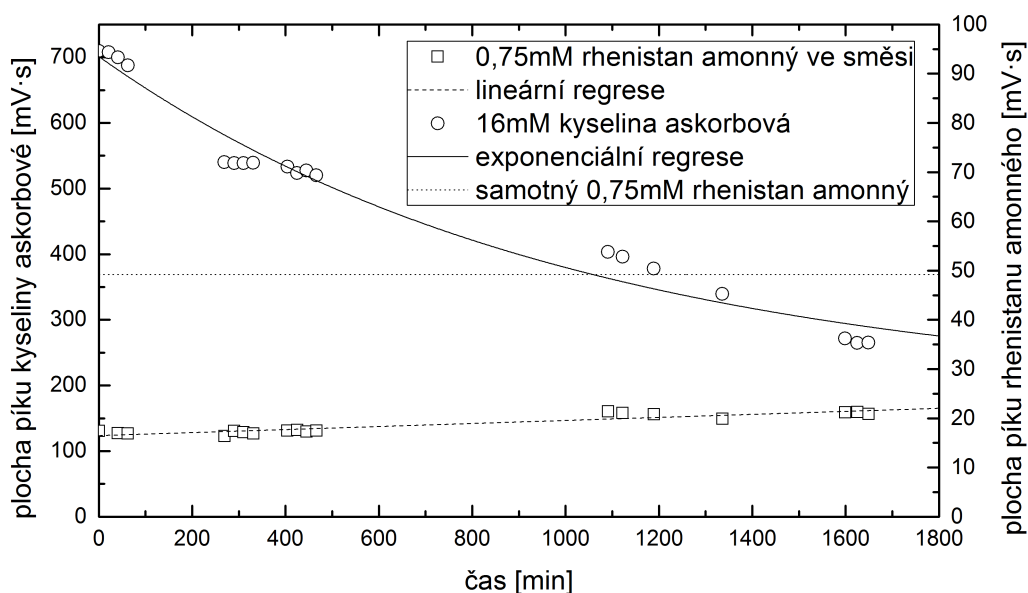
$$LOD = 0,017 \text{ mg/ml} \quad (30)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot 322,5 - 925,2}{2483,6} \quad (31)$$

$$LOQ = 0,926 \text{ mg/ml} \quad (32)$$

Dále byla proměřena reakční směs obsahující 0,75mM rhenistan amonný a 16mM kyselinu askorbovou v různých časových intervalech. Do reakční směsi bylo přidáno 100 μl 20mM acetátového pufru pro udržení stálé hodnoty pH. Naměřená data jsou uvedena v tabulce 11 v příloze A.

Na obrázku 19 je uvedena závislost plochy píku kyseliny askorbové a rhenistanu amonného na čase.



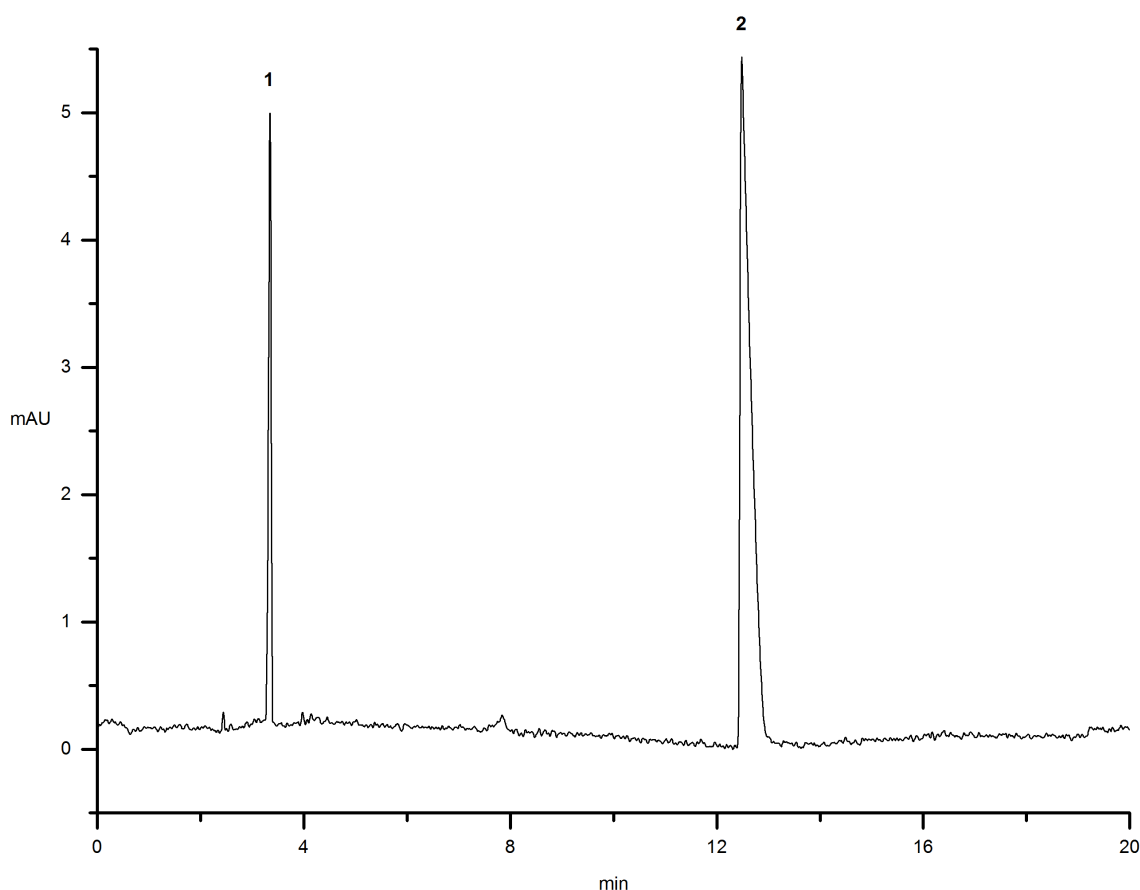
Obrázek 19: Závislost plochy píku kyseliny askorbové a rhenistanu amonného na čase při použití NE4 jako nosného elektrolytu. Do reakční směsi bylo přidáno 100 μl 20mM acetátového pufru. Kinetické měření bylo odečítáno při vlnové délce 200 nm pro rhenistan amonný a 256 nm pro kyselinu askorbovou. Přímka s konstantní hodnotou 49,2 mV·s odpovídá referenčnímu roztoku rhenistanu amonného bez přidaného redukčního činidla.

Z grafu je patrné, že v kyselém prostředí došlo, po přidání kyseliny askorbové jako redukčního činidla, k úbytku plochy píku, tj. k redukci rhenistanu amonného, stejně tak jako tomu bylo v bazickém prostředí. Plocha píku samotného 0,75mM rhenistanu

amonného byla 49,2 mV·s, po přidání kyseliny askorbové do směsi se tato plocha zredukovala v průměru na 18,6 mV·s. Kyselina askorbová tedy zredukovala v kyselém prostředí plochu píku rhenistanu amonného o 62 %.

Také v kyselém prostředí dochází k úbytku plochy píku kyseliny askorbové s rostoucím časem v důsledku oxidace kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou.

Na obrázku 20 je uveden ukázkový elektroferogram této reakční směsi. V grafu na obrázku je vyznačen pík kyseliny askorbové (1) a rhenistanu amonného (2).

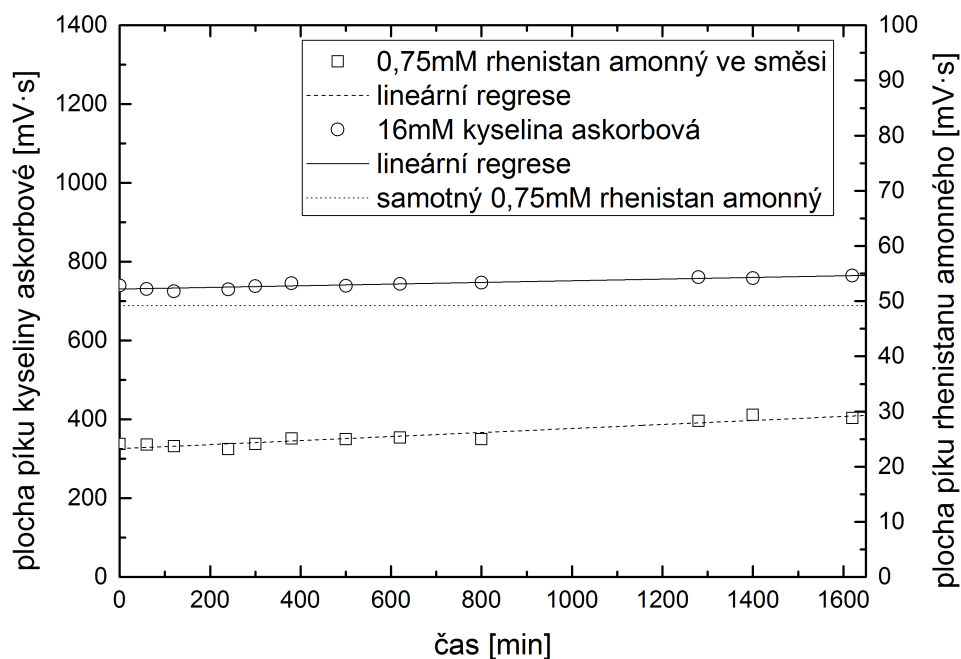


Obrázek 20: Ukázkový elektroferogram reakční směsi 0,75mM rhenistan amonný + 16mM kyselina askorbová ve 20mM acetátovém pufru. Měřeno v prostředí NE4.

Poté byl sledován možný vliv prostředí na redukci rhenistanu amonného kyselinou askorbovou. Proto bylo další měření provedeno v anaerobním prostředí.

Na obrázku 21 je uveden záznam měření závislosti plochy píku rhenistanu amonného a kyseliny askorbové na čase při reakci probíhající za anaerobních podmínek. Naměřená data jsou uvedena v tabulce 12 v příloze A.

Z uvedených časových závislostí je zřejmé, že přítomnost vzdušného kyslíku nemá žádný vliv na podíl zredukováného rhenistanu, za anaerobních podmínek je procentuální



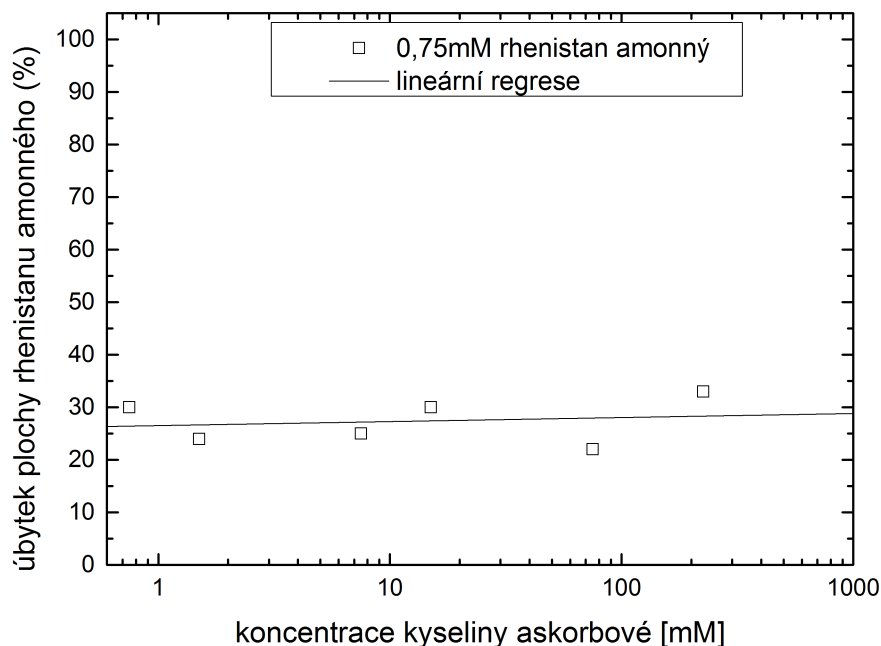
Obrázek 21: Závislost plochy píku rhenistanu amonného a kyseliny askorbové na čase při reakci probíhající za anaerobních podmínek. Měřeno v prostředí NE4.

úbytek plochy rhenistanového aniontu srovnatelný s aerobním experimentem. Díky nepřítomnosti kyslíku v roztoku reakční směsi zůstává plocha píku kyseliny askorbové v čase prakticky konstantní.

Nevýrazný nárůst ploch píků obou analytů během měření je dán odpařením vody jako rozpouštědla z reakční směsi, vedoucím ke zvýšení koncentrace obou reaktantů.

Dále bylo sledováno, zda má koncentrace kyseliny askorbové vliv na podíl zredukovaného množství rhenistanu amonného.

V grafu na obrázku 22 je uvedena závislost úbytku plochy píku rhenistanu amonného na molární koncentraci kyseliny askorbové. Z grafu na obrázku je patrné, že kyselina askorbová v kyselém prostředí redukuje rhenistan amonný v průměru o 27 %. Změna koncentrace kyseliny askorbové (tj. její přebytek v reakční směsi) má v tomto případě zanedbatelný vliv na podíl zredukovaného rhenistanu amonného. Naměřená data jsou uvedena v tabulce 13 v příloze A.



Obrázek 22: Závislost úbytku plochy píku rhenistanu amonného na molární koncentraci kyseliny askorbové. Jako nosný elektrolyt byl použit NE4. Odečítáno při vlnové délce 200 nm.

5.1.2 Pomocí metody UV–VIS spektrometrie

Jako další metoda pro sledování redukce rhenistanu amonného s použitím kyseliny askorbové jako redukčního činidla byla použita UV–VIS spektrometrie.

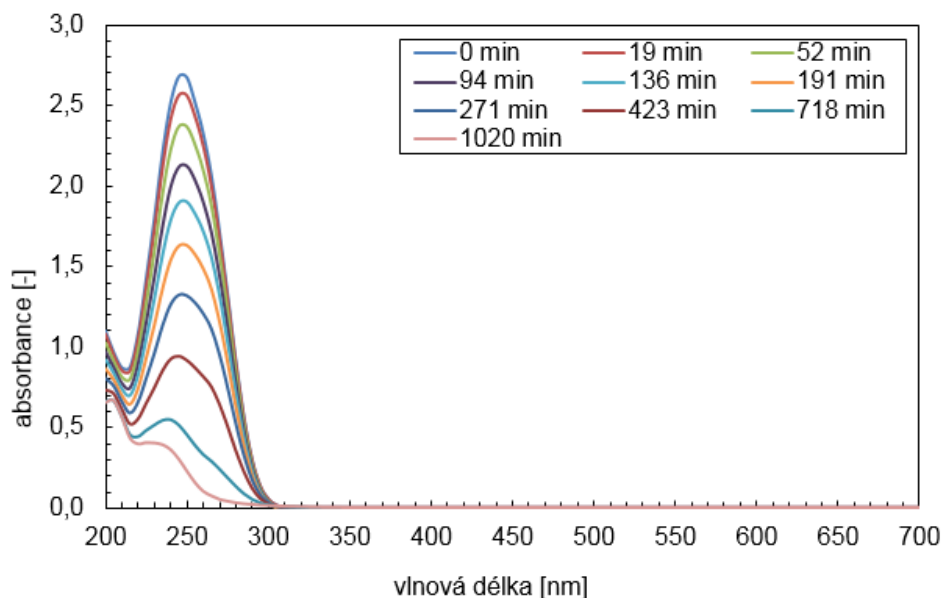
Pro zjištění, zda dochází k redukci rhenistanu amonného kyselinou askorbovou, byly použity dvě reakční směsi a slepé vzorky o různém složení, viz tabulka 6.

Tabulka 6: Použité reakční směsi a slepé vzorky.

| Reakční směs | Složení reakční směsi | Slepý vzorek |
|--------------|---|--|
| RS1 | 16mM $C_6H_8O_6$ + 20mM (CH_3COONa + CH_3COOH) | 20mM (CH_3COONa + CH_3COOH) |
| RS2 | 0,75mM NH_4ReO_4 + 16mM $C_6H_8O_6$ + 20mM (CH_3COONa + CH_3COOH) | 1. 20mM (CH_3COONa + CH_3COOH) 2. 16mM $C_6H_8O_6$ + 20mM (CH_3COONa + CH_3COOH) 3. 0,75mM NH_4ReO_4 4. H_2O |

UV–VIS kinetická měření byla odečítána ve vybraných časových intervalech od 200 do 700 nm, s krokem 5 nm.

V grafu na obrázku 23 je uveden ukázkový graf závislosti absorpce na vlnové délce pro reakční směs RS2 se slepým vzorkem č. 2 (viz tabulka 6).



Obrázek 23: Graf závislosti absorpce reakční směsi RS2 se slepým vzorkem č. 2 na vlnové délce.

Protože dochází k překryvu absorpčních spekter reagujících látek (tj. rhenistanu amonného a kyseliny askorbové), metoda UV–VIS absorpční spektrometrie není vhodná pro sledování kinetiky redukce rhenistanu amonného kyselinou askorbovou.

5.2 Měření redukce rhenistanu amonného s použitím acetylhydrazinu jako redukčního činidla

Pro sledování úbytku rhenistanu amonného s použitím acetylhydrazinu jako redukčního činidla byla použita metoda kapilární zónové elektroforézy.

5.2.1 Pomocí metody kapilární zónové elektroforézy

Stejně jako v případě použití kyseliny askorbové jako redukčního činidla, i v případě acetylhydrazinu byl sledován možný vliv pH prostředí na redukcí rhenistanu amonného. Z tohoto důvodu bylo provedeno měření reakční směsi v kyselém i bazickém prostředí. Pro kyselý prostředí byl zvolen nosný elektrolyt NE4, pro bazické NE6.

Kyselé prostředí

Měřeno za podmínek:

- $U = -25$ kV,
- $I = 16$ μ A,
- $P = 60$ mba,
- dávkování vzorku po dobu 20 s,
- odečítáno při vlnové délce 200 nm

Při měření byla použita kalibrační závislost s parametry uvedenými v tabulce 7 a na obrázku 24. Z grafu je patrné, že s rostoucí koncentrací rhenistanu amonného roste plocha píku lineárně.

Tabulka 7: Naměřené hodnoty plochy píku rhenistanu amonného.

| Koncentrace [mg/ml] | Plocha píku [mV · s] |
|------------------------|-------------------------|
| 0,04 | 37,9 |
| 0,08 | 72,2 |
| 0,12 | 106,2 |
| 0,16 | 138,1 |
| 0,20 | 175,5 |

Určení LOD a LOQ dosazením do rovnic 10, 11 a 12.

$$s_{y,x} = 1,394 \text{ mV} \cdot \text{s} \quad (33)$$

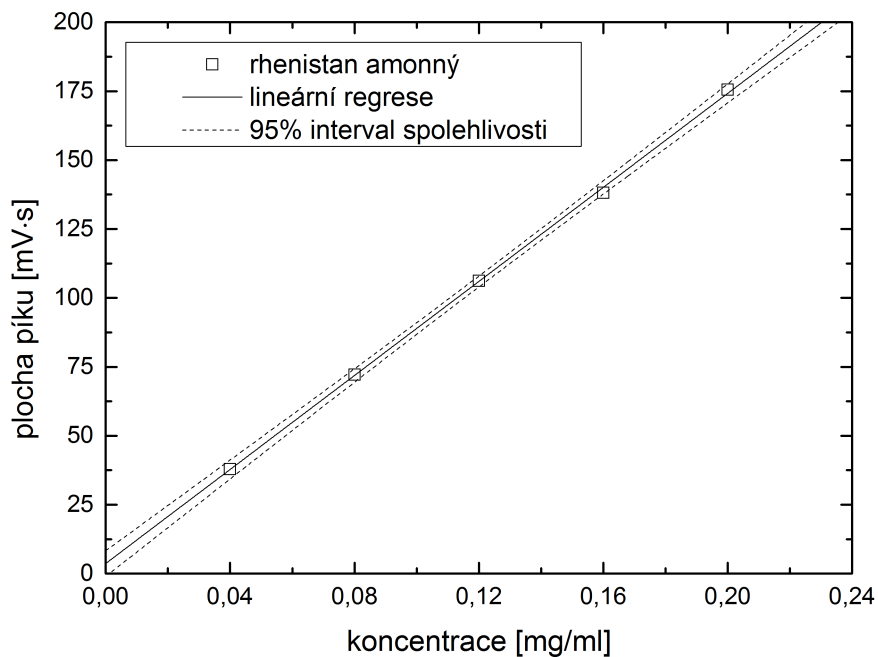
$$LOD = \frac{3 \cdot 1,394 - 3,65}{852,75} \quad (34)$$

$$LOD = 0,001 \text{ mg/ml} \quad (35)$$

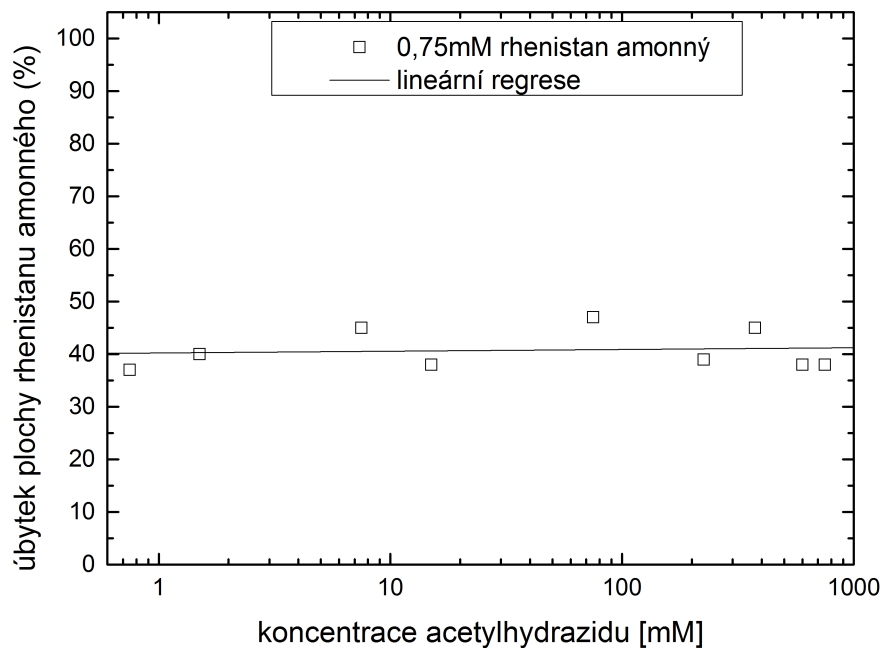
$$LOQ = \frac{10 \cdot 1,394 - 3,65}{852,75} \quad (36)$$

$$LOQ = 0,012 \text{ mg/ml} \quad (37)$$

Dále byl sledován vliv koncentrace acetylhydrazinu na procentuální úbytek plochy rhenistanu amonného. V grafu na obrázku 25 je uvedena závislost úbytku plochy píku rhenistanu amonného na molární koncentraci acetylhydrazinu. Stejně jako v případě redukce rhenistanu kyselinou askorbovou, i z tohoto grafu je patrné, že změna koncentrace acetylhydrazinu má zanedbatelný vliv na podíl zredukovaného rhenistanu amonného. Naměřená data jsou uvedena v tabulce 14 v příloze A.



Obrázek 24: Kalibrační závislost rhenistanu amonného. Rovnice regresní přímky: $y = 852,75 \cdot x + 3,65$. Hodnota korelačního koeficientu R^2 lineární regrese je 0,999. Měreno v NE4.



Obrázek 25: Závislost úbytku plochy píku rhenistanu amonného na molární koncentraci acetylhydrazinu. Měreno v NE4, odečítáno při vlnové délce 200 nm.

Bazické prostředí

Měřeno za podmínek:

- $U = 25 \text{ kV}$,
- $I = 16 \text{ } \mu\text{A}$,
- $P = -60 \text{ mba}$,
- dávkování vzorku po dobu 20 s,
- odečítáno při vlnové délce 200 nm

Při měření byla použita kalibrační závislost s parametry uvedenými v tabulce 8 a na obrázku 26. Z grafu je patrné, že s rostoucí koncentrací rhenistanu amonného roste plocha píku lineárně.

Tabulka 8: Naměřené hodnoty plochy píku rhenistanu amonného.

| Koncentrace [mg/ml] | Plocha píku [mV · s] |
|------------------------|-------------------------|
| 0,04 | 66,4 |
| 0,08 | 109,7 |
| 0,12 | 206,9 |
| 0,16 | 233,0 |
| 0,20 | 306,3 |

Určení LOD a LOQ dosazením do rovnic 10, 11 a 12.

$$s_{y,x} = 16,92 \text{ mV} \cdot \text{s} \quad (38)$$

$$LOD = \frac{3 \cdot 16,92 - 3,53}{1507,8} \quad (39)$$

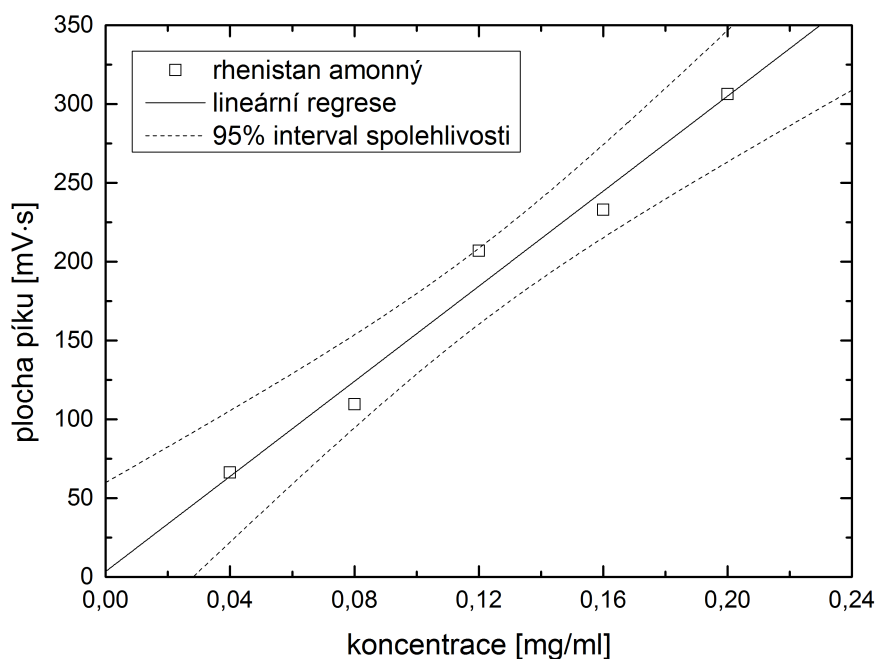
$$LOD = 0,031 \text{ mg/ml} \quad (40)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot 16,92 - 3,53}{1507,8} \quad (41)$$

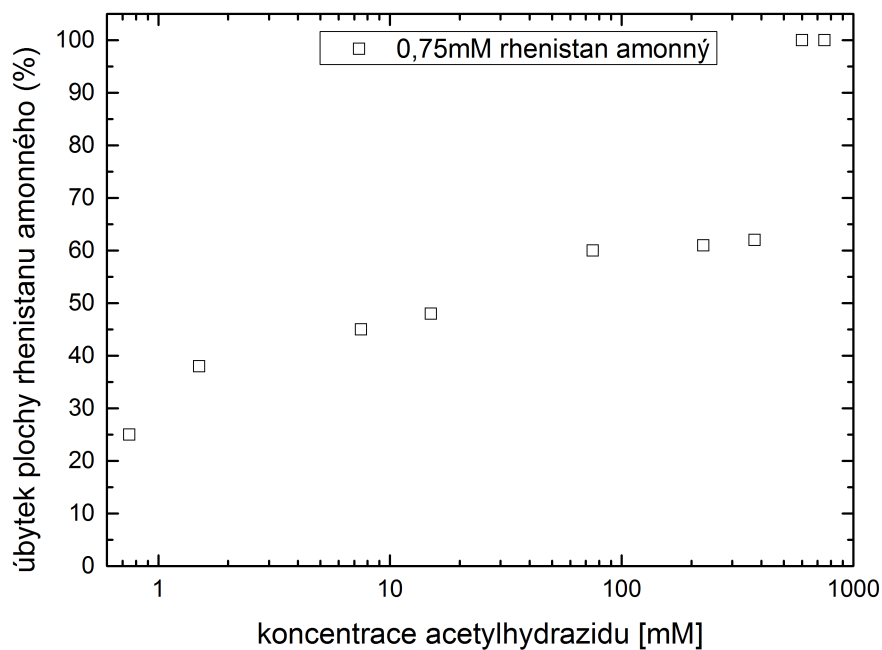
$$LOQ = 0,110 \text{ mg/ml} \quad (42)$$

Následně byl stejně jako v kyselém prostředí sledován vliv koncentrace acetylhydrazinu na procentuální úbytek plochy rhenistanu amonného.

V grafu na obrázku 27 je uvedena závislost úbytku plochy píku rhenistanu amonného na molární koncentraci acetylhydrazinu v bazickém prostředí. Z grafu je patrné, že s rostoucí koncentrací acetylhydrazinu roste i procentuální úbytek plochy rhenistanu amonného. Naměřená data jsou uvedena v tabulce 15 v příloze A.



Obrázek 26: Kalibrační závislost rhenistanu amonného. Měřeno v NE6, odečítáno při vlnové délce 200 nm. Rovnice regresní přímky: $y = 1507,8 \cdot x + 3,53$. Hodnota korelačního koeficientu R^2 lineární regrese je 0,977.



Obrázek 27: Závislost úbytku plochy píku rhenistanu amonného na molární koncentraci acetylhydrazinu. Měřeno v NE6, odečítáno při vlnové délce 200 nm.

Dále byla proměřena stejná reakční směs pomocí kratší 16,5cm kapiláry. Kratší kapilára byla použita z důvodu ověření vlivu délky kapiláry k detektoru na redukci rhenistanu amonného. Jako nosný elektrolyt byl zde použit NE7.

Měření proběhlo za podmínek:

- $U = 10 \text{ kV}$,
- $I = 6 \text{ } \mu\text{A}$,
- délka kapiláry - 16,5 cm.

Při měření byla použita kalibrační závislost s parametry uvedenými v tabulce 9 a na obrázku 28. Z grafu je patrné, že s rostoucí koncentrací rhenistanu amonného roste plocha píku lineárně.

Tabulka 9: Naměřené hodnoty plochy píku rhenistanu amonného.

| Koncentrace [mg/ml] | Plocha píku [mV · s] |
|------------------------|-------------------------|
| 0,04 | 2,2 |
| 0,08 | 4,8 |
| 0,12 | 6,5 |
| 0,16 | 9,3 |
| 0,20 | 11,9 |

Určení LOD a LOQ dosazením do rovnic 10, 11 a 12.

$$s_{y,x} = 0,311 \text{ mV} \cdot \text{s} \quad (43)$$

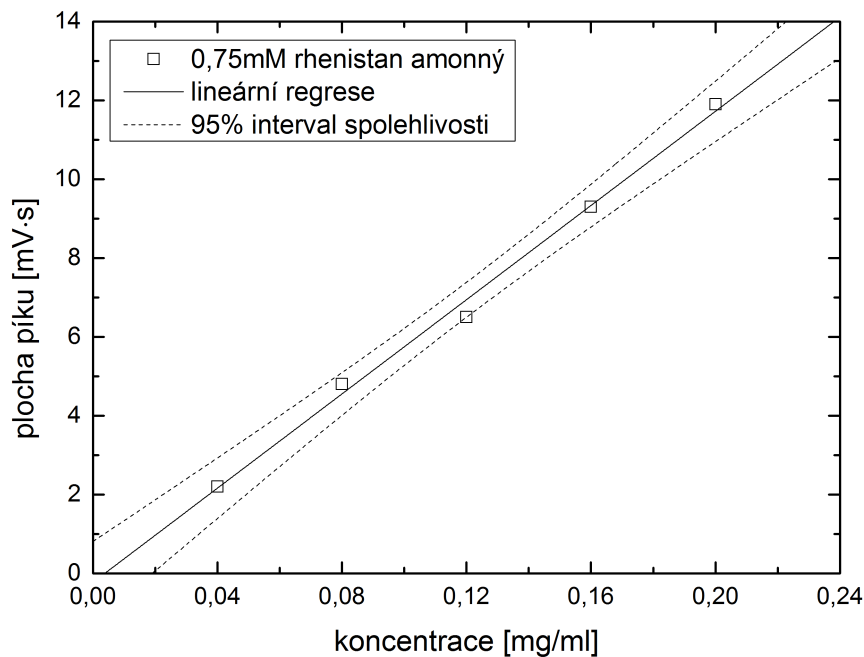
$$LOD = \frac{3 \cdot 0,311 + 0,23}{59,75} \quad (44)$$

$$LOD = 0,019 \text{ mg/ml} \quad (45)$$

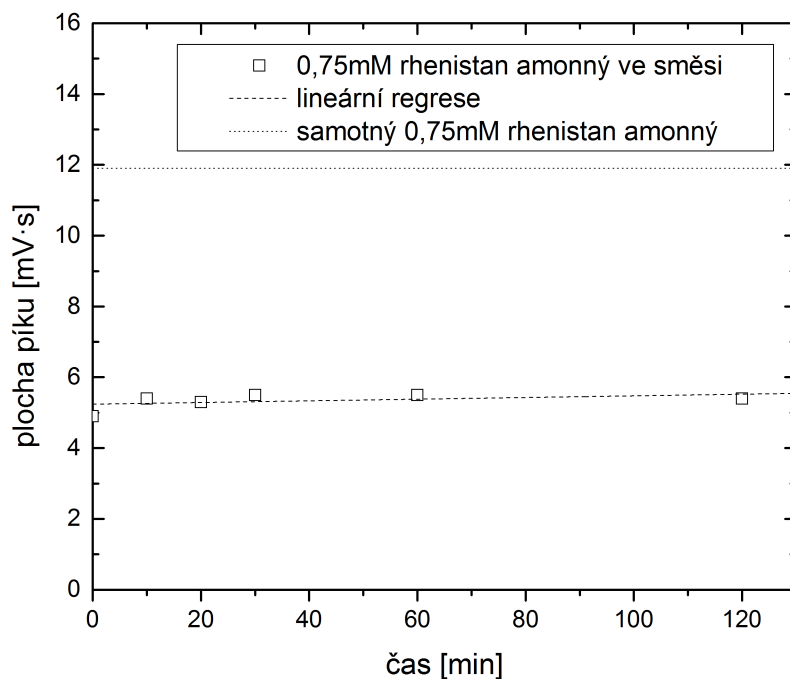
$$LOQ = \frac{10 \cdot 0,311 + 0,23}{59,75} \quad (46)$$

$$LOQ = 0,056 \text{ mg/ml} \quad (47)$$

Na obrázku 29 je uvedena závislost plochy píku rhenistanu amonného na čase. Plocha píku rhenistanu amonného je s časem neměnná, nicméně stejně jako v případě použití delší kapiláry, i zde je vidět, že došlo k redukci rhenistanu amonného. Ani při použití kratší kapiláry se nepodařilo zachytit začátek reakce redukce rhenistanu amonného. Reakce je okamžitá a metodou CZE nezachytitelná. Naměřená data jsou uvedena v tabulce 16 v příloze A.



Obrázek 28: Kalibrační závislost rhenistanu amonného. Měřeno pomocí 16,5 cm dlouhé kapiláry. Odečítáno při vlnové délce 200 nm. Rovnice regresní přímky: $y = 59,75 \cdot x - 0,23$. Hodnota korelačního koeficientu R^2 lineární regrese je 0,995.



Obrázek 29: Závislost plochy píku rhenistanu amonného na čase s použitím 16,5 cm dlouhé kapiláry. Kinetické měření bylo odečítáno při vlnové délce 200 nm. Jako nosný elektrolyt byl použit NE7.

5.3 Charakterizace vybraných komplexů rhenia s organickými ligandy pomocí pokročilých instrumentálních analytických technik

Jako vhodný ligand byl použit pyrogallol (benzen-1,2,3-triol). Jako redukční činidlo byl použit acetylhydrazin. Redukce byla provedena v prostředí acetátového pufru. Jako separační nosný elektrolyt v CZE byl použit NE1. Identita vzniklého komplexu byla potvrzena pomocí ESI/MS.

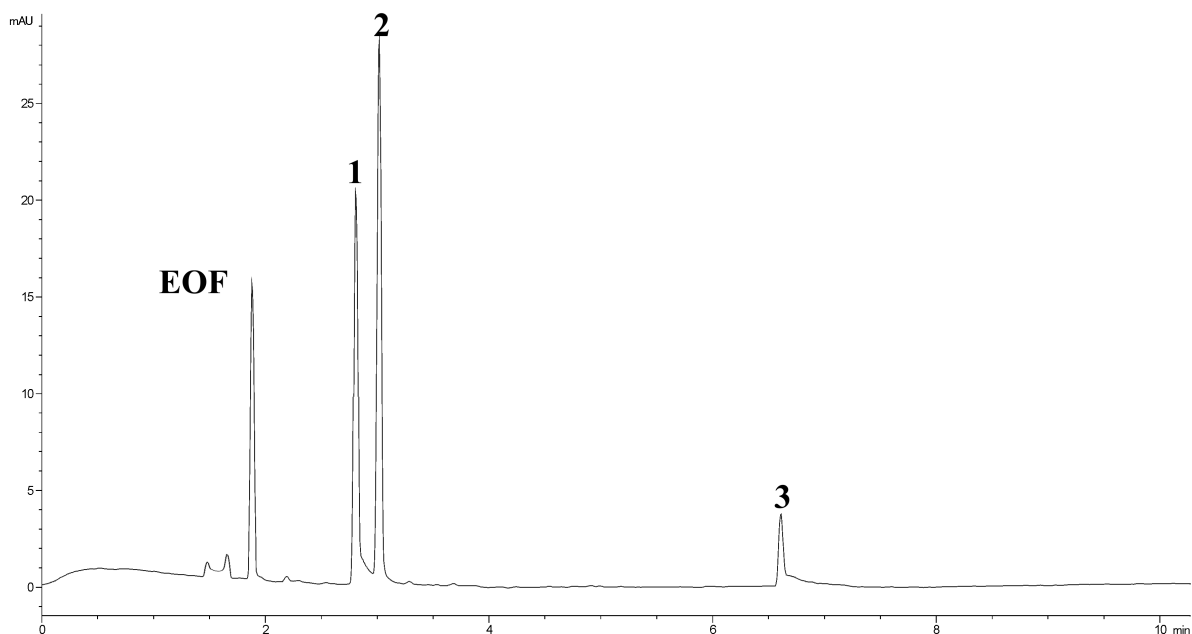
5.3.1 Posun rovnováhy redukce rhenistanu amonného vlivem přídavku komplexotvorného činidla

Z dosavadních experimentů vyplynulo, že redukce rhenistanu amonného probíhá velmi rychle a podíl zredukovaného rhenistanu výrazně závisí na molárním přebytku použitého redukčního činidla. Bylo prokázáno, že úplné redukce rhenistanu je možno dosáhnout až při extrémně vysokém přebytku acetylhydrazinu.

V následujícím experimentu byla prostudována možnost posunu rovnováhy reakce ve prospěch produktů redukce vlivem přídavku komplexotvorného činidla tvořícího pevný komplex s redukovanou formou rhenia. Z důvodu dostatečně citlivé detekce absorpčním fotometrickým detektorem byl jako vhodný ligand použit pyrogallol (benzen-1,2,3-triol) v čtyřnásobném molárním přebytku vůči látkovému množství výchozího rhenistanu. Jako redukční činidlo byl použit acetylhydrazin v desetinásobném molárním přebytku vůči výchozímu rhenistanu.

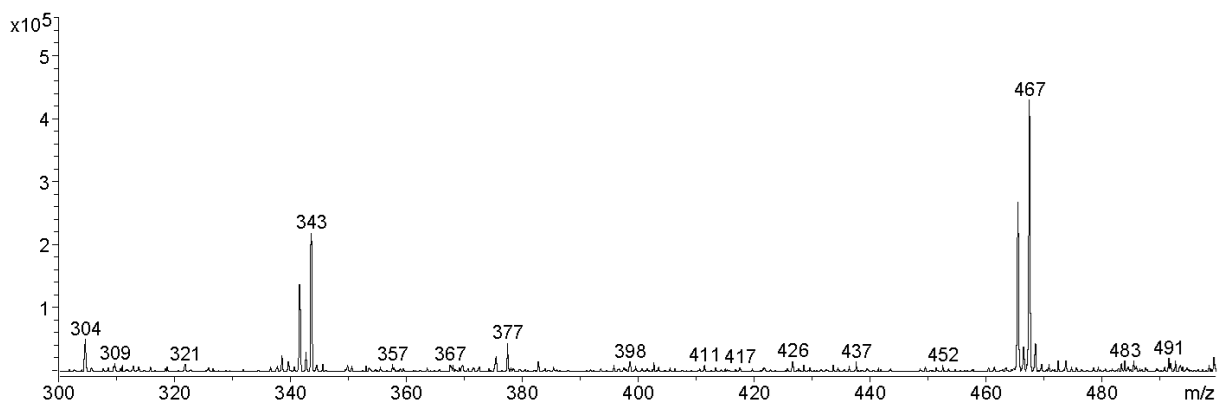
Redukce byla provedena v prostředí acetátového pufru. Jako separační nosný elektrolyt v CZE byl použit NE1, ve kterém pyrogallol migruje jako anion.

Na obrázku 30 je uveden elektroferogram redukční reakční směsi s přídavkem pyrogallolu jako komplexotvorného činidla. Z elektroferogramu je zřejmé, že výsledné složení redukční reakční směsi po přídavku pyrogallolu jako komplexotvorného činidla je výrazně odlišné, ve srovnání s dříve provedenými experimenty. Na elektroferogramu se objevily dominantní píky pro nezreagovaný acetylhydrazin migrující s elektroosmotickým tokem (EOF), rhenium(VII)–pyrogallolový komplex (1), pyrogallol (2) a rhenistan (3). Plocha píky nezredukovaného rhenistanu (3) je významně nižší, po kvantifikaci s pomocí příslušné kalibrační závislosti bylo vypočteno, že podíl zredukovaného rhenistanu přesahuje 84 %.

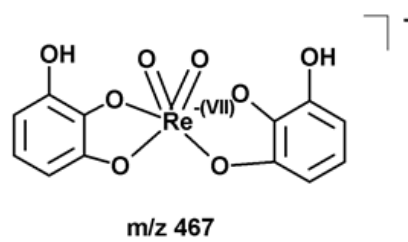


Obrázek 30: Záznam separace reakční směsi při redukcí rhenistanu amonného acetylhydrazinem v přítomnosti pyrogallolu jako komplexačního činidla; 1-rhenium(VII)–pyrogallolový komplex, 2-pyrogallol, 3-rhenistan. Nezareagovaný acetylhydrazin migruje s elektroosmotickým tokem (pík EOF).

Identita vzniklého komplexu byla potvrzena přímo v reakční směsi s pomocí ESI/MS. Na obrázku 31 je uvedeno odpovídající negativní hmotnostní spektrum komplexu. Komplex ve spektru poskytuje dominantní molekulární anion s charakteristickým izotopovým profilem odpovídajícím přítomnosti jednoho rheniového centrálního iontu. Určené m/z molekulárního aniontu potvrzuje přítomnost dvou navázaných ligandů. Pravděpodobná struktura vzniklého komplexu je uvedena na obrázku 32.



Obrázek 31: Negativní ESI/MS spektrum rhenium(VII)–pyrogallolového komplexu.



Obrázek 32: Strukturní vzorec rhenium(VII)–pyrogallolového komplexu.

6 Závěr

Nejprve byla proměřena redukce rhenistanu amonného kyselinou askorbovou. Měření ukázala, že počátek reakce nelze zachytit, protože reakce je příliš rychlá a metodou CZE nezachytitelná. K redukci rhenistanu amonného však došlo. V kyselém prostředí kyselina askorbová zredukovala plochu rhenistanu amonného o 27 %, v bazickém prostředí o 62 %.

Dále byl sledován možný vliv prostředí na redukci rhenistanu amonného kyselinou askorbovou. Tento experiment byl proveden v anaerobním prostředí a ukázal, že přítomnost vzdušného kyslíku nemá žádný vliv na podíl zredukováného rhenistanu amonného. Za anaerobních podmínek je procentuální úbytek srovnatelný s aerobním experimentem.

Poté bylo sledováno, zda má koncentrace kyseliny askorbové vliv na podíl zredukováného množství rhenistanu amonného. V kyselém prostředí došlo k redukci plochy rhenistanu v průměru o 27 %. Vliv koncentrace kyseliny askorbové na redukci rhenistanu amonného nebyl v tomto případě prokázán. V bazickém prostředí se tento experiment nepodařilo provést.

Dalším použitým redukčním činidlem byl acetylhydrazin. V kyselém prostředí se nepodařilo prokázat, že by koncentrace acetylhydrazinu měla vliv na množství úbytku plochy rhenistanu amonného. Kdežto v bazickém prostředí podíl zredukováného rhenistanu výrazně závisí na molárním přebytku acetylhydrazinu.

Pro ověření vlivu délky kapiláry k detektoru na redukci rhenistanu amonného byla proměřena stejná reakční směs (0,75mM rhenistan amonný, 16mM acetylhydrazin, 20mM acetátový pufr) pomocí kratší, 16,5 cm dlouhé, kapiláry. Došlo ke srovnatelné redukci rhenistanu amonného jako v předchozích případech a začátek reakce redukce se ani v tomto případě nepodařilo zachytit.

Další metodou, kterou byla sledována redukce rhenistanu kyselinou askorbovou, byla UV–VIS spektrometrie. Pro tento experiment byly proměřené dvě reakční směsi a slepé vzorky o různém složení. Vzhledem k tomu, že ve všech případech došlo k překryvu absorpčních spekter reagujících látek (tj. rhenistanu amonného a kyseliny askorbové), bylo konstatováno, že metoda UV–VIS spektrometrie má jen malou vypovídající schopnost o kinetice redukce.

Na závěr byla prozkoumána možnost posunu rovnováhy reakce ve prospěch produktů redukce vlivem přídavku komplexotvorného činidla.

Jako ligand byl použit pyrogallol (benzen-1,2,3-triol). Jako redukční činidlo byl použit acetylhydrazin. Redukce byla provedena v prostředí acetátového pufru. Z tohoto experimentu vyplynulo, že ve srovnání s dříve provedenými experimenty je výsledné složení redukční reakční směsi výrazně odlišné po přidavku pyrogallolu jako komplexotvorného činidla. Podíl zredukovaného rhenistanu amonného přesahuje 84 %. Identita vzniklého komplexu byla potvrzena přímo v reakční směsi s pomocí metody ESI/MS.

Seznam použitých zdrojů

- [1] Müller C., Dumas C., Hoffmann U., Schubiger A., Schibli R. Organometallic ^{99m}Tc -technetium(I)- and Re-rhenium(I)-folate derivatives for potential use in nuclear medicine. *Journal of Organometallic Chemistry*, 689:4712–4721, 2004.
- [2] Deutsch E., Libson K., Vanderheyden J-L., Ketring A.R., Maxon H.R. The chemistry of rhenium and technetium as related to the use of isotopes of these elements in therapeutic and diagnostic nuclear medicine. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B. Nuclear Medicine and Biology*, 13:465–477, 1986.
- [3] Hashimoto K., Yoshihara K. Rhenium complexes labeled with $^{186,188}\text{Re}$ for nuclear medicine. *Topics in Current Chemistry*, 176, 2005.
- [4] Abram U., Alberto R. Technetium and rhenium – coordination chemistry and nuclear medical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17, 2006.
- [5] Choudhry U., Greenland W. E. P., Goddard W. A., Maclellan T. A. J., Teat S. J., and Blower P. J. New routes to bioconjugates of rhenium using the oxo-bis(dithiolato)rhenate(v) core. *Dalton Transactions*, pages 311–317, 2002.
- [6] Kohlíčková-Koudelková M., Jedináková-Křížová V., Deyl Z. Study of perrhenate reduction by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 23:245–248, 2002.
- [7] Burešová H. *Studium faktorů ovlivňujících redukci rhenistanu*. Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2012.
- [8] Míková V. *Nukleární medicína*. Nakladatelství Galén, 2008. ISBN: 978-80-7262-533-8.
- [9] Kraft O., Pekárek J. *Radiofarmaka*. Ostravská univerzita v Ostravě, Lékařská fakulta, 2012. ISBN: 978-80-7464-183-1.
- [10] Dilworth J. R. and Parrott S. J. The biomedical chemistry of technetium and rhenium. *Chemical Society Reviews*, 27:43–55, 1998.

-
- [11] Hay R. W., Dilworth J. R. and Nolan K. B. *Perspectives on bioinorganic chemistry*. Jai press inc., Stamford, Connecticut, 1999. ISBN: 0-7623-0352-2.
- [12] Galiana-Balaguer L., Roselló S., Herrero-Martínez J. M., Maquieira A., and Nuez F. Determination of L-Ascorbic Acid in Lycopersicon Fruits by Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 296:218–224, 2001.
- [13] Davey M. W., Van Montagu M., Inzé D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzie J. J. I., Strain J. J., Favell D., Fletcher J. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the science of food and agriculture*, 80:825–860, 2000.
- [14] Dehmlaei A. and Vadi M. Comparative Study of Adsorption Isotherms of Vitamin C on Multi Wall and Single Wall Carbon Nanotube. *Oriental Journal of Chemistry*, 30(1):233–236, 2014.
- [15] Gastino A. and Vecchio D. G. The pro-healthy potential of kale. <http://flipper.diff.org/apprulesitems/items/7224>.
- [16] SÚKL. SPC - Souhrn údajů o přípravku ACIDUM ASCORBICUM Biotika. <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC106620.pdf&type=spc&as=acidum-ascorbicum-biotika-spc>.
- [17] Lewalter J., Biedermann P. Hydrazine and N-acetylhydrazine. *Biomonitoring Methods*, 6:141–161, 1998.
- [18] Sigma – Aldrich. Acetylhydrazide. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/a8309>.
- [19] Tafazoli S., Mashregi M., O'Brien P.J. Role of hydrazine in isoniazid-induced hepatotoxicity in a hepatocyte inflammation model. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 229:94–101, 2008.
- [20] Kolafa J. Vybrané kapitoly z fyzikální chemie. <https://old.vscht.cz/fch/cz/pomucky/kolafa/vybrkap-tisk.pdf>.
- [21] Bartovská L. Chemická kinetika. <https://old.vscht.cz/fch/cz/pomucky/bartovska/06-Kinetika1.pdf>.

-
- [22] Nesměrák K., Křížek T. Kinetické metody analýzy. *Přednášky k předmětu MC230P07 na PřF UK*, 2016 - 2017.
- [23] Prince Technologies' CE technologies. Introduction to capillary electrophoresis. <http://www.princetechnologies.eu/products/ce-systems/ce-technologies/ce-introduction/>.
- [24] Lauer H. H., Rozing G. P. *High performance capillary electrophoresis*. Agilent Technologies, 2009. ISBN: 5990-3777EN.
- [25] Glatz Z. Kapilární elektromigrační metody. <http://orion.chemi.muni.cz/virtuallab/prednasky/CZE.pdf>.
- [26] Kašička V. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy*, 91:320–329, 1997.
- [27] Lindsay S. *High performance liquid chromatography*. Chichester: Wiley, 1992. ISBN: 0471931152.
- [28] Clark J. High performance liquid chromatography - HPLC. <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>.
- [29] Coufal P. High performance liquid chromatography - HPLC. <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>.
- [30] Štícha M. Hmotnostní spektrometrie. *Přednášky k předmětu MC230P71 na PřF UK*, 2016 - 2017.
- [31] Gross J. H. *Mass spectrometry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004. ISBN: 978-3-642-07388-5.
- [32] Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P. *Spektrometrické analytické metody I*. Karolinum, 1997. ISBN: 80-7184-365-2.
- [33] Förster H. *UV/VIS spectroscopy*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2004. DOI: 10.1007/b94239.
- [34] Červený V. Molekulová absorpční spektrometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti záření. *Přednášky k předmětu MC230P04N na PřF UK*, 2016 - 2017.

-
- [35] Kania P. *Infračervená spektrometrie*, VŠCHT Praha.
- [36] Stuart B. *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*. John Wiley and Sons, Ltd, 2004. ISBN: 0-470-85427-8.
- [37] Sulovský P. *Infračervená spektroskopie*. http://www.sci.muni.cz/~sulovsky/Vyuka/Lab_metody/Infracervena_spektroskopie.pdf.
- [38] Praus P., Vontorová J. *Analytická chemie II*. Vysoká škola báňská–Technická univerzita Ostrava, 2015. ISBN: 978-80-248-3734-5.
- [39] Holčapek M. *Nukleární magnetická rezonance (NMR)*. http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska4_NMR_teorie.pdf.
- [40] Katedra analytické chemie, Univerzita Karlova, 2017. *Návody k praktickým úlohám, pokročilé praktikum z analytické chemie*. <http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/navody.pdf>.

Příloha A – Naměřená data

V tabulce 10 jsou uvedené naměřené hodnoty ploch píků kyseliny askorbové a rhenistanu amonného v závislosti na čase. Tato reakční směs byla proměřena za použití NE1 jako nosného elektrolytu.

Tabulka 10: Naměřené hodnoty ploch píků kyseliny askorbové a rhenistanu amonného v závislosti na čase.

| Čas [min] | Plocha [mV·s] – kyselina askorbová | Plocha [mV·s] – rhenistan |
|-----------|------------------------------------|---------------------------|
| 0 | 360,5 | 43,0 |
| 47 | 340,0 | 42,3 |
| 70 | 328,0 | 41,4 |
| 238 | 270,0 | 40,9 |
| 281 | 257,6 | 40,9 |
| 358 | 234,4 | 40,9 |
| 1325 | 111,3 | 42,7 |
| 1514 | 88,3 | 43,0 |
| 1655 | 72,1 | 42,4 |
| 2661 | 25,9 | 44,8 |
| 3040 | 13,0 | 45,5 |
| 3139 | 4,2 | 45,5 |

V tabulce 11 jsou uvedené naměřené hodnoty ploch píků kyseliny askorbové a rhenistanu amonného v závislosti na čase. Reakční směs byla proměřena v prostředí NE4.

Tabulka 11: Naměřené hodnoty ploch píků kyseliny askorbové a rhenistanu amonného v závislosti na čase.

| Čas [min] | Plocha [mV·s] – kyselina askorbová | Plocha [mV·s] – rhenistan |
|-----------|------------------------------------|---------------------------|
| 0 | 709,5 | 17,4 |
| 21 | 707,6 | 18,6 |
| 41 | 699,9 | 17,0 |
| 62 | 687,5 | 16,9 |
| 269 | 540,2 | 16,4 |
| 290 | 538,6 | 17,4 |
| 310 | 538,5 | 17,2 |
| 331 | 539,3 | 16,9 |
| 404 | 533,1 | 17,5 |
| 425 | 523,4 | 17,6 |
| 445 | 527,7 | 17,3 |
| 466 | 519,9 | 17,5 |
| 1091 | 403,3 | 21,4 |
| 1112 | 395,9 | 21,1 |
| 1189 | 377,9 | 20,8 |
| 1336 | 339,3 | 19,9 |
| 1599 | 271,8 | 21,2 |
| 1625 | 264,6 | 21,3 |
| 1649 | 265,4 | 20,9 |

V tabulce 12 jsou uvedené naměřené hodnoty ploch píků kyseliny askorbové a rhenistanu amonného v závislosti na čase. Tato reakční směs byla proměřena v anaerobním prostředí za použití NE4 jako nosného elektrolytu.

Tabulka 12: Naměřené hodnoty ploch píků kyseliny askorbové a rhenistanu amonného v závislosti na čase. Měřeno v anaerobním prostředí.

| Čas [min] | Plocha [mV·s] – kyselina askorbová | Plocha [mV·s] – rhenistan |
|-----------|------------------------------------|---------------------------|
| 0 | 740,0 | 24,1 |
| 60 | 731,0 | 24,0 |
| 120 | 725,0 | 23,7 |
| 240 | 730,0 | 23,2 |
| 300 | 738,0 | 24,1 |
| 380 | 745,0 | 25,1 |
| 500 | 739,0 | 25,0 |
| 620 | 744,0 | 25,3 |
| 800 | 747,0 | 25,0 |
| 1280 | 761,0 | 28,3 |
| 1400 | 758,0 | 29,4 |
| 1620 | 765,0 | 28,8 |

V tabulce 13 jsou uvedené naměřené hodnoty plochy píku rhenistanu amonného v závislosti na koncentraci kyseliny askorbové. Reakční směs byla proměřena za použití NE4 jako nosného elektrolytu.

Tabulka 13: Naměřené hodnoty plochy píku rhenistanu amonného v závislosti na koncentraci kyseliny askorbové. Měřeno v NE4.

| Koncentrace kyseliny askorbové [mmol/l] | Plocha píku rhenistanu amonného [mV·s] |
|---|--|
| 0,75 | 30,0 |
| 1,5 | 24,0 |
| 7,5 | 25,0 |
| 15 | 30,0 |
| 75 | 22,0 |
| 225 | 33,0 |

V tabulce 14 jsou uvedené naměřené hodnoty plochy píku rhenistanu amonného v závislosti na koncentraci acetylhydrazinu. Reakční směs byla proměřena v prostředí NE4.

Tabulka 14: Naměřené hodnoty plochy píku rhenistanu amonného v závislosti na koncentraci acetylhydrazinu. Měřeno v NE4.

| Koncentrace acetylhydrazinu [mmol/l] | Plocha píku rhenistanu amonného [mV·s] |
|--------------------------------------|--|
| 0,75 | 37,0 |
| 1,5 | 40,0 |
| 7,5 | 45,0 |
| 15 | 38,0 |
| 75 | 47,0 |
| 225 | 39,0 |
| 375 | 45,0 |
| 600 | 38,0 |
| 750 | 38,0 |

V tabulce 15 jsou uvedené naměřené hodnoty plochy píku rhenistanu amonného v závislosti na koncentraci acetylhydrazinu. Reakční směs byla proměřena v prostředí NE6.

Tabulka 15: Naměřené hodnoty plochy píku rhenistanu amonného v závislosti na koncentraci acetylhydrazinu. Měřeno v NE6.

| Koncentrace acetylhydrazinu [mmol/l] | Plocha píku rhenistanu amonného [mV·s] |
|--------------------------------------|--|
| 0,75 | 25,0 |
| 1,5 | 38,0 |
| 7,5 | 45,0 |
| 15 | 48,0 |
| 75 | 60,0 |
| 225 | 61,0 |
| 375 | 62,0 |
| 600 | 100,0 |
| 750 | 100,0 |

V tabulce 16 jsou uvedené naměřené hodnoty plochy píku rhenistanu amonného v závislosti na čase. Pro toto kinetické měření rekční směsi byla použita kratší kapilára o celkové délce 16,5 cm. Měřeno v NE7.

Tabulka 16: Naměřené hodnoty plochy píku rhenistanu amonného v závislosti na čase. Měření proběhlo pomocí kratší, 16,5 cm dlouhé, kapiláry.

| Čas [min] | Plocha [mV·s] |
|-----------|---------------|
| 0 | 4,9 |
| 10 | 5,4 |
| 20 | 5,3 |
| 30 | 5,5 |
| 60 | 5,5 |
| 120 | 5,4 |

Příloha B – Publikace

[1] Kaliba D., Štícha M., Jelínek I., Poláková J., Radová J. *Application of capillary electrophoresis to the separation of rhenium complex of 1,2,3-trihydroxybenzene*. *Monatsh Chem* 148:1619, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00706-017-1982-0>

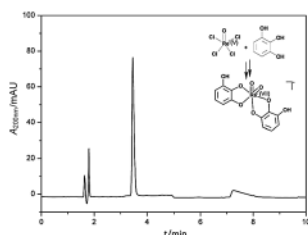
Application of capillary electrophoresis to the separation of rhenium complex of 1,2,3-trihydroxybenzene

David Kaliba¹ · Martin Štícha² · Ivan Jelínek¹ · Jana Poláková² · Jana Radová¹

Received: 26 January 2017 / Accepted: 10 April 2017 / Published online: 4 July 2017
© Springer-Verlag Wien 2017

Abstract A capillary zone electrophoretic method has been developed for a separation of a reaction mixture of a rhenium complex. The rhenium complex was synthesized in a reaction of a rhenium precursor and 1,2,3-trihydroxybenzene in acetonitrile with triethylamine addition. The capillary electrophoretic method has been used for the separation in borate and phosphate buffer (pH 6.30–11.80). All components in the reaction mixture (unreacted precursor, ligand, and final rhenium complex) have been determined by capillary zone electrophoresis with UV–Vis detection in an aqueous running electrolyte within 10 min. Dependencies of effective electrophoretic ion mobility on the pH value have been determined for the ligand, unreacted precursor, and final complex in both electrolytes.

Graphical abstract



Keywords Capillary zone electrophoresis · Coordination chemistry · Metal complexes · Organometallic compounds · Transition metal compounds

Introduction

Medical inorganic chemistry is rapidly developing. It offers new possibilities in pharmaceutical industries, which have been traditionally dominated by organic chemistry so far. In developing diagnostics radiopharmaceuticals, a rising attention is paid to the incorporation of radionuclides with optimal decay characteristics into tracer molecules. In this respect, technetium-99 m is an ideal choice (γ -emitter, $E_{MAX} = 140$ keV, $t_{1/2} = 6$ h). It is well established in nuclear medicine and available from commercial $^{99}\text{Mo}/^{99}\text{Tc}$ generator columns [1–5]. Furthermore, the radionuclides of rhenium, the Group 7 congener of Tc, are β -emitters with suitable properties for therapeutic applications (^{186}Re , $E_{MAX} = 1.07$ MeV, $t_{1/2} = 90$ h, ^{188}Re , $E_{MAX} = 2.12$ MeV, $t_{1/2} = 17$ h) [6, 7]. In addition, the rhenium isotopes possess approximately the same photon emission energy as that of $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Owing to this property, it is possible to monitor the biodistribution of rhenium radiopharmaceuticals with the same equipment employed for the $^{99\text{m}}\text{Tc}$ agents [8]. The oxidation state +V has been investigated most commonly among the numerous oxidation states of technetium and rhenium, owing to its diverse coordination chemistry.

Transition metal-oxo-complexes show a fascinating variety of structures and reactivities. There is a considerable interest in the chemistry of inorganic compounds containing an oxygen atom that is multiply bonded to a transition metal. Oxo-complexes are catalysts for organic reactions, provide a model for active sites in heterogenous

✉ David Kaliba
kalibad@natur.cuni.cz

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 8, 128 43 Prague 2, Czech Republic

processes, and are very useful reagents in coordination chemistry [9–12]. They also play a significant role in the catalyst cycles of a variety of metalloenzymes (cytochrome P-450), nitrogenase, and xanthine oxidase [13, 14]. The preparation of complex compounds labeled by ^{186}Re and ^{188}Re atoms is more complicated than the preparation of monovalent ions complexes (e.g., holmium and yttrium). The reason is that for a successful complex formation, it is necessary to lower the oxidation state of rhenium by the reduction with SnCl_2 .

The analytical control of pharmaceutical substances includes the determination of radionuclidic, radiochemical, and chemical purity. Thin-layer chromatography with radiometric detection has been commonly used for the analysis of rhenium pharmaceuticals, mainly for the determination of the radiochemical complexation yield. Nevertheless, this method is neither suitable for the separation of labeled complexes of similar character nor for the determination of physicochemical constants of complex compounds. For the latter purpose, electromigration methods (capillary zone electrophoresis etc) have been successfully applied to study rhenium and technetium complexes [15–17]. Several applications of capillary electrophoresis were demonstrated to study rhenium reduction by changing stannous chloride concentration and influence of stannous chloride on the complexation of rhenium complexes with 1-hydroxyethylidenediphosphonic acid [18–20]. Capillary electrophoresis was also used for structural characterization of rhenium compounds of glycyglycylcysteine and cysteineglycine synthesized in ligand exchange reactions [21].

In our previous contribution, we pointed out a suitability of a low resolution ESI-MS for a fast structural identification of selected rhenium complexes in a mixture [22]. We discovered that the stability of selected rhenium compounds, especially with aromatic ligands, depends on a presence of the oxygen or the accelerator.

The aim of this study is to investigate a simple electrophoretic method for a separation of individual components (an unreacted precursor, ligand, and final rhenium complex) in the reaction mixture using capillary zone electrophoresis with UV-Vis detection in aqueous running electrolytes. Borate and phosphate buffers were used as background electrolytes (pH 6.30–11.80). All components of the reaction mixture were successfully separated within 10 min.

Results and discussion

Optimization of the method

The reaction mixture of rhenium precursor with an excess of pyrogallol (PG) in acetonitrile yields the rhenium(VII)-

PG complex **1**. The unreacted PG and precursor are minor components in a reaction mixture. They possess an ionic character, a sufficient solubility and stability in aqueous solutions, and show an appreciable absorbance at 200 nm. Capillary zone electrophoresis (CZE) separation was optimized with respect to the pH and concentration of background buffers. The separation voltage and injection time were optimized to achieve at least baseline resolution of all compounds in the shortest time possible.

Effect of buffer pH

The compounds' migration behavior was studied under changing pH values: 6.20–11.60 for the borate buffer and 7.50–11.80 for the phosphate buffer. The concentration of a buffer co-ion was kept 5–10 mmol. The actual peak shapes of PG in series of borate buffers within the pH range 6.20–11.60 are shown in Fig. 1. PG acts as a weak acid and migrates as an anion. Almost symmetrical peak shapes observed under slightly acidic and slightly alkaline buffers change to the shape of a fronting triangle under strong alkaline buffers.

Separation in phosphate buffers

All CZE measurements in series of phosphate buffers covering the pH interval from 7.50 to 11.80 enabled to evaluate fundamental acid–base characteristics of the studied compounds. It is evident from the dependencies of effective mobility on the pH value (Fig. 2) that the complex **1** behaves as a fully dissociated strong electrolyte with a dominant negative charge. The effective electrophoretic

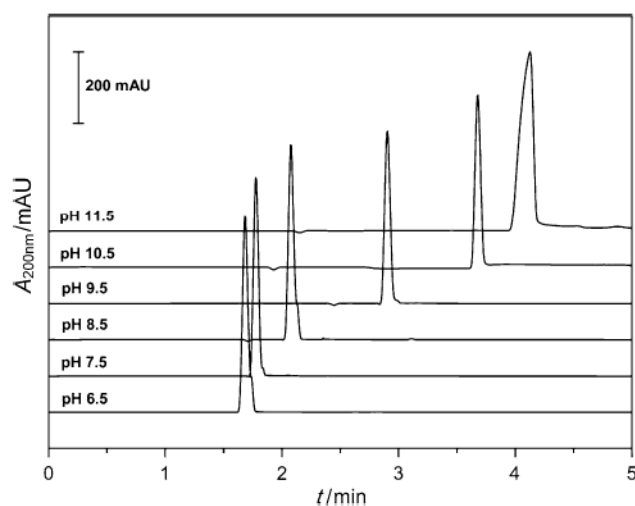


Fig. 1 Effect of a buffer pH on the migration behavior of ligand 1,2,3-trihydroxybenzene at 5–10 mmol borate buffer (pH from 6.50 to 11.50 in increments of 1). CE conditions: 25 °C, 25 kV, 16–30 μA , and 200 nm detection. Initial concentration of the ligand 0.2 mg cm^{-3}

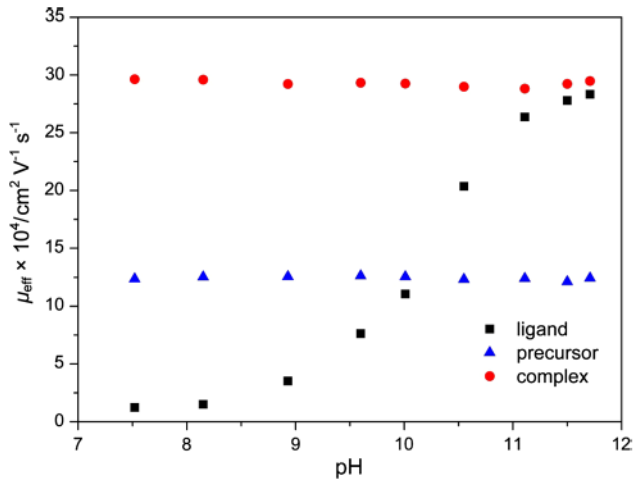


Fig. 2 Dependence of the migration times of the unreacted precursor, unreacted ligand, and complex upon the pH of 10 mmol phosphate buffer. CE conditions: 25 °C, 25 kV, 13–25 μ A, and 200 nm detection. Initial concentration conditions: ligand (0.16 mg cm^{-3}) and precursor (0.29 mg cm^{-3})

mobility of the complex **1** remains constant within the studied pH range. Obviously, the same characteristic was observed for the precursor. PG behaves as a weak acid and provides a characteristic sigmoidal dependence. Its point of inflection at pH 10.20 correlates with the tabulated pK value of PG [23].

Separation in borate buffers

The effective ion mobility dependencies on the pH value for the complex **1**, perrhenate, and PG within the pH interval 6.20–11.60 are shown in Fig. 3. In case of the perrhenate and the complex **1**, the dependencies are linear with zero slopes. A slight increase of an effective electrophoretic mobility of the complex **1** for the highest pH values indicates a possible dissociation of PG ligands non-coordinated hydroxyl group. PG behaves as a weak acid. However, the rate of PG dissociation and ionic mobility is significantly shifted, compared to the measurements in the phosphate buffers. This difference can be explained by a formation of a complex with boric acid promoting PG acidic character. A borate buffer of pH 7.50 was selected for the compounds' reasonable migration time, better separation, greater absorbance, and fairly good peak shapes. All components were separated and quantified in the borate buffer (pH 7.50), as displayed in Fig. 4.

Linearity

The calibration curves were plotted (concentration vs. peak area) in the concentration range from 1.000 to 10.00 $\mu\text{g mm}^3$ for the rhenium precursor and PG. The

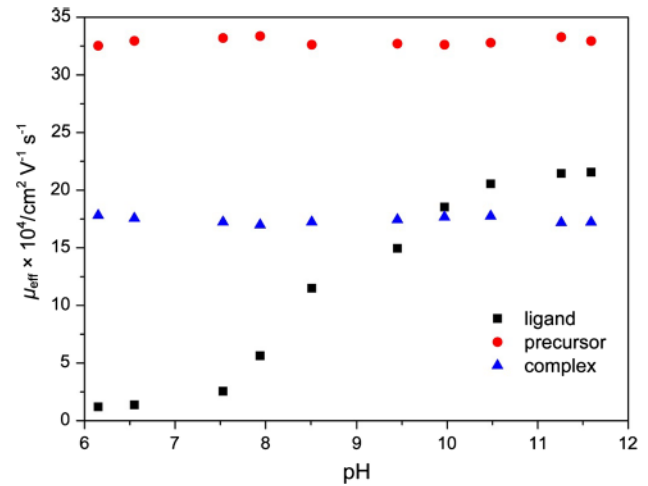


Fig. 3 Dependence of the migration times of the unreacted precursor, unreacted ligand, and complex upon the pH of 10 mmol borate buffer. CE conditions: 25 °C, 25 kV, 12–30 μ A, and 200 nm detection. Initial concentration conditions: ligand (0.16 mg cm^{-3}) and precursor (0.29 mg cm^{-3})

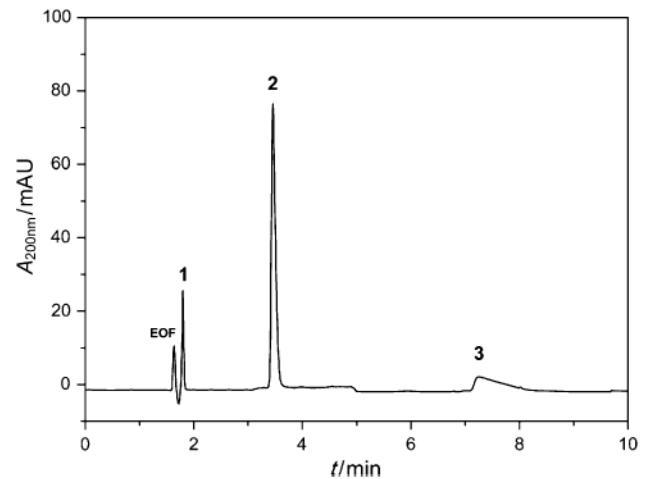


Fig. 4 Electropherogram of the standard mixture solution containing PG (**1**), complex (**2**), and unreacted precursor (**3**) after 60 min of reacting with the addition of 16 equivalents of TEA. 10 mmol borate buffer, pH 7.50. CE conditions: 25 °C, 25 kV, 13–25 μ A, and 200 nm detection. Initial concentration conditions: ligand (0.16 mg cm^{-3}) and precursor (0.29 mg cm^{-3})

linearity of the calibration curves for the final complex has not been developed. The response was linear with the coefficient of determination (R^2) = 0.989 for the rhenium precursor and 0.992 for the PG. Regression equations, linear ranges, and values of coefficient of determination are shown in Table 1.

Concentrations of the PG, complex **1**, and perrhenate were calculated based on calibration curves and plot areas. After 60 min of reacting, the concentration of the PG has decreased by 85% from the initial concentration 0.16 mg cm^{-3} (average area 151 AU) to 0.025 mg cm^{-3}

Table 1 Analytical data for the determination of analytes

| Analytes | R^2 | Linear range/ $\mu\text{g mm}^{-3}$ | LOD/ $\mu\text{g mm}^{-3}$ | LOQ/ $\mu\text{g mm}^{-3}$ | Standard errors of intercept | Standard errors of slope |
|-----------|-------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------|
| Precursor | 0.989 | 1–10 | 0.152 | 0.458 | 124.5 | 10.1 |
| Ligand | 0.992 | 1–10 | 0.184 | 0.543 | 99.8 | 15.7 |

(area 22.7 AU). The concentration of the perrhenate decreased from 0.29 to 0.07 mg cm^{-3} (75%).

Conclusion

A capillary zone electrophoresis was used as a fast separation method suitable for a monitoring of the rhenium(VII)-pyrogallol complex formation directly in a reaction mixture. An optimized capillary zone electrophoresis (CZE) method provided highly resolved peaks of a rhenium(VII)-pyrogallol complex, pyrogallol (PG), and perrhenate—major reaction mixture compounds. Based on the obtained calibration data, it was possible to quantify these compounds. The proposed CZE method is considered to be a complementary method to HPLC. It is going to be utilized for an optimization of rhenium complex preparation procedures and for a purity check of isolated complexes.

CZE provided additional data concerning the acid–base characteristics of the separated compounds. The measured dependencies of the effective electrophoretic mobility of the rhenium(VII)-PG complex on the pH value in phosphate and borate buffers are linear with zero slopes. This confirms the rhenium complex to have a character of a strong electrolyte, migrating as a singly charged anion throughout monitored pH range. A slight increase in effective ion mobility for studied borate buffer with highest pH value is probably connected with an additional dissociation of a non-coordinated hydroxyl group on a PG ligand. A significant difference in a degree of dissociation of a PG in borate and phosphate buffers indicates the formation of the PG-borate buffer by-product with an increased acidity and ionic mobility.

Experimental

Tetrabutylammonium tetrachlorooxorhenate [$(n\text{-Bu}_4\text{N})(\text{ReOCl}_4)$] and triethylamine (TEA, used as a 10% (w/w) stock solution in acetonitrile) were purchased from Sigma-Aldrich (Gillingham, Dorset, UK). Ligand 1,2,3-trihydroxybenzene (99%) was purchased from Alfa Aesar (Karlsruhe, GER). Acetonitrile HPLC grade was purchased from Lach-Ner (Neratovice, CZE). Electrospray tuning mix for ion trap was purchased from Agilent (Santa Clara, USA). Boric acid

(98%), sodium tetraborate (99%), sodium hydrogenphosphate (99%), and sodium dihydrogenphosphate monohydrate (99%) for background electrolytes were purchased from Lachema (Brno, CZE). Sodium hydroxide (99%) was purchased from Fisher Scientific (Pardubice, CZE).

Instrumentation

A capillary electrophoresis system 7100 (Agilent Technologies, Walbronn, GER) equipped with an on-line diodearray detector (DAD) operated at 200 nm was used. Table 2 summarizes experimental CZE parameters for the individual buffers. For each electropherogram, spectra were registered in the range 200–600 nm each 2 nm, at regular steps 0.8 s for a total time of 5–20 min.

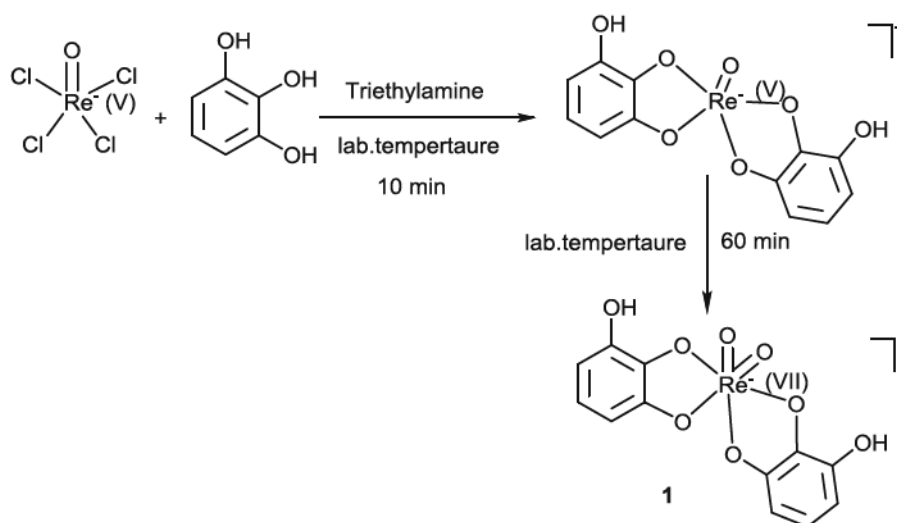
Solid substances were weighted using Sartorius 7085011 micro balances (Sartorius GmbH, Gottingen, GER). The pH values of background electrolytes were followed by pH XS pH50 lab (Verkon, CZE), calibrated by calibration solutions containing potassium hydrogen phthalate (pH 4.00), disodium hydrogen phosphate/potassium dihydrogen phosphate (pH 7.00), and sodium hydrogen carbonate/sodium carbonate (pH 10.01) (Merck, GER).

The electrospray mass spectrometry (ESI–MS) experiments were conducted on an ion trap instrument Esquire 3000 (Bruker Daltonics, GER) and controlled by the Esquire Control 5.3.11 software and data were processed via Data Analysis 3.3.56 software (Bruker Daltonics, GER). ESI–MS data were collected in a negative ion mode at a scan range from $m/z = 300\text{--}650$. In all ESI–MS measurements, the nebulizer gas pressure was 124.1 kPa at a flow rate $5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$, the desolvation temperature was 300 °C, and capillary voltage was

Table 2 Experimental parameters for CZE measurements

| Parameter | Borate buffer | Phosphate buffer |
|-----------------------------|---------------|------------------|
| Voltage applied/kV | 25 | 25 |
| Hydrodynamic injection/mbar | 30 | 30 |
| Injection time/s | 30 | 30 |
| DAD detector/nm | 200 | 200 |
| Current/A | 12–30 | 13–25 |
| Cassette temperature/°C | 25 | 25 |
| Analysis time set/min | 5 | 10 |
| Buffer concentration/mmol | 5–10 | 5–10 |
| pH | 6.23–11.59 | 7.52–11.83 |

Scheme 1



adjusted to 4000 V. The sample solutions were delivered to the nebulizer by a syringe pump (Cole Parmer, USA) at a flow rate $8 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$.

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on CD_3CN solutions on a Bruker Varian (300.54 and 100.11 MHz) NMR spectrometer (Bruker Corporation, USA). IR spectra were recorded on a NICOLET 380 FTIR ThermoScientific instrument using KBr discs (ThermoScientific, USA).

Bis(1,2,3-trihydroxybenzene)dioxorhenium(VII) complex (1, $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_8\text{Re}$)

The reaction of 0.88 mg (*n*-But₄)[ReOCl_4] (1.42 μmol) with 0.48 mg 1,2,3-trihydroxybenzene (PG, 3.81 μmol) in 3 cm^3 acetonitrile was performed at the room temperature. After 10 min, 16 equivalents of TEA (52.5 mm^3 of 10% TEA solution in acetonitrile) were added. The resulting yellow colored solution containing the major compound bis(1,2,3-trihydroxybenzene)dioxorhenium(V) ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_7\text{Re}$) changed in the presence of TEA to a brown solution with bis(1,2,3-trihydroxybenzene)dioxorhenium(VII) (1, $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_8\text{Re}$) as the major complex after 60 min. After evaporation of acetonitrile, the crude product was recrystallized from a state solvent used for a recrystallization of 1 to obtain 0.63 mg of a yellow solid with 90% yield. IR and NMR spectra were found to be identical with the ones described in [24]. Mass values: theoretical monoisotopic $m/z = 466.9$ (M^-) and obtained by ESI-MS $m/z = 466.6$ (M^-). The reaction scheme of a complex preparation and structure of intermediate are shown in Scheme 1.

Electrophoresis

The separation was performed in fused silica capillaries [50 cm (41.5 cm to detector) \times 50 μm I.D.] from Polymicro

Technologies (Phoenix, AZ, USA) operated at 25 $^\circ\text{C}$. Capillaries were rinsed with 100 mmol aqueous sodium hydroxide for 60 min and distilled water for 60 min before the use. At the beginning of the day, the capillary was rinsed with water for 10 min (90 kPa), flushed with an aqueous NaOH 100 mmol for 10 min, and rinsed with water for 5 min (90 kPa). For the separation, the capillary was previously flushed with BGE for 1.5 min (90 kPa) and after the separation, in the post-conditioning; it was rinsed with water (1.5 min, 90 kPa) and BGE (1.5 min, 90 kPa). In every three injections, the post-conditioning was changed as follows: rinse with water for 10 min (90 kPa), flush with aqueous NaOH 100 mmol (90 kPa, 5 min), and rinse with water for 5 min (90 kPa).

All 5–10 mmol phosphate and borate electrophoresis buffers were prepared by weighing adequate amounts of sodium hydrogenphosphate, sodium dihydrogenphosphate, boric acid, and sodium tetraborate, respectively, and dilution in ultrapure water. The pH values of prepared running buffers were adjusted to appropriate value by a saturated solution of sodium hydroxide.

Acknowledgements This research was carried out within the framework of the project of the Specific University Research (SVV 260440). The Norwegian Financial Mechanism Project CZ01116 is gratefully acknowledged.

References

1. Dilworth JR, Parrott SJ (1998) Chem Soc Rev 27:43
2. Hom RK, Katzenellenbogen JA (1997) Nucl Med Biol 24:485
3. Jurisson S, Berning D, Jia W, Ma D (1993) Chem Rev 93:1137
4. Pinkerton TC, Desilets CP, Hoch DJ, Mikelsons MV, Wilson GM (1985) J Chem Ed 62:965

5. Deutsch E, Libson K (1984) *Comments Inorg Chem* 3:83
6. Spies H, Fietz T, Glacer M, Pietsch HJ, Johanssen B (1995) *Technetium and rhenium chemistry and nuclear medicine*. S.G. Editorali, Padua
7. Yorke ED, Beaumier PL, Wessels BW, Fritzberg AR, Morgan AC (1991) *Nucl Med Biol* 18:827
8. Schubiger PA, Alberto R, Smith A (1996) *Bioconjug Chem* 7:165
9. Michos D, Luo XL, Crabtree RH (1992) *J Chem Soc Dalton Trans* 10:1735
10. Connac F, Lucchese Y, Dartiguenave M, Beauchamp AL (1997) *Inorg Chem* 36:256
11. Leigh GJ, Morris RH, Pickett CJ, Stanley DR, Chatt J (1981) *J Chem Soc Dalton Trans* 3:800
12. Over DE, Critchlow SC, Mayer JM (1992) *Inorg Chem* 31:4643
13. Groves JT, Nemo TE (1983) *J Am Chem Soc* 105:5786
14. Burgmayer SJN, Stiefel EI (1985) *J Chem Ed* 62:943
15. Wittrisch H, Conradi S, Rohde E, Vogt J, Vogt C (1997) *J Chromatogr A* 781:407
16. Jankowsky R, Friebe M, Noll B, Johanssen B (1999) *J Chromatogr A* 833:83
17. Van Schepdael A, Verbeke K, Van Nerom C, Hoogmartens J, Verbruggen A (1997) *J Chromatogr B* 697:251
18. Kohlíčková-Koudelková M, Jedináková-Křížová V, Deyl Z (2002) *Electrophoresis* 23:245
19. Koudelková M, Jedináková-Křížová V (2003) *J Chromatogr A* 990:317
20. Kohlíčková-Koudelková M, Konířová R, Jedináková-Křížová V (2003) *J Radioanal Nucl Chem* 258:627
21. Jankowsky R, Kirsch S, Reich T, Spies H, Johanssen B (1998) *J Inorg Biochem* 70:99
22. Sticha M, Jelinek I, Polakova J, Kaliba D (2015) *Anal Lett* 48:2329
23. Kim H, Chung TD, Kim H (2001) *J Electrochem Chem* 498:209
24. Kaliba D, Sticha M, Jelinek I (2017) *Transit Met Chem* 42:211