UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Využití hmotnostní spektrometrie a dalších analytických technik pro analýzu rheniových komplexů

Utilization of mass spectrometry and other analytical techniques for analysis of rhenium complexes

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

Konzultant: RNDr. Martin Štícha

Praha 2016

Bc. Petra Vaňátková

Prohlášení o autorství

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, pod vedením doc. RNDr. Ivana Jelínka, CSc. a školitele RNDr. Martina Štíchy, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne ……

…….

Bc. Petra Vaňátková

Poděkování

Na úvod své diplomové práce bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Ivanu Jelínkovi, CSc. a školiteli RNDr. Martinu Štíchovi za odborné vedení, všestrannou pomoc a cenné připomínky při vypracovávání této práce.

Abstrakt

Rheniové komplexy s vybranými organickými ligandy jsou perspektivními radiodiagnostiky používanými v nukleární medicině. Pro jejich lékařské využití je nutná detailní znalost jejich chemických a farmakologických vlastností a musí být k dispozici vhodné analytické metody pro hodnocení čistoty aplikovaných preparátů. V této práci byly připraveny vybrané komplexy rhenia s pyrogalolem, 1,2-dihydroxynaftalenem a katecholem jako silně vázanými organickými ligandy. Pro určení struktury vznikajících komplexů a jejich následných degradačních produktů přímo v reakční směsi byla využita hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací a dalšími měkkými ionizačními technikami. Pro detailní monitorování průběhu chemických reakcí během vzniku a následných rozkladů komplexů byla využita UV-VIS absorpční spektrometrie a kontinuální ESI-MS analýza. Byly vyvinuty metodiky HPLC a CZE analýz umožňující hodnotit složení reakčních směsí během přípravy komplexů a hodnocení čistoty izolovaných konečných produktů. Preparativní HPLC byla úspěšně využita pro izolaci čistého Re(VII) katecholového komplexu z reakční směsi.

Klíčová slova

Rheniové komplexy, pyrogalol, 2,3-dihydroxynaftalen, katechol, hmotnostní spektrometrie, ESI/MS, strukturní analýza, UV-VIS absorpční spektrometrie, Reakční kinetika, HPLC, CZE.

Abstract

Rhenium complexes coordinated with suitable organic ligand gain increased interest in radiopharmaceutical medicine. Besides suitable radiological properties given by a metal ion itself, detailed knowledge of overall chemical properties of formed complexes, namely their exact structures, chemical stabilities and possible degradation pathways are essential pre-requisites for their clinical application. Selected rhenium complexes with pyrogallol 2,3-dihydroxynaphthalene and catechol as strongly bound ligands were prepared by a reaction of tetrabutylammonium tetrachlorooxorhenate with twofold molar excess of ligand in presence of various amount of triethylamine. The structures of formed complexes and their consequent reaction products were estimated by means of mass spectrometry with electrospray ionization. The kinetics of reactions in course of complex formation and consequent decomposition were primarily followed by UV-Vis absorption spectra measurement, complemented by single or continuous electrospray mass spectrometry analyses. Optimized HPLC and CZE procedures were utilized for monitoring of the composition of reaction mixtures in course of Re complex formation and for purity check of prepared complexes. Semi-preparative HPLC mode was succesfully utilized for isolation and final purification of Re(VII) catechol complex from a reaction mixture.

Keywords

Rhenium complexes, Pyrogallol, 2,3-dihydroxynaphthalene, Catechol, Mass spectrometry, ESI-MS, Structural analysis, UV-VIS absorption spectrometry, Reaction kinetics, HPLC, CZE.

Obsah

1. Cíl práce……11
2. Teoretická st……12
   2.1. Nukleární medicína……12
      2.1.1. Radionuklid……12
         2.1.1.1. Výroba umělých radionuklidů……12
      2.1.2. Rhenium……13
         2.1.2.1. Výskyt a jeho vlastnosti……13
         2.1.2.2. Příprava a využití radionuklidů rhenia……14
         2.1.2.3. Komplexní sloučeniny rhenia……14
      2.1.3. Radiofarmakum……15
   2.2. Metody charakterizace rheniových komplexů……17
      2.2.1. Nukleární magnetická rezonance……18
      2.2.2. Infračervená spektrometrie……18
      2.2.3. Hmotnostní spektrometrie……18
   2.3. Metody separace……20
      2.3.1. Chromatografie……20
         2.3.1.1. Základní princip a rozdělení chromatografických metod……20
         2.3.1.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie……21
         2.3.1.3. Základní parametry popisující separaci……21
         2.3.1.4. Součásti HPLC systému……23
         2.3.1.5. Základní optimalizovatelné parametry……25
      2.3.2. Kapilární zónová elektroforéza……26
         2.3.2.1. Součásti CZE systému a princip separace……27
         2.3.2.2. Základní elektroforetické charakteristiky……28
         2.3.2.3. Optimalizace CZE……29
      2.3.3. Srovnání HPLC a CZE……30
   2.4. Hodnocení stability……30
      2.4.1. UV-VIS spektrometrie……31
      2.4.2. ESI-MS spektrometrie……31
3. Praktická část……32
   3.1. Použité chemikálie ……32
   3.2. Použitá instrumentace a postupy……32
   3.3. Podmínky měření pomocí ESI-MS, APPI-MS a LDI-MS……34
   3.4. Výpočet indexu podobnosti hmotnostních spekter……34

3.5. Příprava rheniových komplexů……..…....35
3.6. Charakterizace vybraných komplexů metodou IR a NMR……..…..35
4. Výsledky a diskuze……..……..…..39
4.1. Charakterizace rheniových komplexů s pyrogallolem, 2,3-dihydroxynaftalenem a katecholem pomocí hmotnostní spektrometrie…….…….....…39
4.2. Separace připravených rheniových(VII) komplexů pomocí HPLC…..……..…..45
4.2.1. Agilent Zorbax SAX 150 x 4,6 mm (5 μm)…….……...45
4.2.2. Reprosil NH_2 150 x 3 mm (3 μm)……..…….49
4.3. Analýza rhenium(VII)-katecholového komplexu kapilární zónovou elektroforézou..53
4.4. ESI-MS charakterizace a UV-VIS stabilitní studie připravených rheniových(VII) komplexů s pyrogallolem a katecholem……..……...…58
5. Závěr…….……..……72
6. Použitá Literatura……74

Seznam použitých zkratek

α	Alfa záření, alfa zářiče
α	Separační faktor
ACN	Acetonitril
ACN-d3	Deuterovaný acetonitril
AF	Mravenčan amonný
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (z angl. Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku (z angl. Atmospheric Pressure Photoionization)
β, β^-	Beta záření, beta zářiče
Calc.	Vypočítaná hodnota
Cat	Katechol (z angl. Catechol)
$[c_x]_s$; $[c_x]_m$	Rovnovážné koncentrace složky x ve stacionární (*s*) a v mobilní fázi (*m*)
CZE	Kapilární zónová elektroforéza (z angl. Capillary Zone Electrophoresis)
Da	Dalton
DAD	Detektor s diodovým polem (z angl. Diode array detector)
dhn	2,3-dihydroxynaftalen
E	Intenzita elektrického pole [$V \cdot m^{-1}$]
EIC	Chromatogram vybraného iontu
EOF	Elektroosmotický tok
ESI	Ionizace elektrosprejem (z angl. Electrospray ionization)
Exp.	Experimentálně získaná hodnota
I	Relativní intenzita [%]
i; i_0	Intenzita signálu píků
IC	Iontoměničová fáze
γ	Gama záření, gama zářiče
FAB	Ionizace urychlenými atomy (z angl. Fast Atom Bombardment)
FD	Desorpce polem (z angl. Field Desorption)
H	Výškový ekvivalent teoretického patra
HILIC	Hydrofilní interakce (z angl. Hydrophilic interaction chromatography)
hod	Hodina
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High-performance liquid chromatography)

Hz, MHz	Herz, megaherz
IR	Infračervená spektroskopie (z angl. Infrared spectroscopy)
k	Retenční faktor
$\boldsymbol{K_D}$	Distribuční (rozdělovací) konstanta
keV, MeV	Kiloelektronvolt, megaelektronvolt
V, kV	Volt, kilovolt
L	Ligand
l	Efektivní délka kapiláry [m]
LC	Kapalinová chromatografie (z angl. Liquid chromatography)
LDI	Laserová desorpce/ionizace (z angl. Laser Desorption / Ionization)
LOD	Mez detekce (z angl. Limit of detection)
MALDI	Laserem indukovaná desorpce a ionizace za účasti matrice (z angl. Matrix-assisted laser desorption / ionization)
[ML]	Komplex M (centrální atom) a L (ligand)
mM	milimolární
MPa	Megapascal
Mr	Relativní molekulové hmotnosti
MS	Hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass spektrometry)
m/z	Poměr hmotnosti a náboje
[(*n*-Bu_4N)($ReOCl_4$)]	Tetrabutylammonium tetrachlorooxorhenát (V)
n	Počet teoretických chromatografických pater
n	Neutron
N	Počet vybraných iontů
NARP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi v nevodném prostředí (z angl. Non-aqueousreversed-phase chromatography)
NP	Normální fáze
^{1}H a ^{13}C NMR	Protonová a uhlíková nukleární magnetická rezonance (z angl. Nuclear magnetic resonance)
NP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi (z angl. Normal phase High-performace liquid chromatography)
p	Proton
PC	Papírová chromatografie (z angl. Paper chromatography)
pH	Vodíkový exponent
pKa	Logaritmický tvar disociační konstanty
PG	Pyrogallol
ppm	z angl. Parts per million

Q	Náboj iontu [C]
r	Poloměr částice [m]
RP	Obrácená fáze
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními (obrácenými) fázemi (z angl. Reversed phase High-performance liquid chromatography)
R_s	Rozlišení
SI	Index podobnosti
t_m	Migrační čas analytu [min]
t_M	Mrtvý čas kolony [min]
t_R'	Redukovaný retenční čas [min]
$T_{1/2}$	Poločas rozpadu [hodiny; roky]
TEA	Triethylamin
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě (z angl. Thin layer chromatography)
TOF	Detektor doby letu (z angl. Time of Flight)
TSI	Ionizace termosprejem (z angl. Thermospray ionization)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV-VIS	Spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra (z angl. Ultraviolet-visible spectrophotometry)
v_{ef}	Rychlost částice v elektrickém poli [$m \cdot s^{-1}$]
ν_{tot}	Celková rychlost [$m \cdot s^{-1}$]
ξ	Zeta potenciál [V]
ε	Dielektrická konstanta základního elektrolytu [$F \cdot m^{-1}$]
η	Viskozita roztoku [$N \cdot s \cdot m^{-2}$]
μ_{ef}	Elektroforetická pohyblivost [$m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$]
μ_{eof}	Elektroosmotická pohyblivost [$m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$]
μS	Mikrosiemens
λ, λ_{max}	Vlnová délka a maximální vlnová délka [nm]

Cíle práce

- Příprava vybraných rheniových komplexů s aromatickými ligandy a jejich strukturní charakterizace hmotnostní spektrometrií s měkkými ionizačními technikami.
- Sledování průběhu komplexotvorných reakcí UV-VIS absorpční spektrofotometrií a kontinuálním ESI-MS měřením. Strukturní charakterizace meziproduktů, produktů a rozkladných produktů vyskytujících se v reakční směsi při přípravě rheniových komplexů.
- Optimalizace metodiky HPLC a CZE stanovení majoritních složek rečakční směsi při přípravě Re(VII) katecholového komplexu. Využití semipreparativní HPLC pro izolaci čistého Re(VII) katecholového komplexu z reakční směsi.

2. Teoretická část

2.1. Nukleární medicína

Nukleární medicína je lékařský obor zabývající se aplikací radioaktivních izotopů kovů přímo do těla pacienta za účelem diagnostiky primárních nebo sekundárních nádorů v jejich prvotních stádiích vývoje. Vhodnými detekčními technikami je pak vysílané záření detekováno a převedeno na vizuální obrazy. V menší míře se záření emitované těmito radioizotopy využívá také k účelům terapeutickým. V posledních letech byl zejména v této oblasti zaznamenán obrovský nárůst studií možného využití komplexů rhenia, a sice jako potenciálních radiofarmak (Kupka et al. 2007; Tisato et al. 2004).

2.1.1. Radionuklid

Obecně je radionuklid izotop s nestabilním jádrem obsahujícím přebytek protonů nebo neutronů. Při snaze dostat se zpět do stabilního stavu, dojde k vyražení některé částice a spolu s ní se uvolní určité kvantum příslušné energie.

Hlavními faktory, rozhodujícími o významu a použití konkrétních radionuklidů, jsou jejich fyzikální a nukleární vlastnosti, jako je poločas rozpadu $T_{1/2}$, druh a energie ionizujícího záření apod. (Liu and Edwards 1999). Zatímco radionuklidy s delším poločasem rozpadu (měsíce, roky, desítky let) jsou ve formě uzavřených zářičů využívány v technice nebo průmyslu, jiné uplatnění mají zástupci uměle vyráběných krátkodobých radionuklidů. Ty se díky svým chemickým a farmakokinetickým vlastnostem staly ve formě otevřených zářičů nezbytnou součástí nukleární medicíny. V oblasti diagnostiky se jedná především o γ zářiče ^{99m}Tc, ^{67}Ga, ^{111}In, nebo také zářiče emitující pozitrony ^{68}Ga, ^{62}Cu, ^{89}Zr. V oblasti léčby jsou pak hlavními zástupci α, β zářiče např.^{186,188}Re, ^{153}Sm (Jurisson et al. 1993; Tisato et al. 2004).

2.1.1.1. Výroba umělých radionuklidů

Neméně důležitá je také snadnost, rychlost a cenová dostupnost při výrobě požadovaného radionuklidu (Liu and Edwards 1999). Základem je výběr vhodné jaderné reakce (druh odstřelujících částic a jejich energie (p, n, α částice, deuterony aj.)), zařízení (cyklotron, jaderný reaktor, radionuklidový generátor), a dále výběr vhodného terčíku (druh ozařovaného radionuklidu, jeho chemická forma (pevná látka, kapalina, plyn) apod.). Princip je následující – terčíkový radionuklid je ostřelován příslušnou částicí, která vstoupí do jádra a vyvolá jeho změnu (změna počtu protonů / neutronů v jádře, která vede k porušení rovnovážné konfigurace) a dojde k vyzáření částice nové. Takto vzniklá nová jádra bývají v excitovaném stavu a jsou ve většině

případů radioaktivní. Požadovaný radionuklid je pak potřeba z ozářeného materiálu vhodnou metodou separovat (Kupka et al. 2007; Ullmann 2000).

2.1.2. Rhenium

2.1.2.1. Výskyt a jeho vlastnosti

Přírodní Re je směsí dvou izotopů – radioaktivního ^{187}Re (62,6 %, $T_{1/2}$ = 4,33.10^{10} roku, β^-) a stabilního izotopu ^{185}Re (37,4 %) (Dilworth and Parrott 1998; Kohlíčková et al. 2000). Z těchto dvou izotopů jsou dále získávány další dvě radioaktivní formy – ^{186}Re a ^{188}Re, které disponují jadernými vlastnostmi příznivými pro jejich využití v medicíně, jako součást diagnostických a především terapeutických radiofarmak (Dilworth and Parrott 1998; Tisato et al. 2004).

Díky lanthanoidové kontrakci, vykazuje Re v komplexech se stejným ligandem velké podobnosti ve fyzikálních vlastnostech s Tc (velikost, lipofilita aj.), z čehož se usuzuje možnost jejich využití k podobným účelům (Dilworth and Parrott 1998; Kohlíčková et al. 1999; Kohlíčková et al. 2000). Podobně jako Tc, poskytuje Re komplexy s anorganickými i organickými ligandy nejrůznějších geometrických uspořádání, v nichž se vyskytuje v oxidačních číslech -I až +VII (Abram and Alberto 2006; Donnelly 2011; Kohlíčková et al. 1999; Libson et al. 1990; Tisato et al. 2004).

Naproti tomu se v některých vlastnostech tyto dva kovy v komplexech liší, a proto není možné odhadnout vlastnosti rheniových komplexů s techneciovými analogy pouze z jejich podobnosti. Oproti Tc je Re podstatně stabilnější ve vyšších oxidačních stavech (zejména +IV a +VII), a proto se hůře redukuje. Snadná reoxidace na rhenistan je výhodná při jeho vylučování z lidského organismu ledvinami při využití v lékařství. Díky tomu klesá pravděpodobnost jeho akumulace v těle, a s tím související radiotoxicity (Dilworth and Parrott 1998; Kohlíčková et al. 2000; Libson et al. 1990; Tisato et al. 2004). V **tabulce 1** jsou uvedeny základní nukleární vlastnosti, výroba a oblast využití Tc a Re izotopů.

Tabulka 1 Přehled nukleárních vlastností, způsob výroby a oblast využití Re a Tc izotopů (Tisato et al. 2004)

Radionuklid	Emitovaná energie	Poločas rozpadu ($T_{1/2}$)	Výroba	použití
^{99m}Tc	γ 142 keV	6,01 hod	^{99}Mo/^{99m}Tc generátor	Nukleární medicína, výzkum
^{99}Tc	β 292 keV	2,11·10^{-5} roku	reaktor	výzkum
^{186}Re	β 1,1 MeV γ 137 keV	90,64 hod	reaktor	Nukleární medicína, výzkum
^{188}Re	β 2,0 MeV γ 155 keV	16,98 hod	^{188}W/^{188}Re generátor	Nukleární medicína, výzkum
^{185}Re/^{187}Re	stabilní	-	přirozený výskyt	výzkum

2.1.2.2. Příprava a využití radionuklidů rhenia

- ^{186}Re:

Je uměle vyráběn v jaderném reaktoru ozařováním terčů se stabilním izotopem ^{185}Re tepelnými neutrony – ^{185}Re (n, γ) ^{186}Re. Nevýhodou této přípravy je značná kontaminace produktu neradioaktivním izotopem ^{185}Re. Další možnost přípravy je v cyklotronu protonovým ozařováním W (obohaceného isotopem ^{186}Re) – ^{186}W (p, n) ^{186}Re. Dosah záření ^{186}Re v tkáni bývá do hloubky 5 mm, díky čemuž se používá především u malých nádorů a nachází uplatnění zejména při terapiích opěrného systému – paliativní terapie kostních metastáz (ve formě fosfátového komplexu). Hojně se využívá i v radiační synovektomii při revmatických artritidách kloubů (ve formě koloidního sulfidu) (Dilworth and Parrott 1998; Kohlíčková et al. 2000; Kohlíčková-Koudelková et al. 2003).

- ^{188}Re:

Pro přípravu tohoto izotopu se používá radionuklidového generátoru ^{188}W/^{188}Re. Přičemž ^{188}W se získává neutronovou aktivací (dvojitým záchytem neutronů) na terči ^{188}W, z něhož se izotop ^{188}Re odděluje iontově výměnnými metodami. Další možností jeho výroby je v jaderném reaktoru neutronovým ozařováním Re (obohaceného izotopem ^{187}Re) – ^{187}Re (n, γ) ^{188}Re. Rovněž bývá, díky svým vhodným nukleárním a fyzikálním vlastnostem, využíván v medicíně. Jeho výhodou oproti ^{186}Re je jeho levná a snadná příprava v generátoru, kratší poločas, vyšší měrná aktivita a vyšší energie β částic, tedy větší pronikavost do hloubky tkání (10 – 11 mm). Proto se využívá při léčení rozsáhlejších ploch (Kohlíčková et al. 2000; Dilworth and Parrott 1998; Liu 2004).

2.1.2.3. Komplexní sloučeniny rhenia

Komplexy Re se běžně připravují z rhenistanu (perrhenátu) ReO_4^-. V tomto oxidačním stavu však Re není schopno tvořit komplexy, a proto je potřeba jej nejdříve zredukovat na některý z nižších oxidačních stavů (nejčastěji +V, +III nebo +I) a stabilizovat ho v něm pomocí vhodných ligandů (Liu and Edwards 1999). Výzkum komplexů Re využívaných v lékařství je nejčastěji zaměřen na Re v oxidačním stavu (+V), z důvodu podobnosti s již používanými komplexy Tc a možnosti jejich poměrně snadné přípravy v čistém stavu (Pelecanou et al. 1999).

Konkrétní výsledný oxidační stav kovového iontu závisí nejen na síle použitého redukčního činidla, ale také na jeho koncentraci a reakčních podmínkách. Jednotlivé komplexy bývají barevné. Barva je závislá jednak na mocenství kovu, ale také na ostatních komponentách v roztoku (Young and Irvine 1938). Slabá redukční činidla (oxid siřičitý, hydrazin) redukují rhenistan na rhenan, charakteristický žlutou barvou roztoku. Silnější redukční činidla (chlorid cínatý, kovový zinek) redukují rhenistany zejména v kyselém prostředí na rheničitany či až

rhenany, což se projevuje hnědou nebo zelenou barvou roztoku. Rtuťnaté soli (dusičnan nebo chloristan) redukují rhenistany v prostředí kyseliny chlorovodíkové na ionty čtyřmocného rhenia (Burešová 2012).

Nejčastěji užívanými ligandy bývají ligandy obsahující organické oxo-, nitrido- nebo imidové skupiny, mající schopnost kompenzovat nedostatek elektronů kovového centra (Donnelly 2011; Kohlíčková et al. 1999; Kohlíčková-Koudelková et al. 2003). V nukleární medicíně roste zájem o oxorheniové(+V) komplexy obsahující vhodné ligandy. Ligandy vázané na atom Re přes kyslík jsou intenzivně zkoumány vzhledem k některým vlastnostem kyslíku. Značný zájem je o chemii anorganických sloučenin obsahujících atom kyslíku v několikavazebné interakci s centrálním atomem kovu. Takovéto sloučeniny mohou transportovat kyslík do reakcí s fosfiny, sulfidy nebo alkeny (Blower et al. 1986), jež jsou využitelné v průmyslu a biologickém inženýrství (např. epoxidace olefinů nebo biologické napodobování katalýzy cytochromů (Feiters et al. 2000).

Nejen zbarvení, ale i výsledná stabilita jednotlivých komplexů závisí na redoxním stavu centrálního kovového iontu a na koordinovaných ligandech (Blower et al. 1990; Volkert and Deutsch 1993). Ukázalo se, že aromatické aminy a alkoholy jsou nejvíce vyhovující vazebné skupiny pro tvorbu Re komplexů, vykazující vynikající chemickou a radiochemickou stabilitu (Bandoli et al. 2002; Booysen et al. 2007; Gerber et al. 2004; Gerber and Mayer 2005; Gerber et al. 2006; Machura and Kusz 2008; Machura et al. 2014; de Souza et al. 2010).

Monooxorheniové komplexy mají čtvercově pyramidální tvar, v němž jsou koordinovány 4 heteroatomy (na atom Re v perrhenátu jsou koordinačně vázány atomy kyslíku), ale někdy mohou obsahovat i molekulu rozpouštědla nebo anion vázaný v *trans* pozici k oxoskupině, čímž vznikne nepravidelná osmiboká struktura (Greenwood and Earnshaw 1997; Kohlíčková et al. 1999).
Ve své práci jsem se zabývala komplexy, obsahující aromatické organické ligandy s fenolovými skupinami.

3.1.3. Radiofarmaka

Radiofarmaka jsou speciální diagnostické nebo terapeutické přípravky využívané v nukleární medicíně, obsahující ve své struktuře vázaný krátkodobý radionuklid např. ^{99m}Tc, ^{186}Re (Kohlíčková et al. 1998; Jurisson et al. 1993). Obecně je radiofarmakum složeno ze dvou částí (Ullmann 2000):

- nosič, indikátor – je specifická biochemická látka, jejímž primárním úkolem je dopravit radionuklid do požadovaného cílového orgánu nebo tkáně, která má být zobrazena nebo léčena. Vedle toho se může tohoto procesu v cílovém místě aktivně či pasivně účastnit. Příkladem jsou anorganické soli, organické molekuly, monoklonální protilátky, peptidy, imunoglobuliny a jiné.

- radionuklid – je navázán na nosič (v iontové podobě, kovalentně nebo ve formě komplexu či chelátu), přičemž musí být zachovány biochemické vlastnosti nosiče. Emitující záření je pak možné signalizovat a vizualizovat tak polohu molekul indikátoru v organismu.

Radiofarmaka mohou vedle těchto dvou základních složek obsahovat ještě další např. některé pomocné stabilizující látky, či látky s antioxidačními účinky.

Dnes je nejběžněji používaným radionuklidem v nukleární medicíně ^{99m}Tc (*m* – značí excitované jádro v metastabilním stavu), které je čistým gama zářičem s poměrně krátkým poločasem rozpadu $T_{1/2}$ = 6 hodin. Výhodami tohoto prvku jsou jeho optimální nukleární vlastnosti (nízká radiační zátěž, poločas rozpadu), efektivní detekce emitovaného γ záření (pomocí scintilačních kamer), snadná dostupnost a nízká pořizovací cena (Abram and Alberto 2006; Kohlíčková et al. 1998; Liu 2004; Tisato et al. 2004). Čisté γ zářiče mají nepatrný terapeutický účinek. Zatímco γ záření, které je emitováno smíšenými beta-gama zářiči (např. ^{186,188}Re), je s výhodou používáno ke scintigrafickému zobrazení distribuce radiofarmaka v organismu a ke sledování průběhu terapie (Tisato et al. 2004).

Základním požadavkem na použité radiofarmakum je jeho snadná příprava, stabilita, vysoká akumulace v cílových tkáních a nízká akumulace ve tkáních okolních, vysoká citlivost a specifičnost. Tento požadavek lze do určité míry farmakokineticky ovlivnit např. chemickou modifikací chelátu kovu, biomolekuly – zavedením hydrofilní skupiny, volbou vhodných ligandů apod. (Liu and Edwards 1999; Liu 2004). Biodistribuce jednotlivých radiofarmak obecně závisí na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech – celkovém náboji, molární hmotnosti, tvaru a lipofilitě (Tisato et al. 2004). Používaná radiofarmaka musí vykazovat radiologickou, radiochemickou a chemickou čistotu a dále apyrogenitu a sterilitu (Kohlíčková et al. 1998).

Hotová radiofarmaka, s radionuklidy s delším poločasem rozpadu (více jak dva dny např. ^{131}I, ^{201}Tl), vyrobená v radiochemické laboratoři, jsou dopravena na pracoviště nukleární medicíny a připravená k přímému podání pacientovi. Naproti tomu radiofarmaka obsahující radionuklidy krátkodobé (^{99m}Tc, ^{18}F), se musí připravovat přímo na pracovišti, kde se nosič označí vhodným radionuklidem. Dnes se používají tzv. kity. Jde o kompaktní soupravy neradioaktivních látek (vhodných ligandů, redukčního činidla, stabilizátorů případně katalyzátorů) dodávaných farmaceutickým výrobcem, k nimž se pouze přidá roztok vlastního radionuklidu (např. $^{186,188}ReO_4^-$, $^{99m}TcO_4^-$) a po optimalizaci podmínek proběhne reakce označení automaticky. Následně je potřeba zjistit množství a čistotu vzniklého produktu např. chromatograficky (Abram and Alberto 2006; Kupka et al. 2007; Ullmann 2000).

2.2. Metody charakterizace rheniových komplexů

Velmi důležitým krokem před aplikací konkrétního radiofarmaka je jeho charakterizace. Je nezbytná detailní znalost složení a struktury komplexu tvořícího reakční směs, a stejně tak jeho degradačních produktů, spolu s kinetickými aspekty přechodů mezi jednotlivými formami komplexů (Štícha et al. 2015). Je kladen důraz na rychlé a přesné techniky. Díky nízké koncentraci (10^{-8} až 10^{-6} M) radioaktivních izotopů kovů v radiofarmakách, je možné k charakterizaci těchto látek užít klasických analytických metod. Změny struktury Re komplexů jsou sledovány pomocí elektroanalytických a spektrometrických metod jako je infračervená spektrometrie (IR), spektrometrie v UV a viditelné oblasti (UV-VIS), protonová a uhlíková nukleární magnetická rezonance (^{1}H a ^{13}C NMR), případně rentgenové krystalografie (Holder and Bottomley 1992; Liu and Edwards 1999; Tisato et al. 2004; Van Kirk et al. 2003). Tyto metody obvykle poskytují podrobné informace o struktuře sledovaných sloučenin, avšak vyžadují k tomu vyšší množství vzorku (Henderson and McIndoe 2005).

Také hmotnostní spektrometrie (MS) je velice vhodnou metodou v této oblasti, navíc se již mnoho let používá ke studiu metabolismu léčiv. Zvláště pak při spojení kapalinové chromatografie s MS detekcí (LC-MS) vzniká účinný, rychlý a přesný analytický nástroj pro stanovení složení radiofarmak. Omezením zde bývají vysoké náklady spojené s provozem LC-MS, a v některých případech ne zcela zřejmé strukturní informace o sloučeninách (Liu 2004). Dalšími často používanými technikami pro kvantifikaci složek v reakční směsi a kontrolu kvality radioaktivně značených sloučenin jsou chromatografie na tenké vrstvě (TLC), papírová chromatografie (PC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapilární zónová elektroforéza (CZE) (Kohlíčková-Koudelková et al. 2002; Kohlíčková et al. 1999; Koudelková and Jedináková-Křížová 2003; Liu and Edwards 1999; Liu 2004).

Ve své diplomové práci se zaměřuji na spektrometrické metody, především MS, UV-VIS, částečně na NMR, a vysokoúčinné separační techniky HPLC a CZE. Struktury vytvořených komplexů a jejich degradačních produktů byly určovány především pomocí MS s ionizací elektrostrejem (ESI) a následně ověřeny metodami NMR a IR spektrometrií. NMR a IR jsou metody vhodné pro identifikaci čistých reakčních produktů. Méně vhodné jsou však pro hodnocení jejich strukturních konverzí v roztocích např. při sledování kinetiky v průběhu jejich přípravy a studie stability. Přestože je ESI-MS méně vhodná k charakterizaci strukturně blízkých sloučenin, jako jsou *cis* a *trans* izomery, její citlivost je v porovnání s NMR lepší. Proto je s výhodou využívána pro reálné klinické a farmakokinetické studie (Štícha et al. 2015). Kinetiku probíhající reakce tvorby komplexu a následné degradace byly sledovány za použití ESI-MS a UV-VIS spektroskopie.

2.2.1. Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance je analytická spektrometrická metoda vhodná ke strukturní charakterizaci malých molekul i makromolekul. Poskytuje informace o uhlíkatém skeletu organických sloučenin a o typu atomů vodíku v molekule. Princip metody je založen na interakci atomových jader s nenulovým spinem (např. ^{1}H, ^{13}C), umístěných v silném magnetickém poli, s elektromagnetickým zářením v oblasti radiových vln (vlnové délky menší než 10^{-2} m). Absorpcí tohoto záření se mění orientace spinů, což se v závislosti na elektronovém okolí a vzájemných interakcích jader, projevuje charakteristickými posuny a štěpením jejich signálů v NMR spektru (McMurry 2007). Použití ^{13}C NMR je poněkud omezena nízkou citlivostí či nízkým zastoupením ^{13}C ve vzorku. Jsou však vyvíjeny technologie snižující limit detekce (LOD), což umožňuje analyzovat vzorky v nízkých koncentracích, jako jsou metabolity, léčiva, přírodní produkty aj. (Bharti and Roy 2012).

2.2.2. Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie je nedestruktivní analytická technika poskytující strukturní informace o sloučeninách, díky identifikaci jejich funkčních skupin (McMurry 2007). Jde o absorpční metodu, kdy je sledována absorpce infračerveného záření (elektromagnetické záření o vlnových délkách 800 nm až 100 μm) vzorkem, při němž dochází ke zvýšení vibračních a rotačních stavů molekuly v závislosti na změnách jejího dipólového momentu. Množství dopadajícího záření, které bylo vzorkem absorbováno, je pak zaznamenáno jako absorpční pásy, jejichž poloha, tvar, počet a intenzita, odpovídají jednotlivým funkčním skupinám v molekule (Stuart 2004; McMurry 2007). IR je rychlá, přesná a citlivá technika, a díky tomu nachází uplatnění v mnoha odvětvích.

2.2.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je velice citlivá metoda, podávající informace především o velikosti (relativní molekulové hmotnosti *Mr*), a struktuře molekul analytů, nacházejících se ve stopových koncentracích ve směsích (McMurry 2007). Možnost pracovat s mikromolárními koncentracemi vzorků je velmi vhodná pro klinické a farmakokinetické studie (Tisato et al. 2004).

Podstatou metody je detekce iontů vznikajících v iontovém zdroji a v hmotnostním analyzátoru dělených podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Hmotnostní spektrometrie s měkkými ionizačními technikami je vhodnou metodou pro kvantifikaci a strukturní charakterizaci různých druhů komplexů. Prvními ionizačními technikami použitými pro strukturní identifikaci kovových komplexů byla ionizace desorpce polem (z angl. Fielddesorption, FD) a ionizace rychle letícími atomy (z angl. Fast atom bombartment, FAB) (Henderson and McIndie 2005). V dnešní

době mezi analytické techniky vhodné například k charakterizaci Tc a Re komplexů užívaných v nukleární medicíně patří především ESI-MS (Hori et al. 1996; Hori et al. 1997; Tisato et al. 2004; Tubaro et al. 2004). Ionizace elektrosprejem, podobně jako laserové desorpční techniky (z angl. Laser desorption-ionization, LDI a matrix assisted laser-desorptionionization, MALDI), které se také využívají při analýzách kovových komplexů, obvykle poskytují jednoduchá snadno vyhodnotitelná hmotnostní spektra s dominantním molekulovým iontem a nízkou mírou fragmentace (Henderson et al. 1998; Henderson and McIndoe 2005; Wyatt et al. 2006; Wyatt et al. 2011). Na rozdíl od ESI-MS se však u LDI a MALDI ionizací může snižovat intenzita molekulárních iontů ve prospěch fragmentů vznikajících přímou fotochemické degradací a dalšími fotochemickými reakcemi, k nimž dochází v průběhu ionizace (Štícha et al. 2015).

Volba konkrétního typu iontového zdroje se řídí druhem analyzovaných látek - např. ionizace termosprejem (Thermosprey, TSI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (z angl. Atmospheric pressure chemici ionization, APCI) jsou primárně určeny pro ionizaci nízkomolekulárních látek do m/z < 1 000, ESI je možno použít pro ionizaci makromolekulárních látek typu bílkovin a fragmentů nukleových kyselin. Ve srovnání s NMR a IR technikami, umožňuje ESI-MS dosáhnout podstatně nižších detekčních limitů a je použitelná pro analyty ve vodných roztocích (Hori et al. 1996; Hori et al. 1997; Tisato et al. 2004). Další v současné době nejměkčí komerčně dostupnou ionizační technikou vhodnou pro strukturní charakterizaci komplexů je fotoionizace za atmosférického tlaku (z angl. Atmospheric pressure photoionization, APPI) (Van Berkel 2003). Je vhodná pro ionizaci a charakterizaci kineticky nestabilních látek a některých komplexů. Relativně nízká ionizační energie dodávaná UV lampou umožňuje generovat především molekulární ionty nebo protonované molekuly a vzniká při ní poměrně málo aduktů a fragmentů. Ve srovnání s ESI, LDI a MALDI je rozsah fragmentace molekulárního iontu obvykle zanedbatelná (Štícha et al. 2015).

Při svém měření pomocí LC-MS jsem použila iontové zdroje ESI a APCI. Při těchto dvou měkkých ionizačních technikách, dochází k tvorbě mikroskopického aerosolu, vzniklého sprejováním kapalné mobilní fáze nesoucí separované analyty na výstupu z kolony do iontového zdroje pracujícího za atmosférického tlaku. Vzniklý aerosol se rychle odpařuje a uvolňuje ionizované molekuly analytu (možnost snímání obou – kladných i záporných iontů), které lze dále detekovat hmotnostním spektrometrem. Vakuový systém v další části zdroje napomáhá odčerpat nadbytečné páry, vzniklé po sprejování rozpouštědla. Výhodou ESI a APCI je vysoká citlivost, avšak pouze při použití "těkavých pufrů" přidávaných do mobilní fáze (např. octan amonný, kyselina mravenčí, trifluoroctová) a zamezujících ucpávání kapiláry usazenými netěkavými anorganickými solemi (Cech 2001).

Velikou výhodou spojení LC-MS s ionizací za atmosférického tlaku, je možnost aplikovat průtoky prakticky bez omezení až do 2 $ml \cdot min^{-1}$ pro mobilní fáze o různém složení - v rozsahu od

100 % organické složky do 100 % vodného rozpouštědla, i s možností gradientové eluce. To umožňuje pracovat s mikrokolonami i s konvenčními kolonami v uspořádání s normálními i s obrácenými fázemi při běžných podmínkách používaných v HPLC. Někdy je nutno za výstup ze separační kolony zařadit dělič odvádějící část mobilní fáze z kolony HPLC systému mimo iontový zdroj (Holčapek and Jandera 1998).

2.3. Metody separace

2.3.1. Chromatografie

Chromatografické metody patří v dnešní době k nejpoužívanějším separačním technikám. Jejich předností je mimo jiné, možnost kvalitativního hodnocení (retenční čas) i kvantifikace (výška resp. plocha píku analytu) separovaných analytů, případně i možnost jejich izolace.

2.3.1.1. Základní princip a rozdělení chromatografických metod

Principem chromatografické separace je rovnovážné dělení látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, fázi stacionární, tvořící náplň separačního prostoru, a fázi mobilní, která tímto separačním prostorem protéká a unáší s sebou dělené látky. Během prostupu kolonou se každá látka opakovaně sorbuje na stacionární fázi a zpětně desorbuje do fáze mobilní. Doba, kterou jednotlivé analyty stráví ve stacionární nebo v mobilní fázi, závisí na jejich afinitě k těmto fázím (Kupiec 2004, Pathy 2013). Současně se separací zón jednotlivých složek však dochází i k jejich rozmývání.

Cílem při chromatografické separaci, je optimalizovat jednotlivé chromatografické podmínky tak, aby výstupem byly oddělené složky ze vzorku v podobě ostrých symetrických píků, rozdělených pokud možno až na základní linii. Chromatografické metody je možné rozdělit v zásadě do několika skupin (Kupiec 2004; Malviya et al. 2010):

- podle skupenství mobilní fáze (kapalinová, plynová, superkritická fluidní),
- podle uspořádání stacionární fáze (kolonová, plošná, tenkovrstvá),
- podle typu stacionární fáze a s tím souvisejícího principu separace (adsorpční, rozdělovací, iontově výměnná, gelová, afinitní),
- podle podmínek (izokratická, gradientová),
- podle chromatografické techniky (frontální, vytěsňovací, eluční),
- podle účelu (analytická, preparativní).

Při své práci jsem optimalizovala podmínky separace reakčních směsí komplexů Re s použitím různých analytických chromatografických kolon a volbou vhodného složení mobilní fáze.

2.3.1.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Je univerzální, jednoduchá a rychlá chromatografická technika, která nachází uplatnění zejména při separaci, identifikaci a kvantifikaci složitých směsí a materiálů s vysokou molekulární hmotností (Kupiec 2004; Martin and Guiochon 2005). Využívá se k separaci netěkavých nebo málo těkavých a termicky labilních látek. Uplatnění nachází v celé řadě odvětví, jako je farmaceutický průmysl, životní prostředí, potravinářství, forenzní a klinické analýzy (kontrola kvality radioaktivně značených biomolekul) (Liu 2004; Malviya et al. 2010; Vikrant 2014).

V HPLC, na rozdíl od klasické nízkotlaké chromatografie, z níž se vyvinula, je separační prostor vyplněn částicemi pravidelného kulovitého tvaru o definované velikosti (řádově μm) a pórovitosti, s co největší homogenitou a hustotou naplnění. Čím menší je velikost částic náplně, tím méně jsou zóny separovaných látek rozmývány. Takovéto uspořádání klade velký odpor pro protékající mobilní fázi. Pro dosažení jejích optimálních průtoků byla proto vyvinuta bezpulzní vysokotlaká čerpadla s řízeným průtokem (Hanai 1999; Kupiec 2004; Sobotníková et al. 2010).

Typ HPLC obecně závisí na použitém systému fází. Podle polarity jednotlivých fází, dělíme HPLC na chromatografii (Kupiec 2004; Malviya et al. 2010; Pathy 2013; Vikrant 2014):

- S normálními fázemi (NP-HPLC). Stacionární fází je nejčastěji polární silikagel (může být tvořena i oxidem hlinitým, grafitizovanými sazemi), mobilní fází jsou nepolární organická rozpouštědla (např. hexan, heptan, dichlormethan aj.). Do mobilní fáze se může přidat polární modifikátor.
- S reverzními (obrácenými) fázemi (RP-HPLC). Při tomto uspořádání je stacionární fáze tvořena inertním nosičem (silikagelem, oxidem zirkoničitým, polymerním materiálem), jehož povrch je chemicky modifikován a podle navázaného modifikátoru může být stacionární fáze nepolární (nejčastěji C8 a C18) nebo středně polární (krátké uhlíkaté řetězce obsahující různé skupiny např. $-NH_2$, -CN aj.). Mobilní fáze je často směsí vody a polárních organických rozpouštědel (acetonitril, methanol, tetrahydrofuran), v některých případech s přídavkem pufrů. Při separaci se v tomto uspořádání uplatňuje vliv hydrofobních interakcí, vyplývajících z odpudivých sil mezi polárním rozpouštědlem, relativně nepolárním analytem, a nepolární stacionární fází. Chromatografie s obrácenými fázemi se používá nejčastěji, neboť umožňuje analyzovat sloučeniny o různé polaritě a molekulové hmotnosti. Uplatnění nachází jak při analytických, tak při preparativních analýzách.

2.3.1.3. Základní parametry popisující separaci

Účinnost chromatografické separace je porovnávána na základě následujících parametrů. Jak již bylo uvedeno, látky se distribuují mezi dvě nemísitelné fáze, které jsou ve vzájemném

kontaktu. Každá látka je charakterizována příslušnou distribuční (rozdělovací) konstantou $\boldsymbol{K_D}$, vystihující tuto rovnováhu

$$\boldsymbol{K_{D,X}} = \frac{[c_i]_s}{[c_i]_m} \tag{1}$$

kde $[c_x]_s$ a $[c_x]_m$ jsou rovnovážné molární koncentrace *i*-tého analytu ve stacionární (*s*) a v mobilní fázi (*m*) [mol·l^{-1}]. Hodnota této konstanty závisí jak na povaze separované látky, tak na složení mobilní a stacionární fáze. S její rostoucí hodnotou roste afinita látky ke stacionární fázi.

Retenci látky můžeme také vyjádřit pomocí retenčního faktoru *k*. Ten představuje kolikrát více času stráví analyt ve fázi stacionární než ve fázi mobilní. Je nezávislý na podmínkách a instrumentaci (jako např. šířce kolony, průtoku mobilní fáze), závisí pouze na parametrech ovlivňujících separaci (např. typ obou fází, teplota) a vyjadřuje ho vztah

$$k = \frac{t_{R,i}^{'}}{t_M} \tag{2}$$

kde $t_R^{'}$ představuje redukovaný retenční čas *i*-tého analytu [min] (tj. doba, kterou analyt stráví ve stacionární fázi), t_M je mrtvý čas [min] (odpovídá retenčnímu času analytu, který není stacionární fází zadržován).

Stupeň separace neboli separační faktor α, vyjadřuje poměr redukovaných retenčních časů dvou sloučenin. Ty závisí na vlastnostech rozpuštěných separovaných látek, materiálu stacionární fáze a složení mobilní fáze. Zvýšení separačního faktoru lze docílit změnou těchto dvou fází

$$\alpha = \frac{t_{R2}^{'}}{t_{R1}^{'}} \tag{3}$$

kde $t_{R2}^{'}$, $t_{R1}^{'}$ jsou redukované retenční časy dvou sousedních analytů [min] (Hanai 1999; Kupiec 2004; Sanjay and Kumar 2012).

Míra separace dvou látek bývá charakterizována tzv. rozlišením R_s. Přičemž jako zcela oddělené považujeme látky, u nichž rozlišení mezi píky dosáhne hodnoty $R_s \geq 1{,}2$ (Hanai 1999; Kupiec 2004).

$$R_{1,2} = \frac{t_{R2}^{'} - t_{R1}^{'}}{0{,}5(w_{b,2} - w_{b,1})} \tag{4}$$

$$R_s = \frac{\sqrt{n}}{4}\frac{\alpha - 1}{\alpha}\frac{k}{k+1} \tag{5}$$

Vztah (4) vyjadřuje způsob výpočtu R_s, kde $w_{b,1}$ a $w_{b,2}$ jsou šířky píků při jejich základně [min]. Vztah (5) vystihuje parametry, na kterých rozlišení závisí (Hanai 1999):

- na retenčním faktoru *k*, tedy na síle interakce mezi danou látkou a stacionární fází
- na separačním faktoru α, tedy schopnosti chromatografického systému rozlišit dvě sousední látky
- počtu chromatografických pater *n*, tedy jak moc se zóna eluované látky rozšiřuje

Počet teoretických pater obecně vyjadřuje míru účinnosti chromatografické kolony. Čím vyšší je jeho hodnota, tím účinnější je separace, neboť zóny analys jsou minimálně rozmývány. K výpočtu počtu pater lze užít výraz (6)

$$n = 16 \frac{t_{R,i}^2}{w^2} \tag{6}$$

Při separaci hraje roli také rychlost toku mobilní fáze, kterou lze vyjádřit lineární průtokovou rychlostí u [cm·min^{-1}] (7)

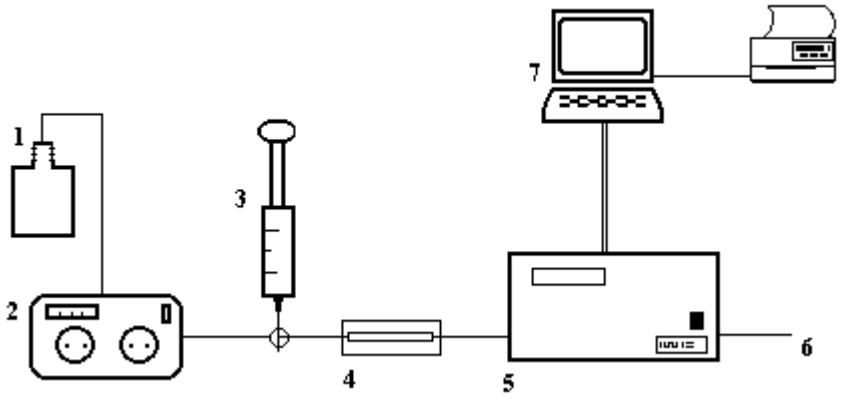
$$u = \frac{L}{t_M} \tag{7}$$

kde L je délka kolony [cm]. Nebo objemovým průtokem mobilní fáze F_m [ml·min^{-1}], odpovídající objemu mobilní fáze, který projde kolonou za jednu minutu, vyjádřený vztahem (8)

$$F_m = \frac{V_{R,i}}{t_{R,i}} \tag{8}$$

Kde $V_{R,i}$ je retenční objem *i*-tého analytu [ml].

2.3.1.4. Součásti HPLC systému



Obrázek 1 schéma HPLC systému) – 1 – zásobník mobilní fáze; 2 – čerpadlo; 3 – dávkovací zařízení; 4 – kolona; 5 – detektor; 6 –odpad; 7 – vyhodnocovací a zobrazovací zařízení.

Schéma instrumentálního uspořádání HPLC je zobrazen na **obrázku 1**.

- Mobilní fáze a její zásobníky

V kapalinové chromatografii hraje mobilní fáze, na rozdíl od chromatografie plynové (v níž plyn pouze unáší analyty, aniž by jakkoli přispíval k jejich dělení), významnou roli při separaci. Typ a složení mobilní fáze mají velký vliv na celkovou separaci komponent vzorku a závisí na druhu chromatografie a separovaných molekul. Velká pozornost je kladena na čistotu mobilní fáze včetně použitých rozpouštědel a anorganických solí. Skleněné zásobní láhve, v nichž se mobilní fáze nejčastěji uchovává, bývají vybaveny filtry. Zároveň je potřeba, aby byla odplyněna např. probubláváním inertním plynem či ultrazvukem. Musí být rovněž kompatibilní s použitým detektorem, málo těkavá a inertní vůči stacionární fázi i analytům (Hanai 1999; Kupiec 2004).

- Čerpadla

Zpravidla se používá vysokotlakých čerpadel, pro zajištění konstantního bezpulzního průtoku mobilní fáze. Stabilita tlaků na úrovni desítek MPa podmiňuje dosažení vysoké přesnosti a reprodukovatelnosti analýz. Při izokratické eluci často stačí jediné čerpadlo, zatímco při eluci gradientové, kdy je třeba smísit několik typů rozpouštědel, je obvykle nutné použít čerpadel několik pro vytvoření tzv. vysokotlakého gradientu. K mísení roztoků dochází v tomto případě za čerpadly. Alternativně je možno roztoky mísit ve směšovači před čerpadlem, pak jde o tzv. nízkotlaký gradient. Používají se injekční čerpadla, reciproká pístová čerpadla a nejčastěji duální pístová reciproká čerpadla (Hanai 1999; Kupiec 2004).

- Dávkovací zařízení

Dávkování může být prováděno manuálně pomocí injekční stříkačky přes septum, nebo dnes častěji pomocí automatických dávkovačů tzv. autosamplerů. Ty pracují na principu dávkovacích ventilů se smyčkou o daném objemu. Kapalný vzorek o objemu v rozmezí 0,1 až 100 ml je pod vysokým tlakem vstříknut do proudu mobilní fáze, tak aby nedošlo ke změně jejího tlaku. Takovýto systém zajišťuje vysokou reprodukovatelnost dávkování. Kapalné vzorky mohou být dávkovány přímo. Vzorky tuhé je nejdříve potřeba rozpustit ve vhodném rozpouštědle (Kupiec 2004).

- Kolona – náplň kolony (typy stacionárních fází)

V koloně probíhá vlastní separace složek vzorku. Účinnost dané kolony lze vyjádřit počtem teoretických pater *n* a výškovým ekvivalentem teoretického patra *H*. Pro vyšší reprodukovatelnost měření, bývá umístěna v termostatovaném prostoru. Kolony můžeme dělit jednak podle materiálu, ze kterého jsou vyrobeny, nebo podle délky, průměru (mikro-, kapilární, preparativní kolony) a typu náplně, kterou jsou naplněny (náplňové, monolitické kolony). Oba konce kolony

jsou opatřeny porézní kovovou fritou. Velmi často se při analýzách před vlastní separační kolonu umísťuje předkolonka, chránící ji před ucpáním a další možnou kontaminací.

- Detektor

Detektor je zařízení podávající informaci o složení mobilní fáze na výstupu z kolony. Jednotlivé separované analyty jsou zapisovačem zaznamenávány v odpovídajících retenčních časech jako chromatografické píky. Retenční čas se liší v závislosti na povaze analytu a složení obou fází (Kupiec 2004; Xiang et al. 2006). Detektor musí splňovat několik požadavků – měl by být kompatibilní s mobilní fází, být schopen rychle reagovat na změnu jejího složení, být robustní, universální, citlivý a zároveň co nejvíce selektivní (Sanjay and Kumar 2012). Ve spojení s HPLC se užívají k detekci látek nejčastěji tyto detektory – UV-VIS detektor s fixní či variabilní vlnovou délkou, vodivostní, fluorescenční, refraktometrický, MS detektor (Kupiec 2004).

2.3.1.5. Základní optimalizovatelné parametry

V závislosti na typu separovaných látek a celkovém mechanismu separace hraje nejdůležitější roli při optimalizaci podmínek výběr vhodné kolony (nejčastěji sledované parametry jsou vnitřní průměr kolony, velikost částic stacionární fáze, velikost pórů) a složení mobilní fáze (Vikrant 2014). Optimalizace rozlišení, úzce související s optimalizací počtu teoretických pater (tedy účinností) a separačního faktoru α, může být dosaženo vhodným výběrem typu stacionární a mobilní fáze (Hanai 1999). Volba rozpouštědla, přísad a gradientu závisí na povaze stacionární fáze a analytu (Vikrant 2014). To jak jsou analyty zadržovány stacionární fází, záleží na jejich vzájemných fyzikálně-chemických interakcích. Použije-li se elučně silné rozpouštědlo, ve kterém se analyty snadno rozpouští, jsou z kolony eluovány velice rychle. Síly poutající analyty ke stacionární fázi jsou podobné těm, které jsou zodpovědné za jejich rozpouštění v rozpouštědle (Hanai 1999).

- Stacionární fáze a kolona

Výběr vhodné kolony o optimálním vnitřním průměru se stacionární fází s odpovídající velikostí částic a pórů, je prvním a nejdůležitějším krokem. Kolona se volí v závislosti na typu separovaných analytů. Obecně platí, že delší kolony poskytují lepší separaci v důsledku vyššího počtu teoretických pater (Sanjay and Kumar 2012). Vnitřní průměr kolony, který ovlivňuje citlivost a určuje množství analytu, které může být nadávkováno, by měl být co nejmenší. Velikost pórů stejně jako částic stacionární fáze by měla být opět co nejmenší. Takové uspořádání

poskytuje větší plochu a umožňuje tedy účinnější separaci. Menší částice vyžadují práci při daleko vyšších tlacích (Abidi 1991).

- Mobilní fáze

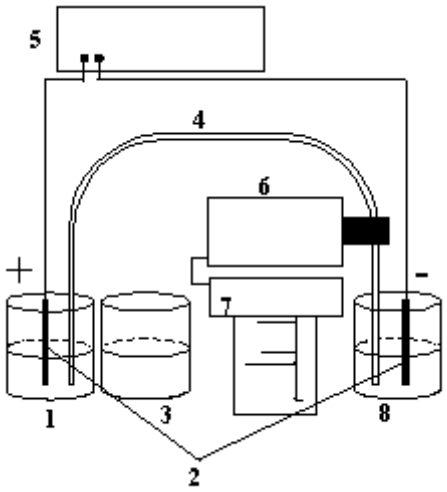
Volba mobilní fáze opět závisí na druhu separovaných sloučenin a použité stacionární fáze. Organická rozpouštědla se přidávají ke snížení polarity vodné mobilní fáze. Zvýšení množství organického rozpouštědla sníží retenční čas v separaci na reverzní fázi (Vikrant 2014). Stupeň disociace slabých elektrolytů závisí na pH mobilní fáze a podle toho je třeba přidávat vhodný pufr.

Rychlost průtoku mobilní fáze ovlivňuje retenční časy. Zdvojnásobení průtoku často vede k polovičním hodnotám retenčních charakteristik ovšem za cenu zmenšení ploch píků (Hanai 1999;Vikrant 2014).

2.3.2. Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza je nejjednodušší elektromigrační metodou, jejíž separační mechanismus je založen na rozdílných rychlostech migrace nabitých částic (např. iontů, nabitých komplexů, iontových asociátů) nosným elektrolytem vlivem elektrického pole (jednotky až desítky kV) k opačně nabitým elektrodám. Rychlost pohybu dělených iontů v elektrickém poli o dané intenzitě závisí zejména na velikosti jejich náboje, rozměrech a tvaru podmiňujících tzv. elektroforetickou pohyblivost, a elektroosmotickém toku (Altria 1999; Sobotníková et al. 2010). Kapilární zónová elektroforéza nachází své uplatnění v mnoha průmyslových i výzkumných oblastech; při analýzách malých iontů i makromolekul ve velmi složitých matricích, s minimálními požadavky na předúpravu vzorku.

2.3.2.1. Součásti CZE systému a princip separace



Obrázek 2 Schéma uspořádání kapilární zónové elektroforézy: 1 – vstupní nádobka; pár elektrod; 3 – vzorek; 4 – kapilára; 5 – zdroj vysokého napětí; 6 – detektor; 7 – vyhodnocovací zařízení; 8 – výstupní nádobka.

Schéma instrumentálního uspořádání CZE je zobrazeno na obrázku 2, kde jsou vidět hlavní komponenty systému – zdroj vysokého napětí, kapilára, nádobky obsahující nosný elektrolyt, elektrody a detektor.

Separační prostor je nejčastěji tvořen křemennou kapilárou (může být použita i kapilára z teflonu nebo borosilikátového skla) s vnitřním průměrem obvykle menším než 100 μm (nejčastěji 75 μm) a délky 30 – 80 cm, pokrytou pro vyšší mechanickou odolnost polyimidovou vrstvou a naplněnou nosným elektrolytem (obvykle vodné roztoky pufrů). Oba konce kapiláry, spolu s platinovými elektrodami vysokonapěťového zdroje, jsou ponořeny do nádobek s elektrolytem. Stěna kapiláry umožňuje relativně účinný odvod Jouleova tepla, vznikajícího průchodem proudu. To dovoluje použít vysokých hodnot vkládaného napětí (obvykle do 30 kV) a tím i dosažení vysokých účinností a rychlostí separace (Xu 1996).

Elektroosmotický tok (EOF), mající velký vliv na separaci, vzniká v důsledku disociace silanolových skupin (-SiOH → $-SiO^-$) přítomných na vnitřní stěně křemenné kapiláry. Vzniklé ionty svým uspořádáním vytvoří tzv. Sternovu elektrickou dvojvrstvu – disociací vzniklé či adsorbované ionty imobilizované na vnitřní stěně kapiláry tvoří nepohyblivou část, druhá difúzní část, je tvořena přebytkem volného náboje. Na rozhraní těchto dvou vrstev se tvoří elektrokinetický potenciál nazývaný zeta potenciál ξ. Jeho hodnota závisí na *p*H a iontové síle základního elektrolytu. Po aplikaci elektrického pole se začnou volné kladně nabité ionty pohybovat a vlivem slabých vazebných interakcí uvedou do pohybu i molekuly rozpouštědla. V křemenných kapilárách s chemicky nemodifikovaným vnitřním povrchem a při hodnotách *p*H

vyšších než 5 dochází k proudění roztoku nosného elektrolytu směrem ke katodě. Vnitřní povrch křemenné kapiláry však nemusí být z hlediska povrchového náboje jednoznačně definován, velmi lehce podléhá fyzikálně-chemickým změnám vlivem sorpce látek obsažených v separačním médiu, a jako důsledek generuje nestabilní EOF kolísající i v průběhu jedné analýzy (Kašička 1997).

Množství vzorku potřebné pro analýzu v CZE je velmi malé, což přináší velkou výhodu při analýze obtížně dostupných vzorků, např. obtížně izolovatelných biologických materiálů. Nadávkování se nejčastěji provádí tlakem (hydrodynamicky) nebo vloženým napětím (elektrokineticky) a to tak, že se na krátkou dobu vymění vstupní nádobka za nádobku se vzorkem, a vzorek je nadávkován ve formě úzké zóny. Nedílnou součástí zařízení je i chladící systém, často zprostředkovaný proudícím vzduchem okolo kapiláry či cirkulující chladící kapalinou. Při normální polaritě vkládaného napětí (normální mód separace) a vyšších hodnotách *p*H nosného elektrolytu je detektor situován na straně nádobky s katodou a analyty (kationty i anionty) se vlivem migrace a rychlého elektroosmotického toku obvykle pohybují ke katodě. Během jednoho experimentu můžeme detekovat složky vzorku v pořadí kationty; neutrální látky; anionty. K detekci se často používá vodivostního detektoru či UV-VIS absorpčního detektoru. Výsledkem snímání časového záznamu signálu detektoru je elektroferogram, zobrazujícího závislost odezvy daného detektoru na čase (Sobotníková et al. 2010). Z elektroferogramu mohou být určeny kvalitativní (migrační čas analytu) i kvantitativní (výška resp. plocha píku analytu) charakteristiky separovaných složek vzorku.

2.3.2.2. Základní elektroforetické charakteristiky

Princip separace nabitých částic v CZE je závislý na jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostech vyjádřených vztahem

$$\mu_{ef,i} = \frac{Q_i}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i} \tag{9}$$

kde $\mu_{ef,i}$ je elektroforetická pohyblivost *i*-tého iontu [$m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$], Q je náboj *i*-tého iontu v [C], η je viskozita kapaliny v [$N \cdot s \cdot m^{-2}$] a r je poloměr částice v [m]. Z rovnice (9) vyplývá, že pohyblivost iontu je přímo úměrná jeho náboji a nepřímo úměrná jeho velikosti a viskozitě roztoku. Elektroforetická pohyblivost tedy závisí na povaze analyzované látky.

Rychlost *i*-tého iontu v elektrickém poli $v_{ef,i}$ [$m \cdot s^{-1}$] je pak vyjádřena vztahem (10)

$$v_{ef,i} = \mu_{ef,i} \cdot E \tag{10}$$

zahrnujícím vliv intenzity elektrického pole E [$V \cdot m^{-1}$] .

Velký vliv na separaci v CZE má elektroosmotický tok, jehož pohyblivost je definována vztahem (11) a rychlost vztahem (12)

$$\mu_{eof} = \frac{\varepsilon \cdot \xi}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \qquad (11) \qquad v_{eof} = \mu_{eof} \cdot E \qquad (12)$$

kde μ_{eof} je elektroosmotická pohyblivost v [$m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$], ξ je elektrokinetický neboli zeta potenciál [V], ε značí dielektrickou konstantu základního elektrolytu [$F \cdot m^{-1}$]. Důležitou charakteristikou EOF je právě ξ, jehož velikost je přímo úměrná velikosti náboje na vnitřním povrchu kapiláry a je tedy závislá na pH. S rostoucím pH hodnota ξ roste, a tím roste i rychlost EOF. Velikost EOF dále závisí na iontové síle roztoku základního elektrolytu a to tak, že zvýšením iontové síly vzroste množství kationtů v roztoku, tím dochází k zúžení elektrické dvojvrstvy, a EOF se sníží.

Celková pohyblivost *i*-tého iontu je pak výslednicí jeho elektroforetické rychlosti a rychlosti EOF podle rovnice (13)

$$v_{tot,i} = v_{ef,i} + v_{eof} \qquad (13)$$

Protože $\mu_{ef,i}$ analytu ani μ_{eof} nelze měřit přímo experimentálně, můžeme jejich hodnotu zjistit nepřímo pomocí změřeného migračního času analytu $t_{m,i,}$ dle vztahu (14)

$$t_{m,i} = \frac{l}{v_{tot,i}} \qquad (14)$$

kde l je efektivní délka kapiláry [m] a $v_{tot,i}$ je celková rychlost *i*-tého iontu [$m \cdot s^{-1}$].

2.3.2.3. Optimalizace kapilární zónové elektroforézy

Optimalizace složení nosného elektrolytu (pH, iontová síla, použitý pufrovací systém) je jednou ze základních možností, jak lze ovlivnit separaci pomocí CZE. Hodnota *p*H a koncentrace (iontová síla) separačního roztoku mají vliv na disociační rovnováhy slabých elektrolytů i silanolových skupin na vnitřním povrchu kapiláry. Při vysokém *p*H (použití neutrálních či bazických tlumivých roztoků např. fosforečnanový, TRIS nebo tetraboritanový pufr) a nízké iontové síle je obvyklá vysoká elektroosmotická pohyblivost. Elektroosmotický tok působí jako neselektivní síla, významně však ovlivňuje výslednou migrační rychlost přítomných analytů, a tím i účinnost separace a dobu analýzy (Xu 1996).

Obdobně elektroforetická pohyblivost slabých elektrolytů je silně závislá na *p*H separačního elektrolytu – nejvyšší elektroforetickou pohyblivost budou slabé elektrolyty vykazovat při *p*H

zajišťujícím jejich plnou disociaci, nulovou pohyblivost pak budou mít při *p*H kompletně potlačujícím disociaci.

Dalšími faktory majícími vliv na separaci je teplota (s rostoucí iontovou silou roste vodivost, ale i produkce tepla, které vytváří deformovaný parabolický rychlostní profil zón), míra rozmytí dále souvisí s viskozitou nosného elektrolytu. Přídavek organického modifikátoru významně ovlivňuje ξ potenciál a často i viskozitu roztoku. Zkrácení doby analýzy lze jednoduše dosáhnout zvýšením napětí vkládaném na elektrody, s rostoucím intenzitou elektrického pole obvykle roste hodnota rozlišení díky vyšší separační účinnosti, efekt je ale limitován efektivitou odvodu generovaného tepla.

2.3.3. Srovnání HPLC a CZE

CZE a HPLC jsou běžně používané vysokoúčinné separační techniky s odlišným principem separace. V praxi je oceňována především jejich komplementarita poskytující komplexní informaci o složení vzorku s komplikovanou matricí.

CZE je technika instrumentálně jednodušší, vhodná k analýzám malých objemů vzorků s komplexní matricí bez nutnosti jejich větší předúpravy. Obecnými přednostmi této techniky je také krátká doba analýzy, malá spotřeba vzorku, elektrolytů a rozpouštědel, vysoká účinnost separace a často i vyšší dosažitelná hodnota rozlišení v porovnání s chromatografií. HPLC je naproti tomu komplikovanější metodou z hlediska technické realizace, avšak vykazuje vyšší robustnost, univerzálnost danou výběrem velkého počtu kombinací stacionárních a mobilních fází. Analytické výsledky získané metodou HPLC jsou obvykle reprodukovatelnější a spolehlivější, často však za cenu vyšší finanční a časové náročnosti.

CZE a HPLC nelze chápat jako vzájemně si konkurující techniky, ale zejména jako doplňující se nástroje chemické analýzy (např. při ověřování čistoty analyzovaných látek v případě shody získaných dat). Vzorky, které jsou k dispozici v omezeném množství se s výhodou analyzují pomocí CZE, zatímco pro preparativní účely (i pro odběr frakcí pro následná měření) je daleko vhodnější HPLC (Kašička 1997; Plaček 2011).

2.4 Hodnocení stability

Znalost struktury a zastoupení komplexů a jejich degradačních produktů v reakční směsi je základním předpokladem pro úspěšnou optimalizaci podmínek přípravy čistých produktů. V této souvislosti je vhodné připomenout, že i klinicky používané rheniové komplexy jsou pacientovi podávány ve formě reakční směsi bez předchozí izolace aktivní látky. Reakce probíhající v reakční směsi a jejich rychlost byly sledovány kontinuálním měřením UV-VIS spektroskopií a ESI-MS analýzou.

2.4.1. UV-VIS spektrometrie

UV-VIS spektrometrie patří mezi běžné spektrofotometrické techniky, jejichž podstatou je hodnocení interakce elektromagnetického záření o vhodné energii (UV oblast 200 – 400 nm, VIS oblast 400 - 770 nm) se zkoumanou látkou. Závislost množství absorbovaného záření na vlnové délce představuje absorpční spektrum. Díky přítomnosti *O*-substituovaných aromatických ligandů, vykazují připravované komplexy rhenia silnou absorpci ve viditelné oblasti. Výrazné rozdíly v zabarvení jednotlivých komplexů umožnilo sledovat kinetiku přechodů mezi těmito formami pomocí UV-VIS absorpční spektrometrie.

2.4.2. ESI-MS spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie s užitím měkkých ionizačních technik je nástrojem vhodným, jak pro charakterizaci struktury rheniových komplexů, tak pro sledování jejich chemických přeměn v reálném čase (Štícha et al. 2015). ESI-MS patří mezi analytické techniky vhodné ke strukturní charakterizaci Tc a Re komplexů užívaných v nukleární medicíně (De Vries et al.1990). Hmotnostní spektra nízkého rozlišení získaná pomocí ESI-MS, podávají jednoznačnou informaci o molekulové hmotnosti, druhu a počtu navázaných ligandů a celkové struktuře studovaných komplexů. Díky těmto znalostem mohou být vyvíjeny nové postupy přípravy čistých Re komplexů potenciálně vhodných k použití v nukleární medicíně (Štícha et al. 2015, Tisato et al. 2004).

3. PRAKTICKÁ ČÁST

3.1. Použité chemikálie

- Tetrabutylammonium tetrachlorooxorhenát (V) [(*n*-Bu_4N)($ReOCl_4$)] od firmy Sigma-Aldrich (Gillingham, Dorset, UK) 98 %
- 1,2-dihydroxybenzen (katechol, cat) 99 % od firmy Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany)
- 2,3-dihydroxynaftalen (dhn) 98 % od firmy Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany)
- 1,2,3-trihydroxybenzen (pyrogallol, PG) 99 % od firmy Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany)
- Deuterovaný acetonitril pro NMR spektrometrii (ACN-d3) 99,8 % od firmy Euro-isotop
- Acetonitril (ACN) pro HPLC a UV-VIS spektrometrii od firmy Lach-Ner (Neratovice, Czech Republic), před použitím v HPLC byl vysušen a zbaven kyslíku
- Mravenčan amonný (AF) (10 mM vodný roztok)
- Triethylamin (TEA) od firmy Sigma-Aldrich (Gillingham, Dorset, UK), používá se jako 10 % (v/v) zásobního roztoku v ACN
- ESI kalibrační směs pro iontovou past a APCI / APPI ionizaci byla od firmy Agilent (Santa Clara, USA)
- Dusík používaný jako sušící a rozprašovací plyn byl dodáván pomocí LC-MS-11 NGM dusíkového generátoru od společnosti Bruker Daltonics (Německo)
- Helium 4.6 bylo zakoupeno od Linde Gas a.s. (Praha, Česká republika)

3.2. Použitá instrumentace a postupy

Stolní pH metr XS pH 50,P11 s kombinovanou údržbovou elektrodou Sentek od firmy Verkon (Praha). Byla používána deionizovaná H_2O připravená v Mili-Q plus od Millipore a.s. (Francie). Pevné látky byly odváženy s použitím mikrováh Sartorius 7085011 (Sartosius Gmbh, Gottingen, Německo).

Pro HPLC chromatografii byl použit přístroj HP 1100 s kvartérním čerpadlem (G1311A), autosamplerem (ALS G1313A) a DAD detektorem (G1315A) od firmy Hewlet Packard (USA). Použity byly následující chromatografické kolony:

- Agilent Zorbax SAX 150 x 4,6mm, 5 µm;
- Phenomenex Luna 5 NH_2 100 x 10 mm 5 µm;
- Dr. Maisch HPLC GmbH Reprosil NH_2 150 x 3 mm 3 µm.

Data byla vyhodnocena pomocí softwaru Agilent ChemStation (USA).

Při měření CZE byl použit přístroj Agilent Technologies 7100 (USA). Jako separační kolona byla použita křemenná kapilára o vnitřním průměru 50 µm a vnějším průměru 375 µm, délka do

detektoru byla 40 cm a celková délka 50 cm, od firmy Agilent Technologies (USA). Vyhodnocování bylo prováděno pomocí softwaru Agilent ChemStation (USA). Použité nosné elektrolyty jsou uvedeny v **tabulce 2**.

Tabulka 2 Složení borátových nosných elektrolytů

Nosný elektrolyt	Složení*	pH**
NE1	5 mM k. boritá + 5 mM NaH_2PO_4	6,23
NE2	5 mM k. boritá + 5 mM NaH_2PO_4 + NaOH(nas.)	6,65
NE3	5 mM k. boritá + 5 mM NaH_2PO_4 + NaOH(nas.)	7,43
NE4	10 mM k. boritá + NaOH(nas.)	7,94
NE5	10 mM k. boritá + NaOH(nas.)	8,80
NE6	10 mM tetraboritan sodný	9,45
NE7	10 mM tetraboritan sodný + NaOH(nas.)	9,97
NE8	5 mM tetraboritan sodný + NaOH(nas.)	10,48
NE9	5 mM tetraboritan sodný + NaOH(nas.)	11,26

* složení nosného elektrolytu před úpravou vodivosti na hodnotu 1200 μS

** finální hodnota pH po úpravě vodivosti na hodnotu 1200 μS

Měření IR bylo provedeno bez použití kyvety v KBr disku pomocí Nicolet 380 FT-IR spektrometru od firmy Thermo Scientific (USA). Spektra byla vyhodnocena pomocí programu EZ OMNIC Thermo Electron Corporation Software Informer od firmy Thermo Scientific (USA).

Při měření NMR byl použit přístroj Bruker Avance III (600 MHz) NMR spektrometr (Německo). Použity byly 1ml NMR kyvety. Reakční směs pro hodnocení NMR byla připravena smísením 1,76 mg tetrachlorooxorhenátu s 0,94 mg PG a rozpuštěním v 1 ml ACN-d3. Vyhodnocovací program byl 1D NMR Processor od ACD Labs (Kanada).

Při měření UV-VIS byl použit jednopaprskový spektrometr Thermo Evolution 60 od firmy Thermo Scientific (USA). Dále byly použity 3 ml křemenné kyvety s definovanou optickou délkou 1 cm. Vše bylo řízeno a vyhodnocováno počítačovým softwarem Vision Lite Scan 5od firmy Thermo Scientific (USA). UV-VIS kinetická měření byla odečítána ve vybraných časových intervalech od 300 do 700 nm, s krokem 5 nm.

APPI-MS a ESI-MS meření 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

Data Analysis 3.3.56 od firmy Bruker Daltonics (Německo). Jako čerpadlo byla použita injekční pumpa Cole se Parmer (USA).

Měření LDI-MS byla prováděna na MALDI-TOF/TOF Ultraflex II s 337 nm dusíkovým laserem od společnosti Bruker Daltonics (Německo). Vzorky byly nanášeny na MTP 384 terč z leštěné nerezové oceli od Bruker Daltonics (Německo). Spektra byla získána a analyzována pomocí softwaru FlexControl a FlexAnalysis od Bruker Daltonics (Německo).

3.3. Podmínky měření pomocí ESI-MS, APPI-MS a LDI-MS

Data ESI-MS byla měřena v módu negativních iontů v rozsahu 260 – 1000 Da. Při všech měřeních dosahoval tlak rozprašovacího plynu 18 psi při průtokové rychlosti 5 $l \cdot min^{-1}$. Teplota při desolvataci byla 300°C a kapilární napětí bylo nastaveno na 4000 V. Připravené roztoky vzorků byly nadávkovány injekční pumpou do rozprašovače při průtoku 8 $\mu l \cdot min^{-1}$.

ESI-MS/MS spektra byla zaznamenávána v režimu Cut-off módu nastaveného na hodnotu zhruba jedné třetiny m/z mateřského iontu. Šířka izolace mateřského iontu byla nastavena na 4 Da pro získání celého izotopového profilu fragmentů. Amplituda fragmentace byla nastavena na interval od 0.8 V do 1.2 V. Všechny ostatní experimentální podmínky byly stejné jako ty, které byly použity při ESI-MS měřeních.

Při APPI-MS analýze byla teplota zdroje 350°C a tlak rozprašovacího plynu 20 psi. Při všech měřeních byl průtok sušícího plynu 5 $l \cdot min^{-1}$ a jeho teplota byla 250°C. Na kapiláře bylo nastaveno napětí 1500 V. Analyzovaný vzorek byl zředěn v ACN a pomocí injekční pumpy byl dávkován do rozprašovače při rychlosti průtoku 100 $\mu l \cdot min^{-1}$.

LDI-MS spektra byla získána taktéž v módu negativních iontů v rozsahu 260 – 1000 Da. Vzorky byly naneseny z roztoku v ACN terč z leštěné nerezové oceli. Výkon laseru byl nastaven tak, aby bylo dosaženo vysokého poměru signál / šum při maximálním rozlišení.

3. 4. Výpočet indexu podobnosti hmotnostních spekter

Shoda mezi experimentálně získaným a teoreticky vypočítaným izotopovým zastoupením klastrů molekulárních iontů byla hodnocena na základě indexu podobnosti (*SI*) (Wan et al. 2002). Odpovídající vzorec (15) je uveden níže, v němž $(i - i_0)$ je rozdíl v intenzitě signálu dvojice píků a N je počet vybraných iontů:

$$SI = \sqrt{\frac{\sum_i \left\{\frac{i - i_0}{i_0}\ 100\right\}^2}{N}} \qquad (15)$$

Index podobnosti může nabývat hodnot od 0 do 1. Porovnávané soubory píků s *SI* = 0 jsou identické. Pro procentuální vyjádření podobnosti izotopového zastoupení, byly dále vyjadřovány hodnoty *SI* jako (1 – *SI*)100. Teoretické izotopové klastry byly vypočítány pomocí softwaru Data Analysis 3.3.56 od Bruker Daltonics (Německo).

3. 5. Příprava rheniových komplexů

- S katecholem jako ligandem

Do 5 ml vialky s teflonovým septem bylo odváženo 1.76 mg [(n-Bu_4N)($ReOCl_4$)] (1.0 μmol) a 0.66– 1,32 mg katecholu (2.0 – 4,0 μmol) a odpipetovány 3 ml acetonitrilu. Po úplném rozpuštění složek bylo do reakční směsi přidáno 8,4 - 33,5 μl 10 % v/v roztoku TEA v acetonitrilu (2,0 – 8,0 μmol).

- S 2,3-dihydroxynaftalenem jako ligandem

Do 5 ml vialky bylo odváženo 1.76 mg [(n-Bu_4N)($ReOCl_4$)] (1.0 μmol) a 0.96– 1,92 mg 2,3-dihydroxynaftalenu (2.0 – 4,0 μmol) a přidány 3 ml acetonitrilu. Po úplném rozpuštění složek bylo do reakční směsi odpipetováno 8,4 - 33,5 μl 10 % v/v roztoku TEA v acetonitrilu (2,0 – 8,0 μmol).

- S pyrogallolem jako ligandem

Do 5 ml vialky s teflonovým septem bylo odváženo 1.76 mg [(n-Bu_4N)($ReOCl_4$)] (1.0 μmol) a 0.76 – 1,52 mg pyrogallolu (2.0 – 4,0 μmol) a odpipetovány 3 ml acetonitrilu. Po úplném rozpuštění složek bylo do reakční směsi přidáno 8,4 - 33,5 μl 10 % v/v roztoku TEA v acetonitrilu (2,0 – 8,0 μmol). Pro účely dlouhodobé kinetické studie byla připravena reakční směs bez přídavku TEA.

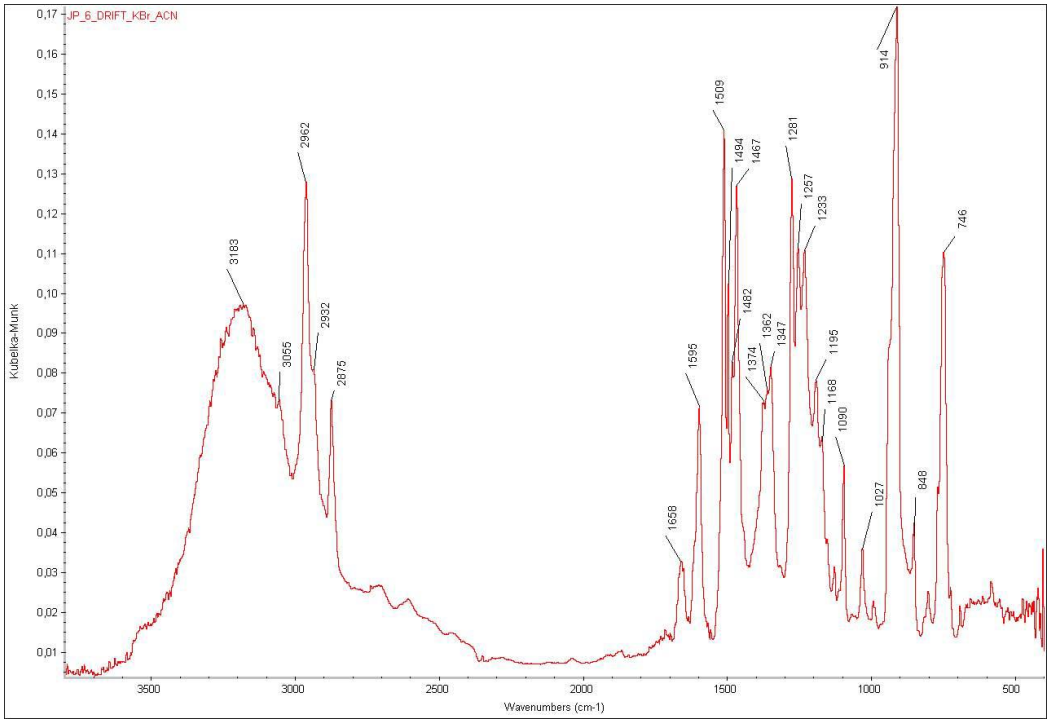
Příprava všech komplexů probíhala za laboratorní teploty.

3. 6. Charakterizace vybraných komplexů metodou IR a NMR

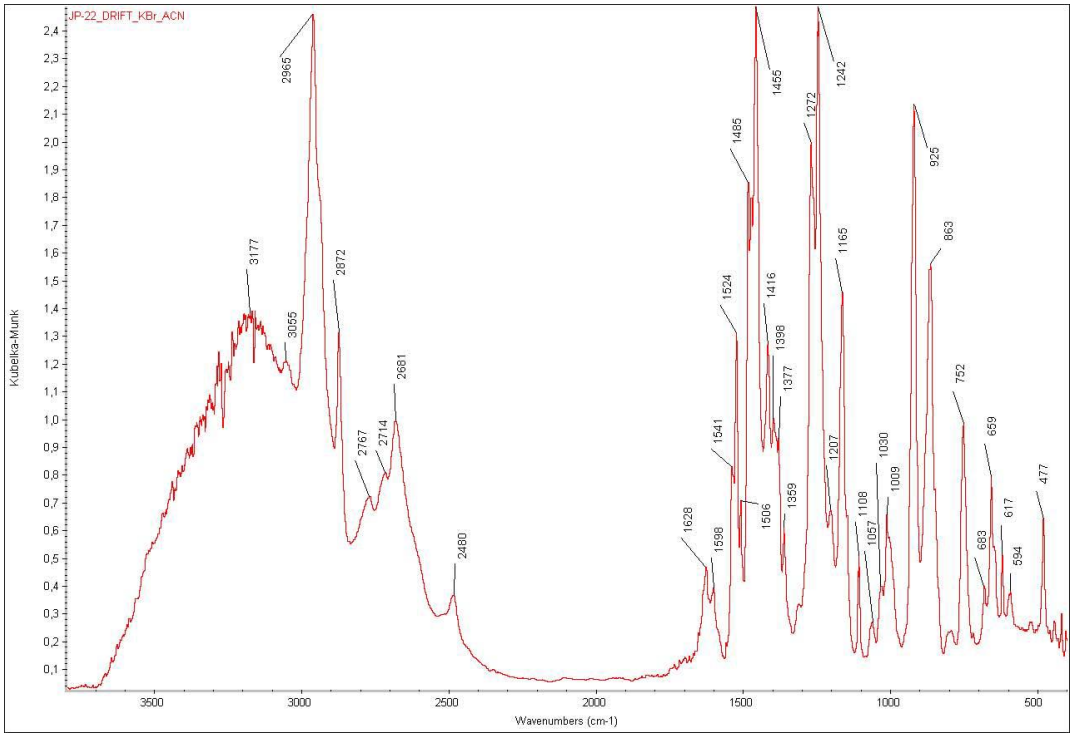
- IR spektrometrie

Infračervená spektra připravených komplexů vykazují silnou absorpci v oblasti 910 – 1000 cm^{-1}, která je charakteristická pro koncovou Re=O skupinu. Intenzivní absorpční pás v oblasti 1470 – 1520 cm^{-1} přísluší aromatické skupině C=C. Další intenzivní pásy při

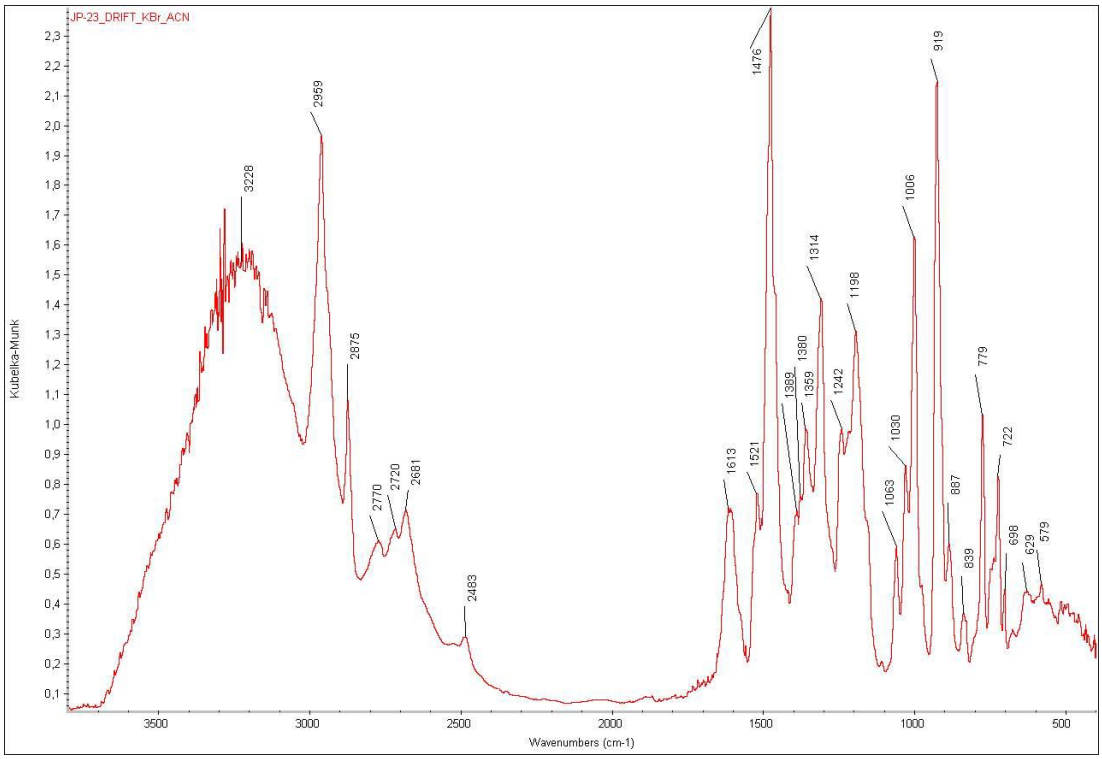
2962, 2932 a 1509 cm^{-1}, v tomto pořadí, odpovídají přítomnosti tetrabutylammoniového kationtu. Na **obrázcích 3 – 5** jsou uvedena IR spektra jednotlivých vybraných komplexů.



Obrázek 3 IR spektrum bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorheniového komplexu



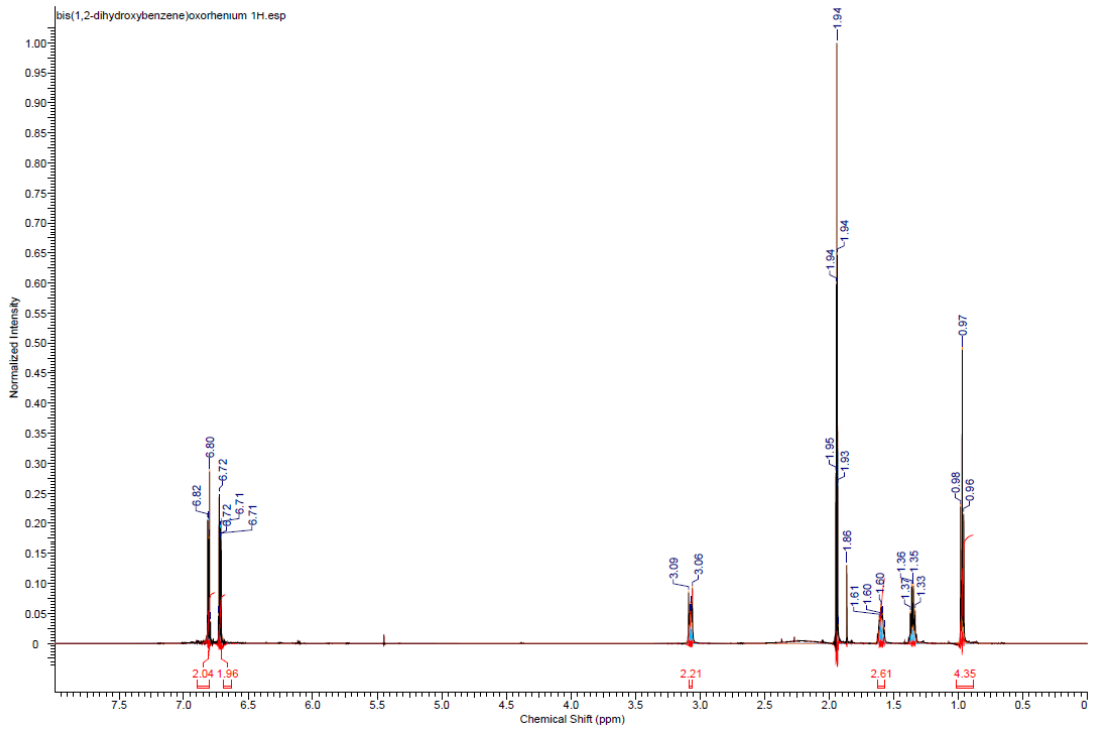
Obrázek 4 IR spektrum bis(2,3-dihydroxynaftalen)oxorheniového komplexu



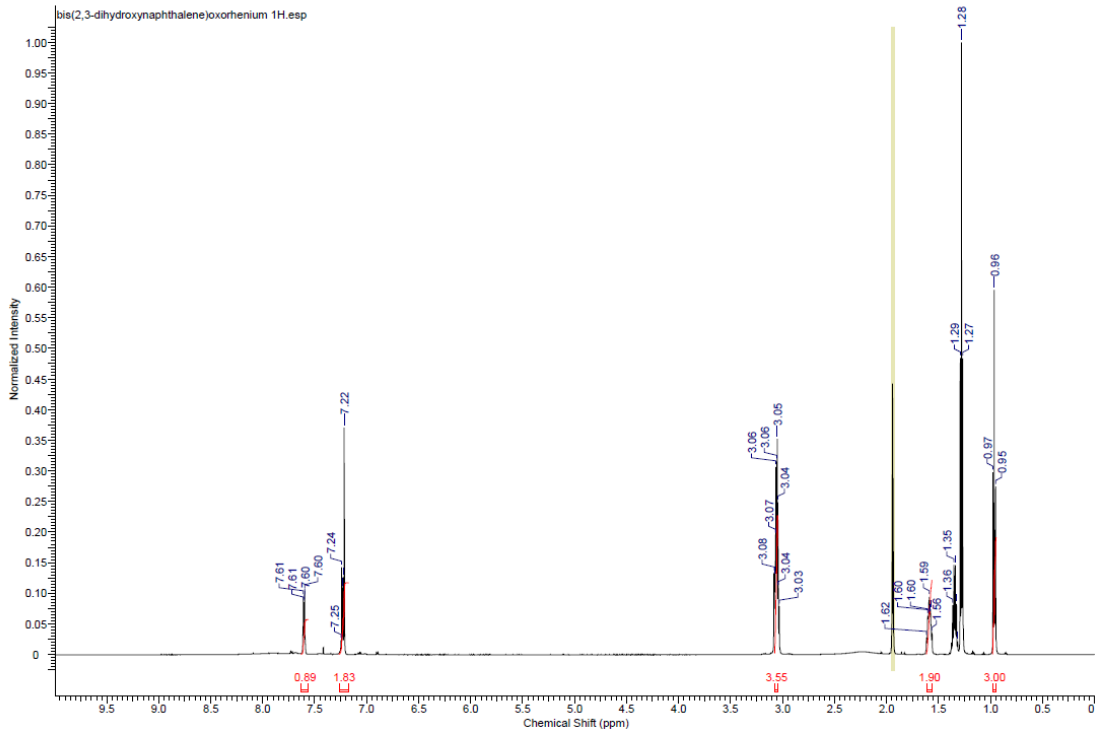
Obrázek 5 IR spektrum bis(1,2,3-trihydroxybenzen)oxorheniového komplexu

- ^{1}H NMR spektra

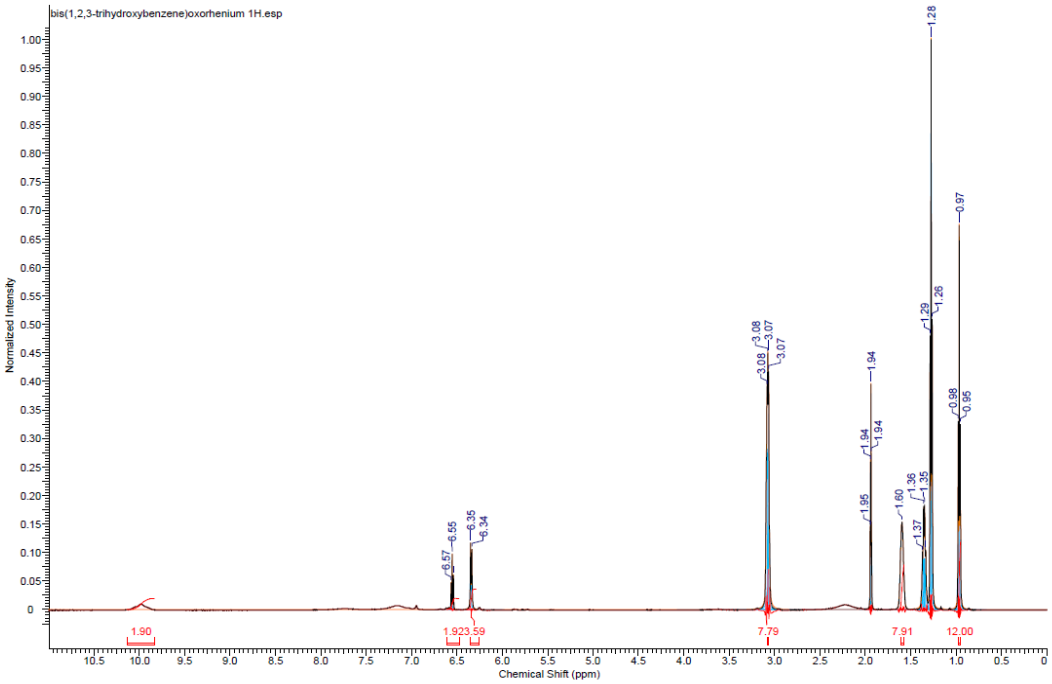
Komplexy připravené v deuterovaném ACN-d3 vykazují ostré, dobře rozdělené píky v ^{1}H NMR spektru. Komplex $[Re(O)(cat)_2]^-$ poskytuje posuny při (600 MHz, ACN-d3): δ: 6.82 -6.79 (m, 4H), 6.73 – 6.70 (m, 4H). Komplex $[Re(O)(dhn)_2]^-$ poskytuje posuny při δ:7.62 -7.59 (m, 4H), 7.25 – 7.22 (m, 8H). Komplex $[Re(O)(PG)_2]^-$ poskytuje posuny při δ: 7.16 (bs, 2H), 6.56 – 6.54 (m, 2H), 6.35 – 6.34 (m, 4H). Charakteristické posuny tetrabutylammoniového kationtu při 3.09 - 3.06 (m, 8H), 1.62 – 1.57 (m, 8H), 1.38 – 1.32 (m, 8H), 0.97 (t, j = 7.3 Hz, 12H) ppm jsou společné pro všechny komplexy. ^{1}H NMR spektra připravených komplexů ilustrují **obrázky 6 – 8**.



Obrázek 6 ^{1}H NMR (600 MHz, ACN-d3) spektrum komplexu $[Re(O)(cat)_2]^-$: δ = 6,82 – 6,79 (m, 4H), 6.73 – 6.70 (m, 4H), 3.09 – 3.06 (m, 8H), 1.62 – 1.57 (m, 8H), 1.38 – 1.32 (m, 8H), 0.97 (t, J = 7.3 Hz, 12H) ppm.



Obrázek 7 ^{1}H NMR (600 MHz, ACN-d3) spektrum komplexu $[Re(O)(dhn)_2]^-$: 7.62 – 7.59 (m, 4H), 7.25 – 7.22 (m, 8H), 3.08 – 3.03 (m, 8H), 1.62 – 1.56 (m, 8H), 1.38 – 1.32 (m, 8H), 0.96 (t, J=7.1 Hz, 12H) ppm.

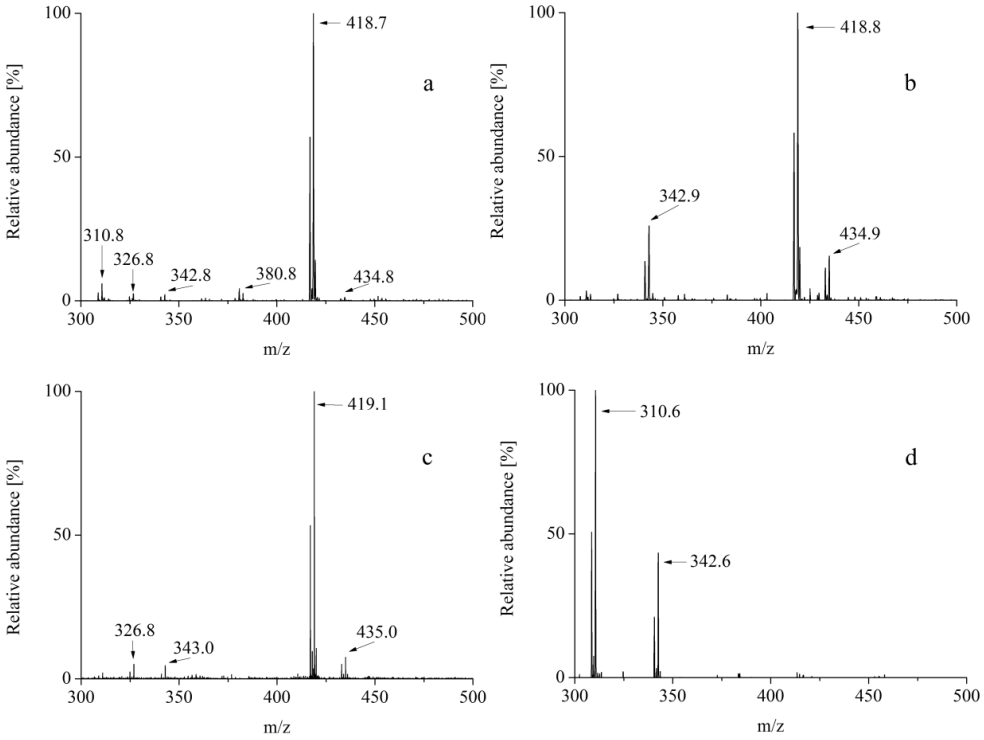


Obrázek 8 ^{1}H NMR (600 MHz, ACN-d3) spektrum komplexu $[Re(O)(PG)_2]^-$: 6.56 – 6.54 (m, 2H), 6.35 – 6.34 (m, 4H), 3.08 – 3.07 (m, 8H), 1.60 (bs, 8H), 1.38 – 1.33 (m, 8H), 0.97 (t, J=7.1 Hz, 12H) ppm.

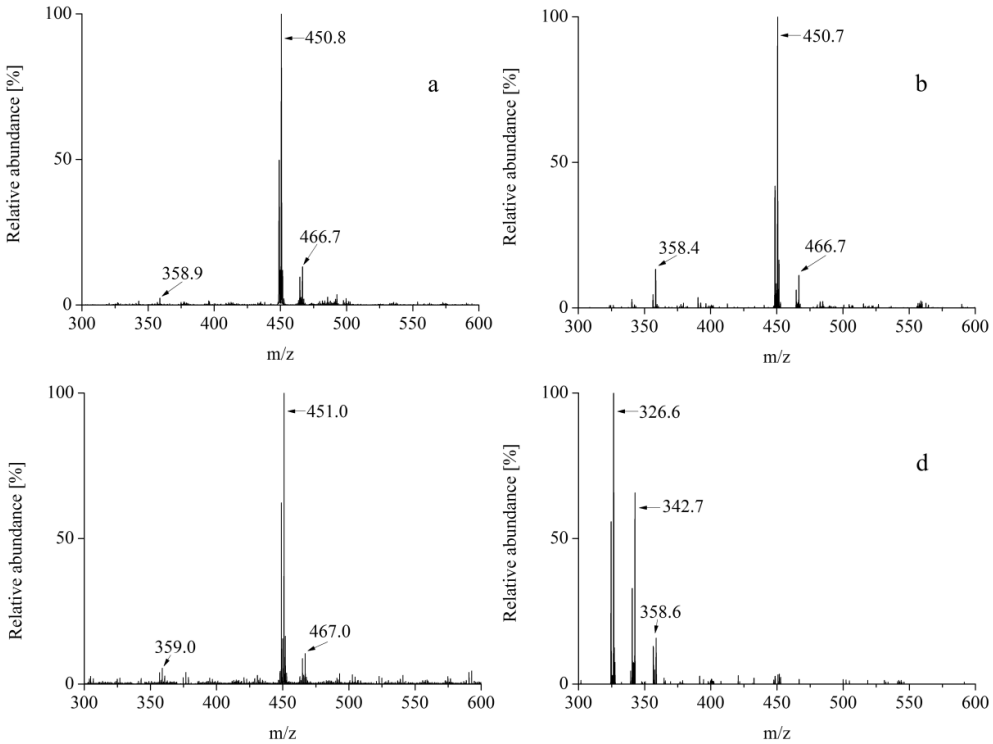
4. Výsledky a diskuze

4.1. Charakterizace rheniových komplexů s pyrogallolem, 2,3-dihydroxynaftalenem a katecholem pomocí hmotnostní spektrometrie

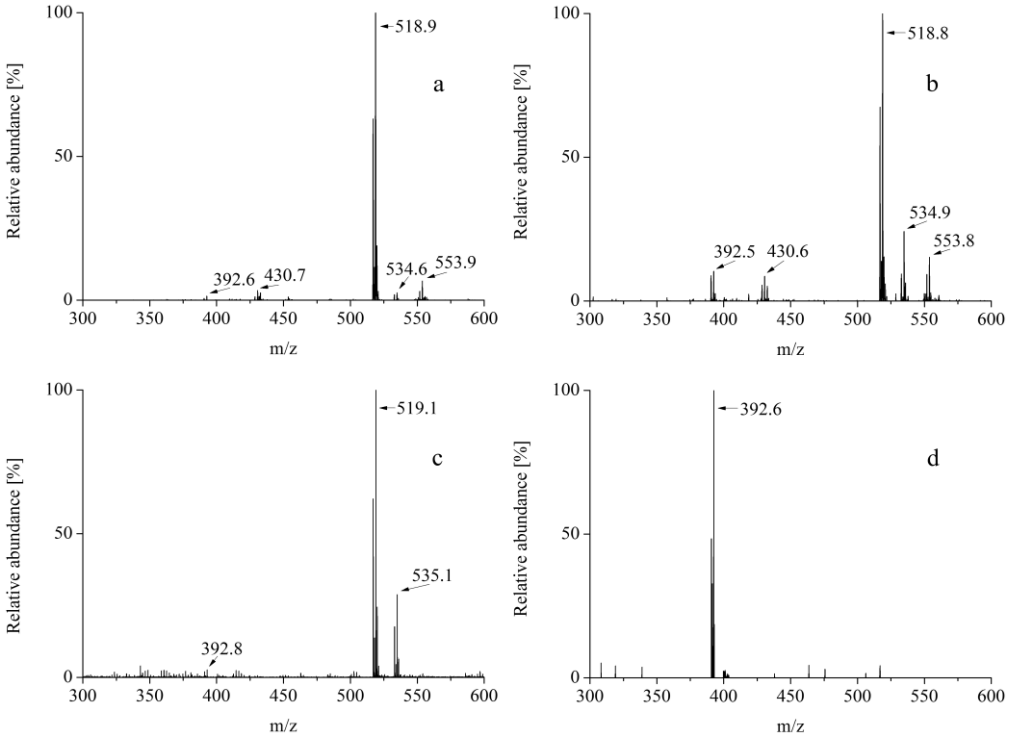
Získaná ESI, APPI a LDI hmotnostní spektra zkoumaných komplexů, společně s doplňujícími ESI-MS/MS spektry, jsou znázorněny na **obrázcích 9 - 11**. Při všech použitých ionizačních technikách bylo pozorováno množství záporně nabitých molekulárních iontů studovaných komplexů s nízkou fragmentací. Zaznamenaná MS spektra v módu negativních iontů, se skládají především z dominantních molekulárních iontů komplexů a dalších iontů, odpovídajících přítomnosti zbytkových činidel, reakčních složek a jejich oxidačních produktů. Protože použité ligandy neobsahují funkční skupiny, které by bylo možné protonizovat, neposkytují spektra v pozitivním módu žádné cenné informace o struktuře připravených komplexů. V kladném módu bylo možné detekovat pouze tetrabutylammoniový kation m/z 242.



Obrázek 9 Hmotnostní spektra komplexu $[Re(O)(cat)_2]^-$ v negativním módu (a) ESI, (b) APPI, (c) LDI a (d) ESI-MS/MS. Přibližná koncentrace komplexu v roztoku vzorku je $5 \cdot 10^{-6}$ mol·l^{-1}.



Obrázek 10 Hmotnostní spektra komplexu $[Re(O)(PG)_2]^-$ v negativním módu (a) ESI, (b) APPI, (c) LDI a (d) ESI-MS/MS. Přibližná koncentrace komplexu v roztoku vzorku je $5 \cdot 10^{-6}$ mol·l^{-1}.



Obrázek 11 Hmotnostní spektra komplexu $[Re(O)(dhn)_2]^-$ v negativním módu (a) ESI, (b) APPI, (c) LDI a (d) ESI-MS/MS. Přibližná koncentrace komplexu v roztoku vzorku je $5 \cdot 10^{-6}$ mol·l^{-1}.

Přehled detekovaných iontů připravených komplexů se zastoupením vyšším než 5 % vzhledem k intenzitě základního píku je uveden v **tabulce 3**. U všech druhů komplexů byly pozorovány charakteristické izotopové klastry. *Z* hodnot (1 – *SI*)100 uvedených v **tabulce 4** je zřejmá shoda mezi vypočítanými a experimentálně získanými daty, která tak potvrzuje správnost určení elementárního složení m/z sledovaných iontů.

Tabulka 3 Přehled iontů v detekovaných reakčních směsích se zastoupením vyšším než 5 % odpovídající intenzitě základního píku, seřazených podle vzrůstajícího poměru m/z.

$[Re(O)(cat)_2]^-$			$[Re(O)(PG)_2]^-$			$[Re(O)(dhn)_2]^-$		
Záznam	**m/z**	**Vzorec**	**Záznam**	**m/z**	**Vzorec**	**Záznam**	**m/z**	**Vzorec**
1*	311	$ReC_6H_4O_3$	7*	327	$ReC_6H_4O_4$	12*	393	$ReC_{10}H_6O_5$
2	327	$ReC_6H_4O_4$	8*	343	$ReC_6H_4O_5$	13	431	$ReC_{10}H_6O_3Cl_2$
3*	343	$ReC_6H_4O_5$	9*	359	$ReC_6H_4O_6$	**14**	**519**	$\mathbf{ReC_{20}H_{12}O_5}$
4	381	$ReC_6H_4O_3Cl_2$	**10**	**451**	$\mathbf{ReC_{12}H_8O_7}$	15	535	$ReC_{20}H_{12}O_6$
5	**419**	$\mathbf{ReC_{12}H_8O_5}$	11	467	$ReC_{12}H_8O_8$	16	554	$ReC_{20}H_{12}O_5Cl$
6	435	$ReC_{12}H_8O_6$						

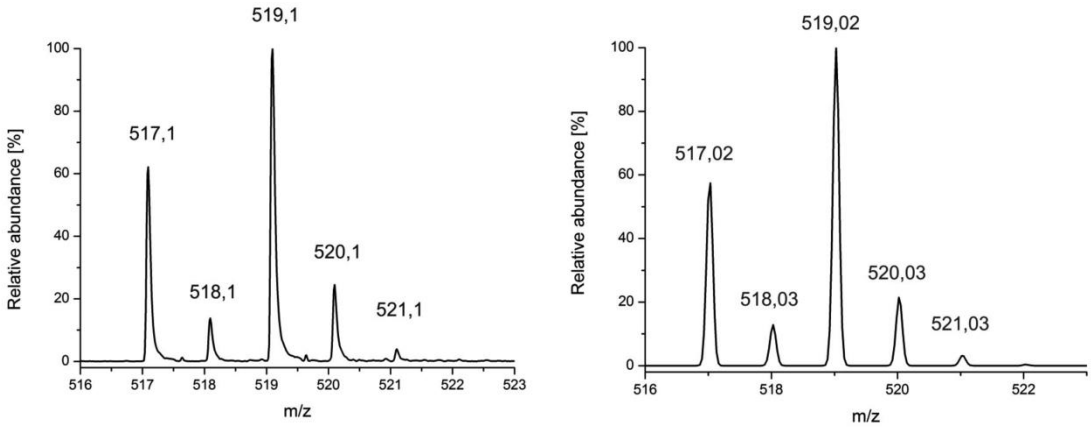
* identifikovány pomocí ESI-MS/MS jako fragmentové ionty. Požadované produkty jsou zvýrazněny tučným písmem.

Tabulka 4 Experimentální (exp.) a vypočítané (calc.) hodnoty relativních intenzit *I* [%] jednotlivých iontů v izotopovém zastoupení klastrů s vypočtenými hodnotami indexů podobnosti *SI*.

			ESI		APPI		LDI	
Komplex	**Vzorec**	**m/z**	**I % calc.**	**I % exp.**	**I % calc.**	**I % exp.**	**I % calc.**	**I % exp.**
		417	59,1	56,9	59,1	56,9	59,1	53,4
		418	7,8	4,2	7,8	4,2	7,8	9,5
$[Re^{V}(O)(cat)_2]^-$	$C_{12}H_8O_5Re$	419	100	100	100	100,0	100	100,0
		420	13,2	14,1	13,2	14,1	13,2	10,6
		421	1,8	0,4	1,8	0,4	1,8	0,7
			SI[%]=91,9		**SI[%]=91,9**		**SI[%]=89,0**	
		517	58,6	63	58,6	67,5	58,6	62,1
		518	12,9	11,5	12,9	13,8	12,9	13,8
$[Re^{V}(O)(dhn)_2]^-$	$C_{20}H_{12}O_5Re$	519	100	100	100	100,0	100	100,0
		520	21,8	19	21,8	15,4	21,8	24,5
		521	3,3	3	3,3	5,9	3,3	3,9
			SI[%]=91,1		**SI[%]=81,1**		**SI[%]=92,3**	
		449	58,9	49,8	58,9	41,9	58,9	62,3
		450	7,9	20,4	7,9	8,3	7,9	15,6
$[Re^{V}(O)(PG)_2]^-$	$C_{12}H_8O_7Re$	451	100	100	100	100,0	100	100,0
		452	13,3	11,9	13,3	16,5	13,3	16,5
		453	2,2	0,1	2,2	2,0	2,2	3,8
			SI[%]=74,9		**SI[%]=79,1**		**SI[%]=84,2**	

Je zřejmé, že všechny ionizační techniky poskytují molekulární píky s izotopickým zastoupením, které je ve velice dobré shodě s vypočítanými teoretickými hodnotami.

Zjevná podobnost mezi teoretickým a experimentálním izotopovým klastrem molekulárního iontu komplexu bis(2,3-dihydroxynaftalen)oxorhenium(-) je dokumentována na **obrázku 12**.



Obrázek 12 Experimentálně (vlevo) a teoreticky (vpravo) získané izotopové zastoupení klastrů molekulárního iontu komplexu bis(2,3-dihydroxynaftalen)oxorhenium(-), za použití techniky LDI-TOF.

- ESI-MS a APPI-MS experimenty

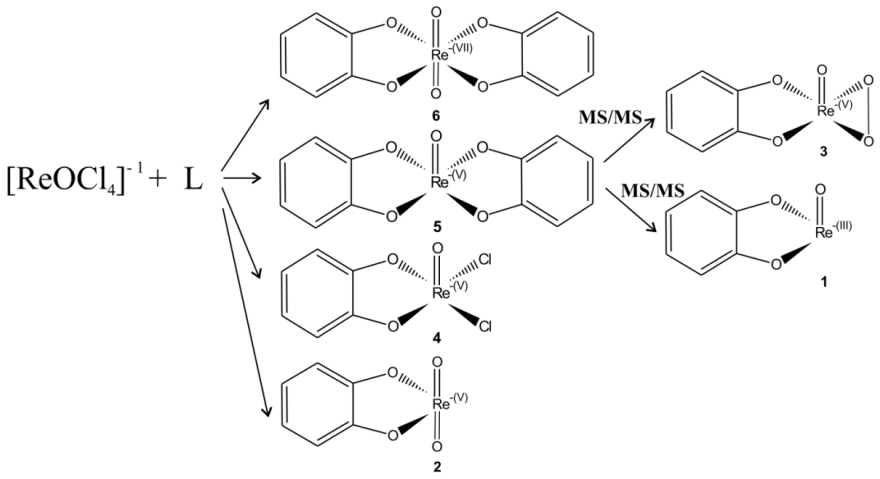
Pomocí ESI a APPI bylo možné detekovat negativně nabité molekulární anionty $[M]^-$ připravených komplexů. Všechny připravené komplexy vykazovaly spektra s dominantními molekulárními ionty a méně intenzivními ionty fragmentů. Zaznamenaná spektra jsou jednoduchá a poskytují přímé informace o struktuře vzniklých komplexů a přítomnosti zbytkových reakčních složek a vedlejších reakčních produktů, včetně produktů oxidace. V zaznamenaných spektrech nebyly pozorovány žádné dimerní či jiné struktury. Rozsah možné ligandové výměny s rozpouštědlem ACN se zdá být zanedbatelný. Z porovnání ESI a APPI spekter nebyla zjištěna přítomnost iontů pocházejících z elektrochemických procesů při ESI ionizaci. Přímé srovnání drobných rozdílů v iontových intenzitách bylo obtížné vzhledem k různému nastavení podmínek pro jednotlivé typy ionizací. Je zřejmé, že různá nastavení diskriminují ionty odlišným způsobem, a tak přímé srovnání intenzit je nemožné. Pokud jde o iont m/z 343 (fragment Re-katecholového komplexu), jeho vyšší relativní intenzita v APPI je dána vyšším faktorem odezvy či vyšším rozsahem fragmentace v průběhu fotoionizace. I u ostatních komplexů bylo při použití APPI pozorováno mírně zvýšení intenzit fragmentových iontů.

- LDI-MS experimenty

Díky přítomnosti heterocyklických aromatických *o*-substituovaných ligandů, vykazují připravené komplexy silnou absorpci v UV-VIS oblasti, a to zejména při 337 nm a v zásadě nevyžadují přídavek matrice. Na rozdíl od dříve zveřejněných MALDI a LDI studií prováděných s Re komplexy (Petroselli et al. 2012) jsme pozorovali velmi intenzivní záporně nabité molekulární ionty. To je pravděpodobně důsledek vysoké stability zkoumaných komplexů, spolu s absencí matrice podporující fotochemicky indukované disociační reakce.

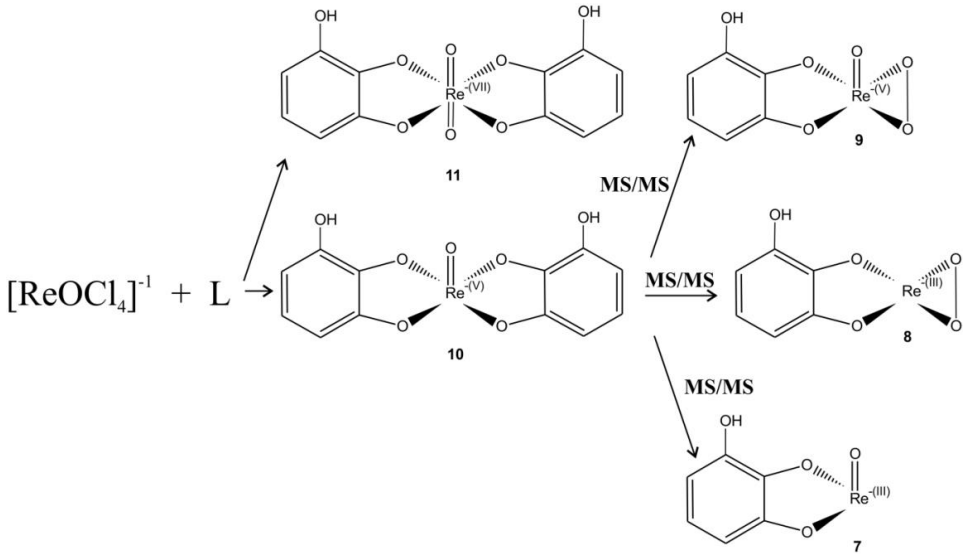
- ESI-MS/MS

ESI-MS/MS experimenty poskytují základní informace o fragmentech vznikajících z molekulárních iontů studovaných komplexů. Díky tomu je možné rozlišit mezi fragmentovými ionty a ionty vzniklými ze sloučenin přítomných v reakční směsi. Někdy však chemické reakce a procesy fragmentace přinášejí stejné iontové struktury. Spektrum iontů vzniklých při ESI-MS/MS fragmentaci molekulárního iontu komplexu jako mateřského iontu jsou znázorněny na **obrázcích 9 - 11**. Iontové struktury zjištěné u $[Re(O)(cat)_2]^-$ (5) reakční směsi jsou shrnuty na **obrázku 13**. Může být učiněn závěr, že struktury (1) a (3) jsou fragmenty, (4) odpovídá molekulárnímu iontu meziproduktu komplexotvorné reakce, struktura (6) náleží dioxoderivátu komplexu a jeho fragmentu (2).



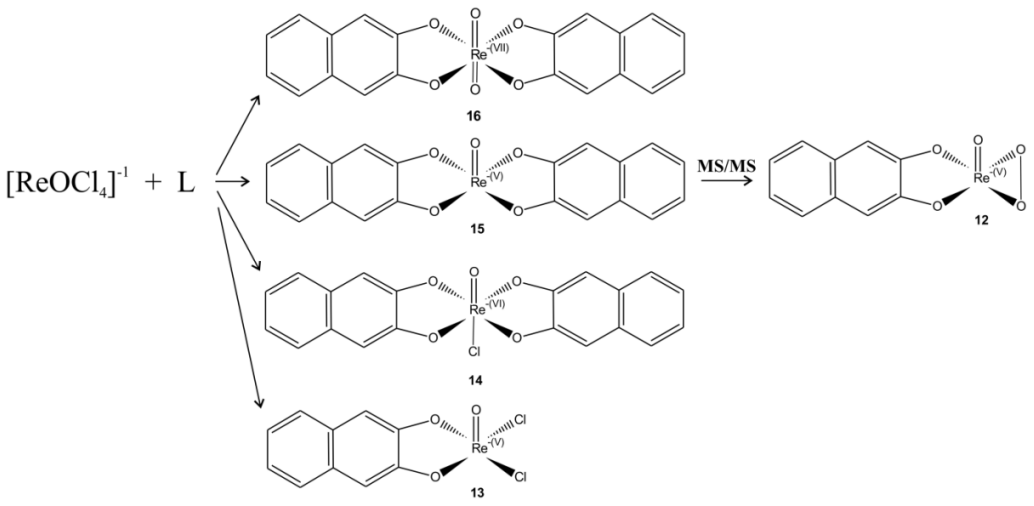
Obrázek 13 Navržené struktury iontů pozorovaných v reakční směsi bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorhenium(-) komplexu pomocí ESI-MS a ESI-MS/MS (L = H_2cat).

Iontové struktury zjištěné v bis(1,2,3-trihydroxybenzen)oxorhenium(-) (10) reakční směsi jsou uvedeny na **obrázku 14**. Ionty (7), (8) a (9) jsou fragmenty a (11) odpovídá dioxoderivátu.



Obrázek 14 Navržené struktury iontů pozorovaných v reakční směsi bis(1,2,3-trihydroxybenzen)oxorhenium(-) komplexu pomocí ESI-MS a ESI-MS/MS (L = PG).

Ionty detekované v bis(2,3-dihyroxynaftalen)oxorhenium(-) reakční směsi jsou znázorněny na **obrázku 15**. Zde jsou spektra iontů odpovídající druhům doprovázejících komplex poměrně bohatá. Zahrnují komplexní meziprodukty (13) a (14) a molekulární ion dioxoderivátu (16). Ion (12) byl jediným pozorovaným MS/MS fragmentem.



Obrázek 15 Navržené struktury iontů pozorovaných v reakční směsi bis(2,3-dihydroxynaftalen)oxorhenium(-) komplexu pomocí ESI-MS a ESI-MS/MS (L = H_2dhn).

Obecně lze říci, že MS/MS fragmentační cesty jsou jednoduché. Dceřinné ionty byly vytvořeny převážně štěpením aromatické části na jednom ligandu (3), (9) a (12), nebo ztrátou celého ligandu [ML] (1) a (7). Nicméně tento zmíněný mechanismus fragmentace nebyl pozorován u bis(2,3-dihydroxynaftalen)oxorhenium(-) komplexu, který je nejstabilnější. Místo toho byl pozorován fragmentový ion při m/z 327 (8). Pro bis(1,2,3-trihydroxybenzen)oxorhenium(-) ion při m/z 327, může být zdůvodněn ztrátou kyslíku z komplexu (9). Doplňkové experimenty APPI-MS/MS neodhalily žádné rozdíly ve fragmentačních cestách.

4.2. Separace připravených rheniových(VII) komplexů pomocí HPLC

Při hledání nejvhodnějších podmínek separace s ohledem na možnost využití metody pro preparativní účely byla stanovena následující kritéria:

t_R <15 min; w < 1min; α >1.4; R_s > 2; n > 400 ; max 10% vodné fáze

4.2.1. Agilent Zorbax SAX 150 x 4,6 mm (5 μm)

Jedná se o Ionexovou kolonu s vázanou polární fází pro dělení aniontů umožňující práci s běžnými organickými rozpouštědly a vodnými roztoky pufrů v rozmezí pH = 2,0 až pH = 7,0. Kolona může být vystavena maximálnímu tlaku 400 bar a teplotě 40°C. Retence aniontů závisí na pH, iontové síle a teplotě mobilní fáze.

- Separace reakční směsi s pyrogallolem

Kolona umožňuje práci jen do teploty 40°C a z tohoto důvodu nebyla vlivu teploty na separační proces věnována větší pozornost. Bylo pouze konstatováno, že při vyšších teplotách dochází k nevýraznému zaostření chromatografických píků a mírnému snížení retence. Tyto změny však byly relativně nepodstatné, a proto byly další experimenty prováděny pouze za laboratorní teploty.

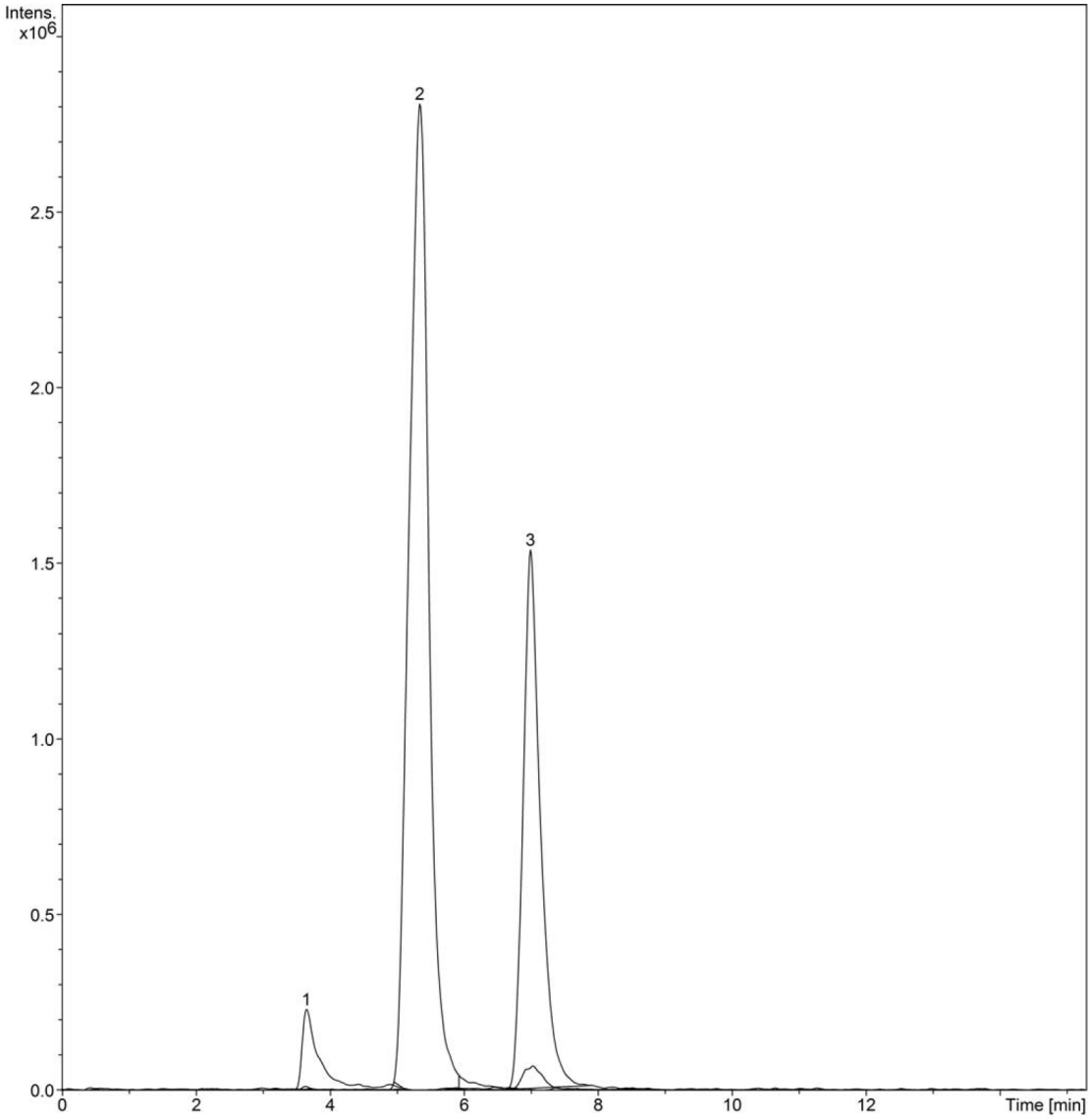
Byl testován vliv průtokové rychlosti na účinnost chromatografické separace. Rychlost průtoku mobilní fáze byla měněna v intervalu 0.7 až 1,1 $ml \cdot min^{-1}$. Při průtokových rychlostech nižších než 0,6 $ml \cdot min^{-1}$ již nebylo možno udržet stabilní tlak v koloně. Na základě naměřených a vypočítaných retenčních parametrů byla jako optimální vyhodnocena rychlost průtoku 1,0 $ml \cdot min^{-1}$. Pro spojení s MS detektorem byl za DAD detektor zařazen dělič průtoku omezující tok do elektrospreje na 1/4, to znamená na 0,25 $ml \cdot min^{-1}$.

Dále byl testován vliv složení mobilní fáze. Vzhledem k požadavkům na nízký podíl vodné fáze byly testovány pouze směsi, kde zastoupení mravenčanu amonného (AF, 10 mM vodný roztok) nepřesáhlo 10 %. Bylo zjištěno, že snížením obsahu pufru se rovněž snižuje eluční síla a tím dochází ke zvýšení retence komplexu. Zároveň dochází k výrazné deformaci a rozmývání chromatografických píků. Zvýší-li se obsah pufru nad 8 %, dochází ke koeluci komplexu a rhenistanu, což se projeví snížením parametrů rozlišení R_s a selektivity α . Jako optimální byl vyhodnocen poměr acetonitrilu a pufru 93 % : 7 %. S tímto poměrem byl dále testován vliv pH.

Vzhledem k charakteru stacionární fáze je možné pracovat pouze v kyselém až neutrálním prostředí. Se zvyšujícím se pH roste eluční síla mobilní fáze a klesá retence jednotlivých složek. Zároveň dochází k zaostřování chromatografických zón, čímž se zvyšuje separační účinnost. Proto byl za optimální vybrán pufr o hodnotě pH = 7,6. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v **tabulce 5.** Chromatogram získaný za optimálních podmínek je na **obrázku 16**. V případě použití pufru s hodnotou nižší než je pH = 4, k eluci rhenistanu ani komplexu již nedochází a na chromatogramu je patrný pouze jeden pík v blízkosti mrtvého času náležící pyrogallolu. Izokratickou elucí za použití uvedených optimálních podmínek byly pro separaci pyrogallolového komplexu vyhodnoceny následující chromatografické parametry. Separační faktor α činil 1,49; rozlišení R_s bylo 2,0 a počet teoretických pater n se rovnal 1225. Uvedené hodnoty byly v souladu s kritérii stanovenými před zahájením procesu optimalizace.

Tabulka 5 Optimalizace separace na koloně Zorbax SAX 150 x 4.6 mm 5 µm (pyrogallol)

				m/z 125			m/z 251			m/z 467					
č.	ACN : AF (pH)	u	t_0	t_R	w	k= $t`_R/t_0$	t_R	w	k= $t`_R/t_0$	t_R	w	k= $t`_R/t_0$	$\alpha=k_2/k_1$	R_s	n
1	90 : 10 (pH= 5,7)	1	1.8	3.3	1	0.833	5.4	0.7	2.000	5.8	0.8	2.222	1.11	0.533	841
2	91 : 9 (pH= 5,7)	0.7	2.6	5.5	1.9	1.139	9.1	1	2.539	10.1	1.5	2.928	1.15	0.800	725
3	91 : 9 (pH= 5,7)	0.8	2.3	4.4	1.6	0.956	8.6	0.9	2.822	9.4	1	3.178	1.13	0.842	1414
4	91 : 9 (pH= 5,7)	1.1	1.6	3.2	1.1	0.956	5	0.6	2.056	5.8	0.8	2.544	1.24	1.143	841
5	91 : 9 (pH= 5,7)	0.9	2.0	3.8	1.2	0.900	7.9	0.8	2.950	8.9	0.8	3.450	1.17	1.250	1980
6	91 : 9 (pH= 5,7)	1	1.8	3.5	1.1	0.944	5.5	0.7	2.056	6.5	0.8	2.611	1.27	1.307	981
7	93 : 7 (pH= 4,9)	1	1.8	3.3	1	0.833	7.2	1.1	3.000	9.1	1.1	4.056	1.35	1.727	1095
8	93 : 7 (pH= 7,6)	1	1.8	3.6	0.8	1.000	5.3	0.9	1.944	7	0.8	2.889	1.49	2.000	1225
9	92 : 8 (pH= 5,7)	1	1.8	3.9	1.2	1.167	5.6	0.9	2.111	7.5	0.9	3.167	1.50	2.111	1111
10	93 : 7 (pH= 5,7)	1	1.8	4.2	1.2	1.333	5.7	0.9	2.167	8.1	0.9	3.500	1.62	2.667	1296
11	95 : 5 (pH= 5,7)	1	1.8	5.4	1.7	2.000	6.9	1.1	2.833	12.4	1.0	5.889	2.08	5.238	2460



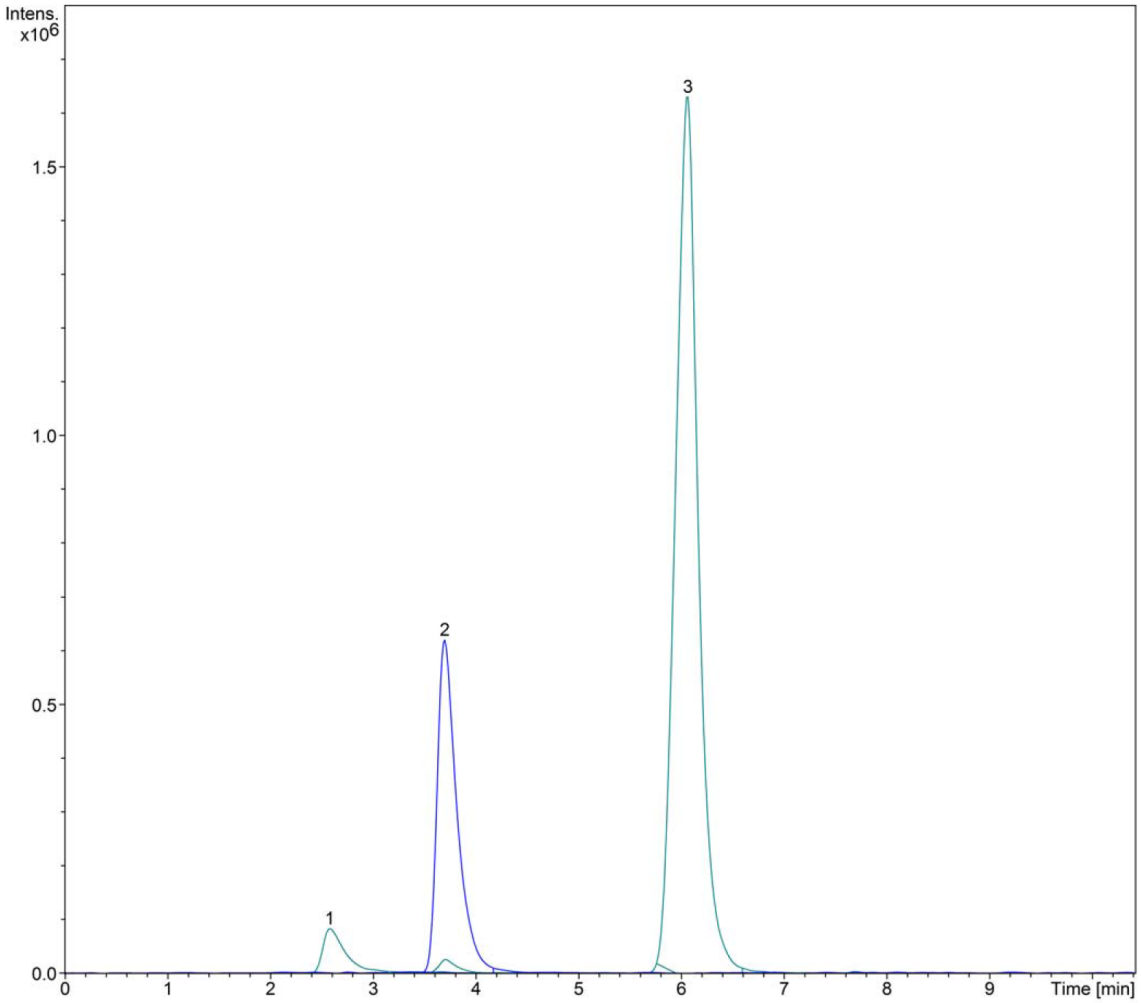
Obrázek 16 Chromatogram vybraných iontů 1- pyrogallol (m/z 125); 2 – rhenistan (m/z 251); 3 - komplex $[Re(O)_2(PG)_2]^-$ (m/z 467).

- Separace reakční směsi s katecholem

Nalezená optimální průtoková rychlost mobilní fáze 1,0 ml·min^{-1}, byla použita i pro optimalizaci separace reakční směsi katecholového komplexu. Lze konstatovat, že podmínky HPLC optimalizované při separaci složek reakční směsi obsahující pyrogallolový komplex vyhovují i pro komplex katecholový. Jak se ukázalo, retenční faktor *k* vykazuje pro tento komplex zhruba poloviční hodnoty, což vede k tomu, že k eluci dochází dříve a pík komplexu se za optimálních podmínek posouvá před pík rhenistanu. Snižování hodnoty pH mravenčanového pufru vede k prodlužování retenčních časů a k výraznému rozšíření chromatografických píků, a to zejména u rhenistanu. Zcela analogicky jako v případě pyrogallolového komplexu, při použití pufru s hodnotou nižší než je pH = 4, k eluci rhenistanu ani komplexu již nedochází a na chromatogramu je patrný pouze jeden pík v blízkosti mrtvého času náležícímu katecholu. Jako optimální byly vyhodnoceny tyto podmínky: složení mobilní fáze ACN : AF v poměru 93 % : 7 %; pufr o pH = 7,6 a rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml·min^{-1}. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v **tabulce 6.** Chromatogram získaný za optimálních podmínek je na **obrázku 17**. Izokratickou elucí za použití uvedených podmínek byly pro separaci katecholového komplexu vyhodnoceny následující chromatografické parametry. Separační faktor α činil 2,21; rozlišení R_s bylo 3,29 a počet teoretických pater *n* se rovnal 447. Tyto hodnoty byly v souladu s kritérii stanovenými před zahájením procesu optimalizace.

Tabulka 6 Optimalizace separace na koloně Zorbax SAX 150 x 4.6 mm 5 µm (katechol)

				m/z 109			m/z 251			m/z 435					
č.	ACN : AF (pH)	u	t_0	t_R	w	k= $t`_R/t_0$	t_R	w	k= $t`_R/t_0$	t_R	w	k= $t`_R/t_0$	$\alpha=k_2/k_1$	R_s	n
1	93 : 7 (pH= 5,7)	1	1.8	4.2	1.1	1.333	5.7	1.9	2.167	6.1	0.9	2.389	1.10	0.286	735
2	93 : 7 (pH= 4,2)	1	1.8	3.7	1.3	1.056	26.3	5.6	13.611	20.2	1.3	10.222	1.33	1.768	3863
3	91 : 9 (pH= 7,6)	1	1.8	2.5	0.8	0.389	5.5	0.8	2.056	3.5	0.7	0.944	2.18	2.667	400
4	95 : 5 (pH= 7,6)	1	1.8	3.2	1.1	0.778	6.8	1.0	2.778	4.1	0.8	1.278	2.17	3.000	420
5	98 : 2 (pH= 7,6)	1	1.8	6.4	2.3	2.556	9.2	1.8	4.111	5.2	0.8	1.889	2.18	3.077	676
6	93 : 7 (pH= 7,6)	1	1.8	2.6	0.7	0.444	6	0.7	2.333	3.7	0.7	1.056	2.21	3.286	447



Obrázek 17 Chromatogram vybraných iontů 1- katechol (m/z 109); 2 – komplex $[Re(O)_2(cat)_2]^-$ (m/z 435); 3 - rhenistan (m/z 251).

4.2.2. Reprosil NH_2 150 x 3 mm (3 μm)

Chromatografická HPLC kolona má vázanou aminopropylovou fázi. Kolona může být použita ve třech různých režimech. V režimu NP (normální fáze) může být alternativou k silikagelovým kolonám. V režimu RP (obrácené fáze) je použitelná hlavně pro analýzu sacharidů a v režimu IC (iontoměničová fáze) se kolona chová jako slabý anex. Kolona pracuje s běžnými organickými rozpouštědly a vodnými roztoky pufrů. Práce při tlaku překračujícím 400 bar a teplotě vyšší než 40°C snižuje životnost kolony.

- Separace reakční směsi s pyrogallolem

Bylo zjištěno, že pyrogallol tvoří při vyšších hodnotách pH s acetonitrilem aniont m/z 259, který se eluoval až jako třetí v pořadí. Toto chování je velmi výhodné s ohledem na uvažovanou

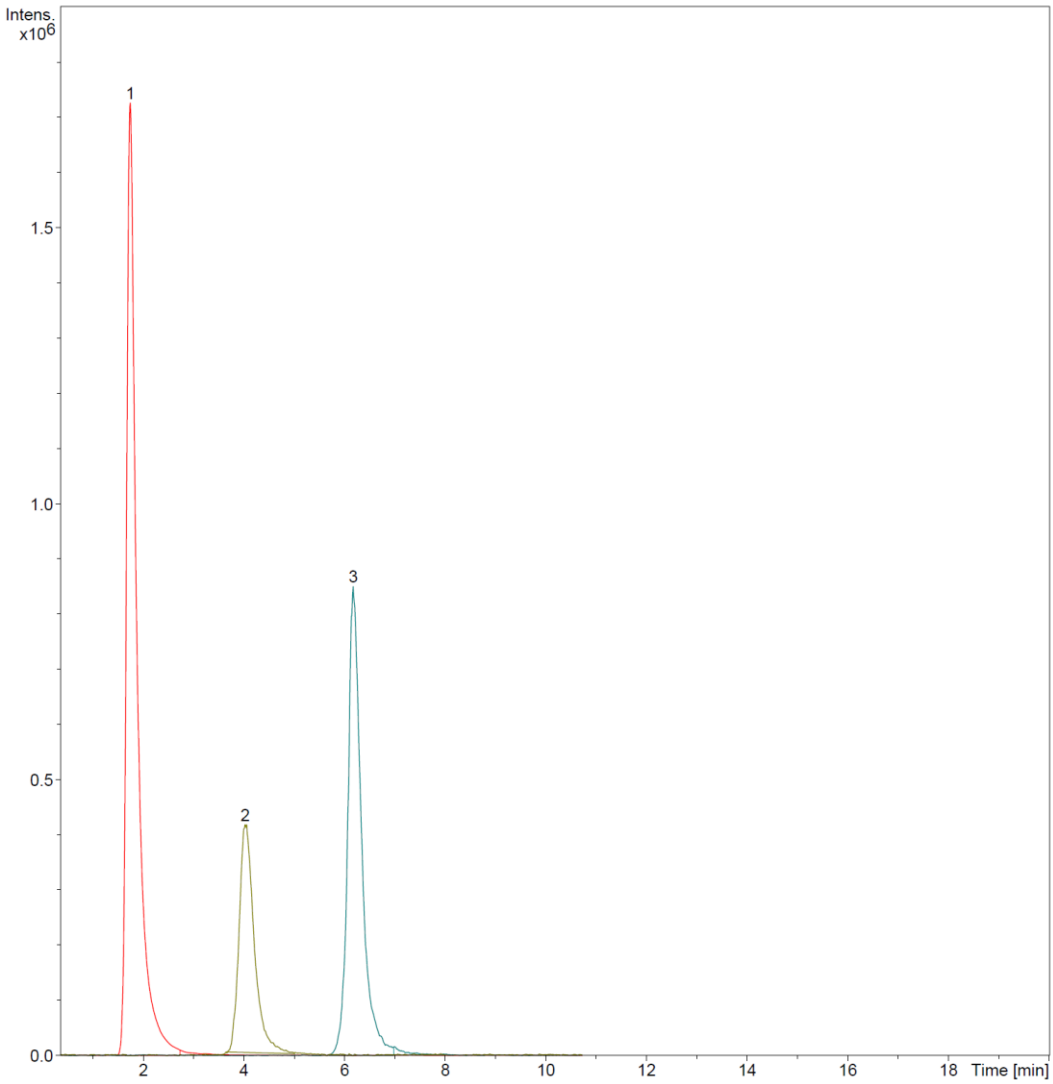
preparativní chromatografii, neboť případné rozmývání zóny pyrogallolu neovlivní čistotu preparovaného komplexu.

Jako první byl testován vliv složení mobilní fáze tvořené acetonitrilem a vodným 10 mM roztokem mravenčanu amonného s hodnotou pH = 10. Postupným snižováním procentuálního zastoupení vodné fáze (AF pufru), docházelo ke snižování eluční síly mobilní fáze a retenční časy pro pyrogallolový komplex přesáhly 10 minut. Jako optimální se po zhodnocení chromatografických parametrů s ohledem na předem stanovená kritéria jevil poměr 95 % : 5 % (ACN : AF o pH = 10).

Snaha částečně substituovat mravenčanový pufr tetrabutylammonium hydroxidem vedla pouze k prodlužování retenčních časů a rozšiřování chromatografických píků. Naopak zvyšování průtokové rychlosti mobilní fáze mělo za následek zaostření píků a snížení retenčních časů. Jako optimální byly vyhodnoceny tyto podmínky: složení mobilní fáze ACN : AF v poměru 95 % : 5 % pufru pH = 10 a rychlost průtoku mobilní fáze 0,8 ml·min^{-1}. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v **tabulce 7.** Chromatogram získaný za optimálních podmínek je na **obrázku 18.** Izokratickou elucí za použití uvedených podmínek byly pro separaci pyrogalolového komplexu vyhodnoceny chromatografické parametry. Separační faktor α činil 1,48; rozlišení R_s bylo 2,0 a počet teoretických pater n se rovnal 400. Tyto hodnoty byly v souladu s kritérii stanovenými před zahájením procesu optimalizace.

Tabulka 7 Optimalizace separace na koloně Reprosil NH_2 150 x 3 mm 3 µm (pyrogallol)

				m/z 259			m/z 251			m/z 467					
č.	ACN : AF (pH= 10)	u	t_0	t_R	w	k= $t`_R/t_0$	t_R	w	k= $t`_R/t_0$	t_R	w	k= $t`_R/t_0$	$\alpha=k_2/k_1$	R_s	n
1	90 : 10	0.6	1.3	4.5	0.9	2.506	2.7	0.7	1.104	3.1	0.8	1.416	1.77	1.867	240
2	95 : 5	0.8	1.0	6.2	0.8	5.442	1.7	0.8	0.766	4.5	0.9	3.675	1.48	2.000	400
3	97 : 3	0.6	1.3	23.4	3	17.234	2	0.7	0.558	18.1	3.9	13.104	1.32	2.304	345
4	95 : 5 (40°C)	0.8	1.0	5.7	0.8	4.922	1.6	0.8	0.662	3.7	0.8	2.844	1.73	2.500	342
5	92 : 8	0.6	1.3	6.2	1.1	3.831	2.6	0.6	1.026	4.1	0.8	2.195	1.75	3.000	420
6	95 : 5	0.7	1.1	9.9	1.2	8.000	2.4	0.8	1.182	6.2	1.6	4.636	1.73	3.083	240
7	95 : 5	0.6	1.3	12.8	1.5	8.974	2.4	0.7	0.870	8.5	1.4	5.623	1.60	4.095	590



Obrázek 18 Chromatogram vybraných iontů 1- rhenistan (m/z 251); 2 – komplex $[Re(O)_2(PG)_2]^-$ (m/z 467); 3 – komplex acetonitrilu s PG.

- Separace reakční směsi s katecholem

Optimalizace podmínek pro separaci reakční směsi s katecholem vycházela z nalezených optimálních podmínek pro pyrogallol. Bohužel se ukázalo, že chování solutů je v tomto případě značně odlišné, a proto bylo nutné podmínky eluce značně modifikovat. Retenční faktor *k* vykazoval jak pro katechol, tak pro katecholový komplex velmi nízké hodnoty a ani snižování poměru pufru nevedlo k výraznějšímu zlepšení. Navíc se ukázalo, že při snížení množství AF (pH = 10) pod 2% se přestává tvořit komplex katecholu s acetonitrilem.

Dále byl studován vliv snížení hodnoty pH na separační proces. Ukázalo se, že se snižováním pH dochází ke zvýšení hodnoty *k* a také k nárůstu rozlišení R_s. Pík katecholu se ale za těchto podmínek eluuje jako první a tvoří poměrně širokou chromatografickou zónu, která se zaostřuje

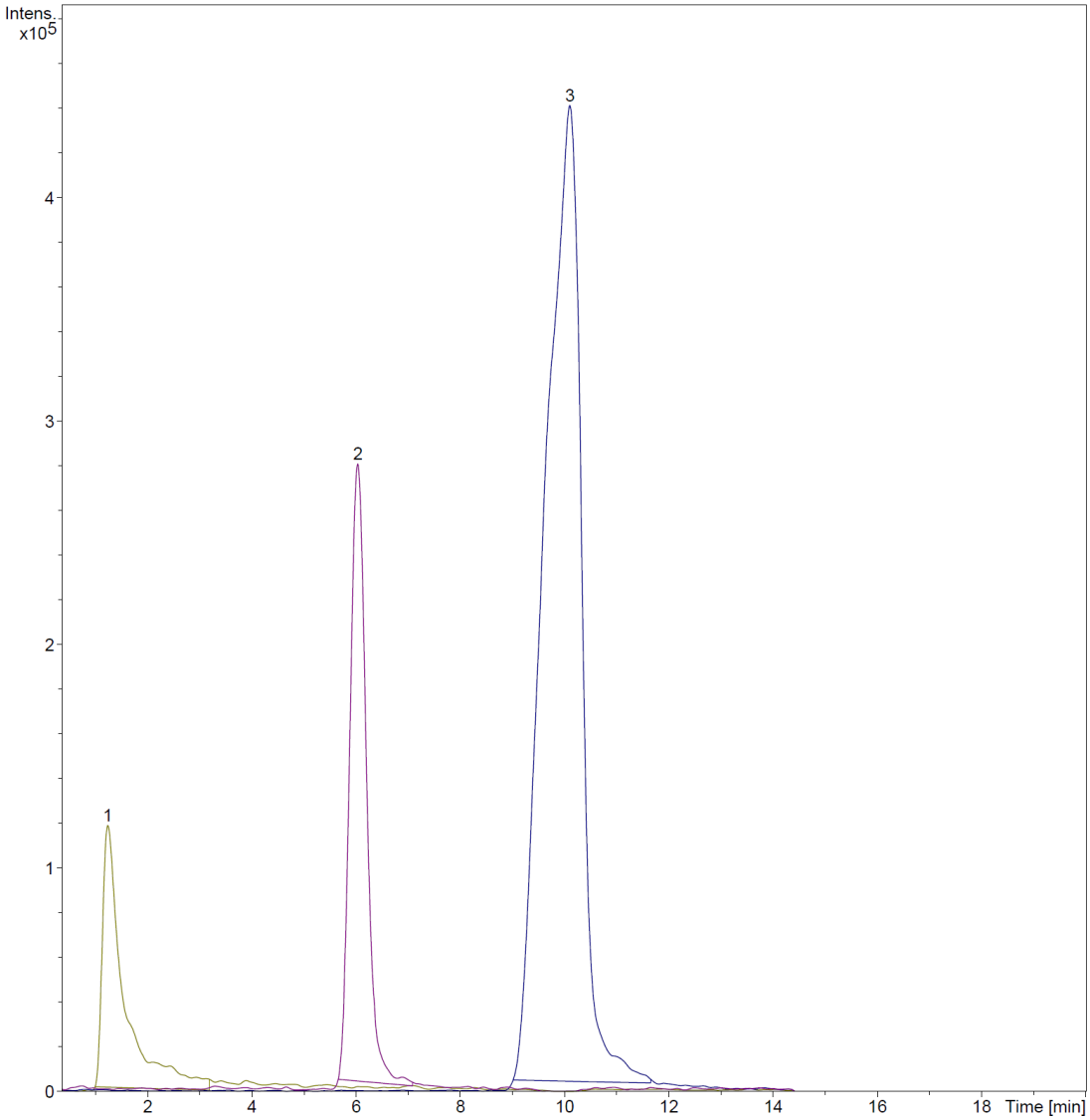
s klesajícím pH a vzrůstajícím poměrem vodné fáze. Nakonec byly jako optimální vyhodnoceny tyto podmínky: složení mobilní fáze ACN : AF (pH = 3,5) : AF (pH = 2,5) v poměru 94 % : 2 % : 4 % a rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml·min^{-1}. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v **tabulce 8.** Chromatogram získaný za optimálních podmínek je na **obrázku 19**. Izokratickou elucí za použití uvedených podmínek byly pro separaci katecholového komplexu vyhodnoceny následující chromatografické parametry. Separační faktor α činil 1,78 ; rozlišení R_s bylo 3,417 a počet teoretických pater n se rovnal 900. Tyto hodnoty byly v souladu s kritérii stanovenými před zahájením procesu optimalizace.

Tabulka 8 Optimalizace separace na koloně Reprosil NH_2 150 x 3 mm 3 µm (katechol)

				m/z 109 (227) **			m/z 251			m/z 435					
č.	ACN : AF (pH)*	u	t_0	t_R	w	k= $t`_R/t_0$	t_R	w	k= $t`_R/t_0$	t_R	w	k= $t`_R/t_0$	$\alpha=k_2/k_1$	R_s	n
1	92 : 8 (pH= 10)	0.8	1.0	1.7	0.5	0.766	2	0.7	1.078	1.5	0.6	0.558	1.37	0.308	100
2	90 : 10 (pH= 10)	0.8	1.0	1.7	0.5	0.766	1.9	0.6	0.974	1.5	0.6	0.558	1.37	0.333	100
3	95 : 5 (pH= 10)	0.8	1.0	1.7	0.4	0.766	2.1	1.1	1.182	1.4	0.5	0.455	1.69	0.375	125
4	93 : 7 (pH= 10)	0.8	1.0	1.8	0.5	0.870	2.1	0.7	1.182	1.5	0.6	0.558	1.56	0.462	100
5	98 : 2 (pH= 10)	0.8	1.0	x	x	x	2.3	2	1.390	1.2	0.8	0.247	5.63	0.786	36
6	95 : 5 (pH= 3.5)	1	0.8	1.6	1	1.078	2.5	1.1	2.247	1.7	1.1	1.208	1.86	0.727	38
7	94 : 5 : 1	1	0.8	1.5	7.8	0.948	11.5	2.6	13.935	9.3	1.7	11.078	1.26	1.023	479
8	95 : 5 (pH= 2.5)	0.8	1.0	1.8	1.3	0.870	2.8	0.9	1.909	1.9	0.6	0.974	1.96	1.200	160
9	94 : 1 : 5	1	0.8	2	11	1.597	2.3	0.4	1.987	1.5	0.8	0.948	2.10	1.333	56
10	93 : 5 : 2	1	0.8	1.4	1.3	0.818	2.5	0.6	2.247	1.7	0.6	1.208	1.86	1.333	128
11	90 : 10 (pH= 5)	0.8	1.0	1.6	1.6	0.662	5	1.8	4.195	2.9	1.2	2.013	2.08	1.400	93
12	93 : 4 : 3	1	0.8	1.2	1.9	0.558	6.3	2	7.182	3.5	1.3	3.545	2.03	1.697	116
13	90 : 10 (pH= 4)	0.8	1.0	1.6	1.5	0.662	6.4	1.8	5.649	3.9	0.8	3.052	1.85	1.923	380
14	94 : 1 : 5	1	0.8	1.2	1.1	0.558	33.1	2.5	41.987	25.9	3.7	32.636	1.29	2.323	784
15	90 : 10 (pH= 3)	0.8	1.0	1.5	1.1	0.558	7.5	1.3	6.792	4.7	0.9	3.883	1.75	2.545	436
16	94 : 2 : 4	1	0.8	1.2	0.9	0.558	10.1	1.6	12.117	6	0.8	6.792	1.78	3.417	900
17	93 : 3 : 4	1	0.8	1.2	1.4	0.558	9	1.4	10.688	5	0.9	5.494	1.95	3.478	494
18	90 : 10 (pH= 2.5)	0.8	1.0	1.5	0.8	0.558	25	2.9	24.974	18	1.1	17.701	1.41	3.500	4284
19	93 : 2 : 5	1	0.8	1.2	1	0.558	14.7	2	18.091	7.8	0.9	9.130	1.98	4.759	1202

*… Pokud byla mobilní fáze složena ze tří komponent, potom je složení ACN : AF (pH = 3,5) : AF (pH = 2,5)

**…platí pro horní část tabulky



Obrázek 19 Chromatogram vybraných iontů 1- katechol (m/z 109); 2 – komplex $[Re(O)_2(cat)_2]^-$ (m/z 435); 3 - rhenistan (m/z 251).

4.3. Analýza rhenium(VII)-katecholového komplexu kapilární zónovou elektroforézou

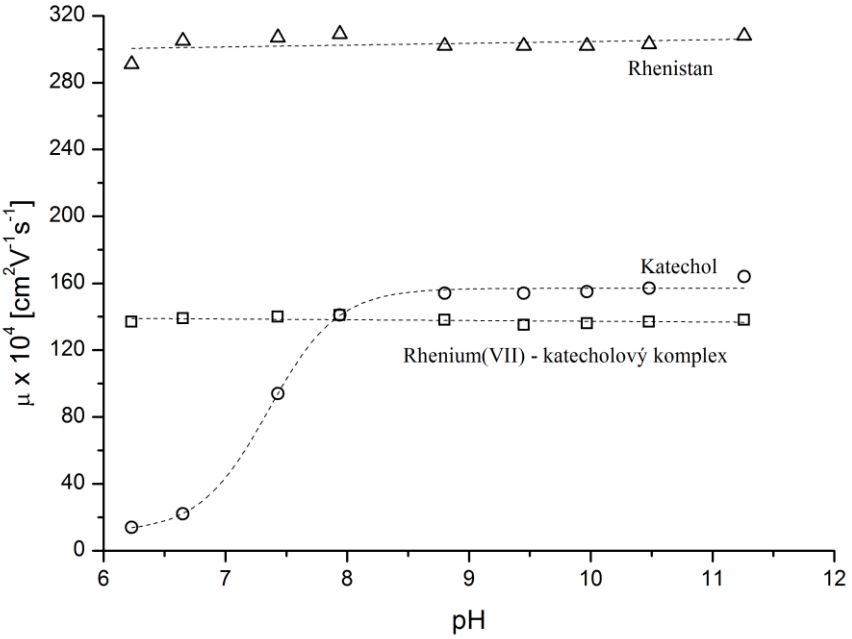
Pro účely hodnocení čistoty a určení dalších fyzikálně chemických charakteristik byla vypracována metodika stanovení kapilární zónovou elektroforézou v borátových nosných elektrolytových systémech v rozmezí pH = 6,23 až 11,26 viz **tabulka 2**.

Byla systematicky prostudována závislost efektivních elektroforetických pohyblivostí rhenium(VII)-katecholového komplexu, katecholu a rhenistanu v nosných elektrolytech NE1 – NE9. Z elektroforegramů odečtené hodnoty migračních časů a vypočtené hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí jsou uvedeny v **tabulce 9**. Grafické znázornění závislostí efektivních elektroforetických pohyblivostí sledovaných látek na pH v intervalu 6,23 – 11,26 je

pak uvedeno na **obrázku 20**. Parametry proložení experimentálních bodů jsou samostatně uvedeny v **tabulce 10**.

Tabulka 9 Hodnoty migračních časů a vypočtené hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí katecholu, rhenium(VII)-katecholového komplexu a rhenistanu v nosných elektrolytech NE1 – NE9.

pH	Soubor	t_{EOF} [min]	$t_{Kompl.}$ [min]	t_{Kat} [min]	t_{ReO4-} [min]	$\mu_{Kompl.}$ [$cm^2V^{-1}s^{-1}$]	μ_{Kat} [$cm^2V^{-1}s^{-1}$]	μ_{ReO4-} [$cm^2V^{-1}s^{-1}$]
6,23	B01	1,943	2,961	3,146	7,342	-0,0136	-0,0015	-0,0291
	B02	1,94	2,976	3,141	7,412	-0,0138	-0,0014	-0,0292
	B03	1,947	2,991	3,136	7,387	-0,0138	-0,0012	-0,0290
	A. průměr	1,943	2,976	3,141	7,380	-0,0137	-0,0014	-0,0291
	SD	0,004	0,015	0,005	0,035	0,00011	0,00017	0,00010
6,65	B31	1,781	2,624	1,877	6,014	-0,0139	-0,0022	-0,0304
	B32	1,78	2,62	1,873	6,032	-0,0138	-0,0021	-0,0304
	B34	1,78	2,624	1,873	6,146	-0,0139	-0,0021	-0,0307
	A. průměr	1,780	2,623	1,874	6,064	-0,0139	-0,0022	-0,0305
	SD	0,001	0,002	0,002	0,072	0,00002	0,00004	0,00016
7,43	B26	1,739	2,548	2,211	5,685	-0,0140	-0,0094	-0,0307
	B27	1,737	2,543	2,206	5,683	-0,0140	-0,0094	-0,0307
	B28	1,74	2,547	2,202	5,737	-0,0140	-0,0093	-0,0308
	B29	1,735	2,54	2,201	5,633	-0,0140	-0,0094	-0,0306
	B30	1,73	2,533	2,195	5,628	-0,0141	-0,0094	-0,0307
	A. průměr	1,736	2,542	2,203	5,673	-0,0140	-0,0094	-0,0307
	SD	0,004	0,006	0,006	0,045	0,00003	0,00007	0,00005
7,94	B17	1,88	2,864	2,864	7,62	-0,0140	-0,0140	-0,0308
	B18	1,893	2,914	2,914	8,085	-0,0142	-0,0142	-0,0311
	B19	1,882	2,877	2,877	7,735	-0,0141	-0,0141	-0,0309
	B20	1,882	2,865	2,865	7,746	-0,0140	-0,0140	-0,0309
	A. průměr	1,884	2,880	2,880	7,797	-0,0141	-0,0141	-0,0309
	SD	0,006	0,023	0,023	0,201	0,00009	0,00009	0,00012
8,8	B23	1,831	2,703	2,864	6,349	-0,0135	-0,0151	-0,0298
	B24	1,803	2,666	2,824	6,234	-0,0138	-0,0154	-0,0303
	B25	1,789	2,649	2,804	6,163	-0,0139	-0,0155	-0,0305
	A. průměr	1,808	2,673	2,831	6,249	-0,0138	-0,0154	-0,0302
	SD	0,021	0,028	0,031	0,094	0,00021	0,00021	0,00032
9,45	B13	1,882	2,809	3,018	6,611	-0,0135	-0,0154	-0,0292
	B14	1,871	2,778	2,983	6,478	-0,0134	-0,0153	-0,0292
	B15	1,857	2,761	2,965	6,453	-0,0135	-0,0155	-0,0295
	B16	1,846	2,75	2,952	6,423	-0,0137	-0,0156	-0,0296
	A. průměr	1,864	2,775	2,980	6,491	-0,0135	-0,0154	-0,0294
	SD	0,016	0,026	0,029	0,083	0,00012	0,00012	0,00022
9,97	B09	1,939	2,945	3,182	8,108	-0,0135	-0,0155	-0,0301
	B10	1,946	2,967	3,208	8,277	-0,0136	-0,0155	-0,0302
	B11	1,955	2,991	3,237	8,426	-0,0136	-0,0156	-0,0302
	B12	1,961	3,011	3,257	8,516	-0,0137	-0,0156	-0,0301
	A. průměr	1,950	2,979	3,221	8,332	-0,0136	-0,0155	-0,0302
	SD	0,010	0,029	0,033	0,179	0,00005	0,00005	0,00002
10,48	B04	1,978	3,06	3,332	9,011	-0,0137	-0,0158	-0,0303
	B05	1,981	3,068	3,327	9,1	-0,0137	-0,0157	-0,0303
	A. průměr	1,980	3,064	3,330	9,056	-0,0137	-0,0157	-0,0303
	SD	0,002	0,006	0,004	0,063	0,00000	0,00007	0,00002
11,26	B06	1,99	3,085	3,435	9,459	-0,0137	-0,0162	-0,0305
	B07	1,98	3,08	3,443	9,71	-0,0139	-0,0165	-0,0309
	B08	1,991	3,109	3,487	10,07	-0,0139	-0,0165	-0,0309
	A. průměr	1,987	3,091	3,455	9,746	-0,0138	-0,0164	-0,0308
	SD	0,006	0,016	0,028	0,307	0,00009	0,00017	0,00026



Obrázek 20 Závislosti efektivních elektroforetických pohyblivosti katecholu, rhenium(VII)-katecholového komplexu a rhenistanu na pH nosného elektrolytu.

Tabulka 10 Parametry proložení závislostí efektivních elektroforetických pohyblivostí rhenistanu, rhenium(VII)-katecholového komplexu a katecholu na pH.

Rhenate linear fit: y=a+bx
Residual sum of squares: 198,56
Adj. R-Square: 0,997
Intercept a: 293,75 Standard Error: 9,54
Slope b: 0,09 Standard Error: 1,08

Complex linear fit: y=a+bx
Residual sum of squares: 23,95
Adj. R-Square: 0,947
Intercept a: 141,80 Standard Error: 3,31
Slope b: -0,05 Standard Error: 0,37

Catechol Boltzmann fit: y=A2+(A1-A2)/[1+exp(x-x0)/dx]
Reduced Chi-Sqr: 13,23
Adj. R-Square: 0,996
A1: 11,05 Standard Error: 4,38
A2: 157,04 Standard Error: 1,66
X0: 7,35 Standard Error: 0,04
dx: 0,28 Standard Error: 0,04

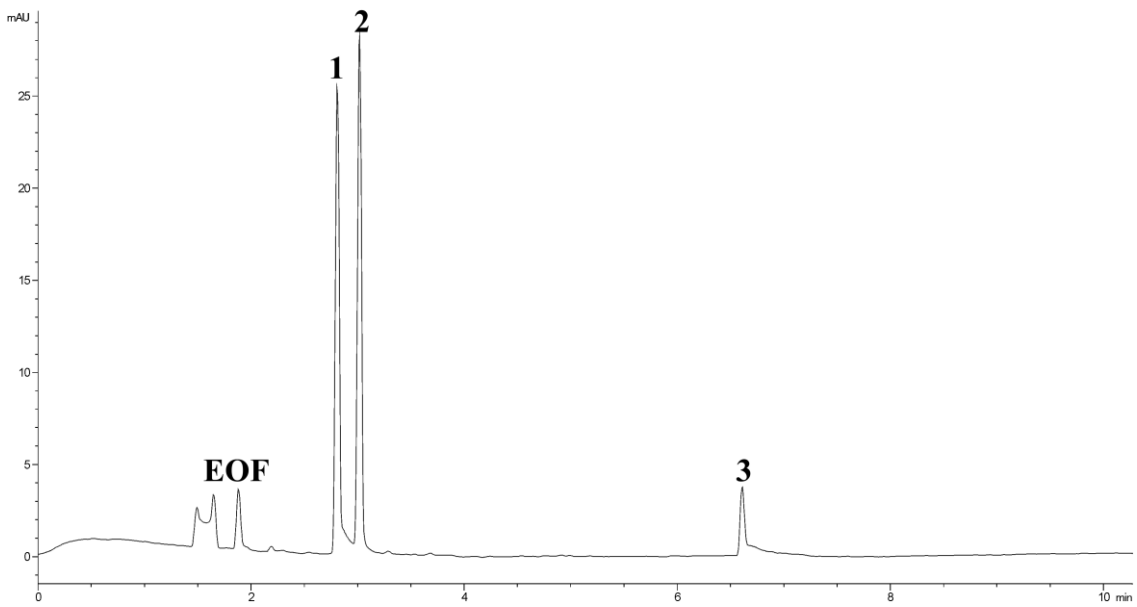
V případě rhenistanu a rhenium(VII)-katecholového komplexu se jedná o přímkové závislosti se směrnicí statisticky nevýznamně odlišnou od nuly, což potvrzuje charakter silného elektrolytu obou látek. Je zřejmé, že rheniový atom zůstává jediným nábojovým centrem i v komplexu, který si zachovává charakter plně disociovaného aniontu i v případě koordinace dvou aromatických ligandů. Všechny hydroxylové skupiny katecholových ligandů jsou vázány koordinačně kovalentními vazbami v rámci komplexu a k jeho celkovému náboji nepřispívají. Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti katecholu má charakteristický sigmoidální charakter odpovídající slabé kyselině. Určený inflexní bod při hodnotě 7,35, odpovídající zdánlivé disociační konstantě katecholu, je významně nižší než je tabelovaná hodnota pKa = 9, 85 (20°C) (Vohlídal et al. 1999). Domníváme se, že příčinou tohoto rozdílu je tvorba stabilního katechol-borátového komplexu, který vykazuje výrazně kyselejší charakter než samotný katechol. Experimentálně určené parametry kalibrace rhenistanu a katecholu v nosném elektrolytu NE6 jsou uvedeny v **tabulce 11.** Je zřejmé, že obě závislosti jsou lineární v rozmezí dvou koncentračních řádů a procházejí počátkem.

Tabulka 11 Parametry kalibračních závislostí katecholu a rhenistanu amonného v nosném elektrolytu NE6.

Rhenate linear fit: y=a+bx
Concentrations [mg/ml]: 0,001; 0,002; 0,005; 0,0062; 0,010
Residual sum of squares: 77,41
Adj. R-Square: 0,995
Intercept a: -2,588 Standard Error: 4,11
Slope b: 19743,2 Standard Error: 710,1

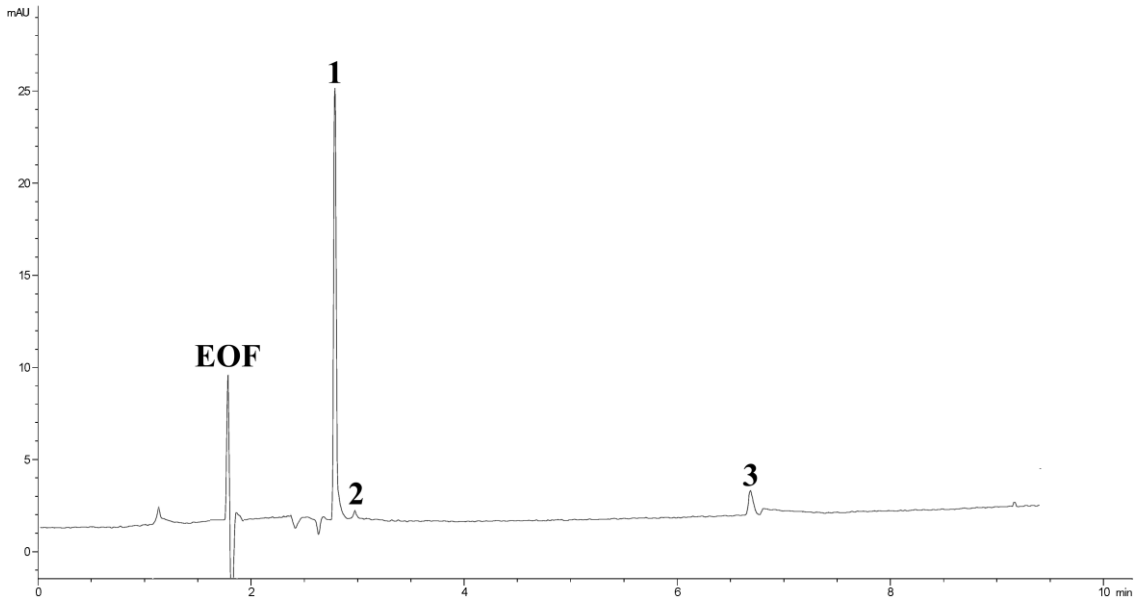
Catechol linear fit: y=a+bx
Concentrations [mg/ml]: 0,001; 0,002; 0,005; 0,0062; 0,010; 0,012
Residual sum of squares:16,15
Adj. R-Square: 0,974
Intercept a: 1,741 Standard Error: 2,31
Slope b: 14596,3 Standard Error:516,4

Kapilární zónová elektroforéza byla použita jako rychlá separační metoda pro monitorování průběhu tvorby rhenium(VII)-katecholového komplexu v reakční směsi a hodnocení obsahu produktu reakce po přečistění semipreparativní HPLC. Na elektroforegramu uvedeném na **obrázku 21** je kromě píku komplexu vidět i pík volného katecholu, přidávaného v nadbytku do reakční směsi, a pík rhenistanu, jako produktu pozvolného rozkladu vzniklého komplexu a zřejmě i produktu rozkladu výchozího tetrachlorooxorhenátu.



Obrázek 21 Záznam separace komponent reakční směsi při přípravě rhenium(VII)-katecholového komplexu v borátovém nosném elektrolytu NE6; 1-rhenium(VII)-katecholový komplex, 2-katechol, 3-rhenistan. Absorpční fotometrická detekce při λ = 200 nm, procházející proud byl 18 μA.

Na elektroforegramu uvedeném na **obrázku 22** je záznam analýzy rhenium(VII)-katecholového komplexu po HPLC přečistění. Je zřejmé, že tento krok umožnil významně snížit obsah zbytkového katecholu a rhenistanu v připravovaném produktu. Obsah komplexu určený metodou vnitřní normalizace se zvýšil z hodnoty 48 % (reakční směs před HPLC přečistěním) na hodnotu 93 %. Těmto hodnotám odpovídá i s pomocí kalibrace přímo zjištěný obsah zbytkového katecholu a rhenistanu, který po přepočtu na hmotnost získaného komplexu odpovídal hodnotám 1,3 % pro katechol, a 5,8 % pro rhenistan.

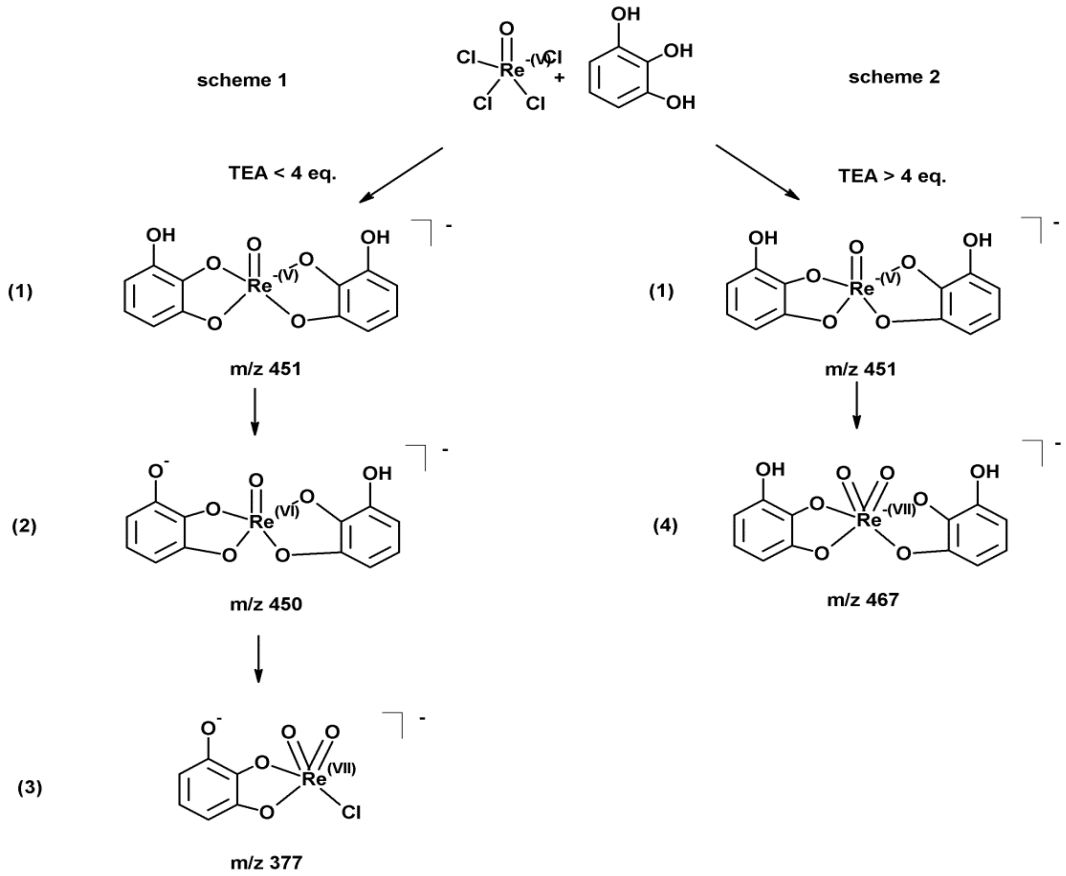


Obrázek 22 Záznam separace vzorku rhenium(VII) katecholového komplexu po přečistění semipreparativní HPLC v borátovém nosném elektrolytu NE6; 1-rhenium(VII)-katecholový komplex, 2-katechol, 3-rhenistan. Absorpční fotometrická detekce při λ = 200 nm, procházející proud byl 18 μA.

4.4. ESI-MS charakterizace a UV-VIS stabilitní studie připravených rheniových(VII) komplexů s pyrogallolem a katcholem

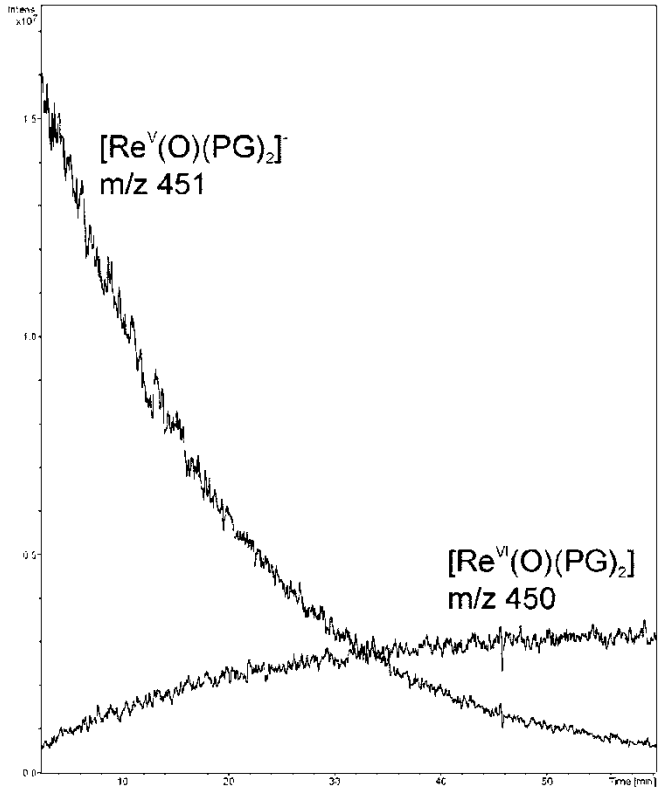
- Komplexy rhenia s pyrogalolem

Na **obrázku 23** je znázorněno reakční schéma tetrachlorooxorhenátu s ligandem PG. Jak je z obrázku patrné, skutečný molární poměr triethylaminu (TEA) vzhledem k [(*n*-Bu_4N)($ReOCl_4$)] ovlivňuje rychlost a průběh uvedených reakcí. Při laboratorní teplotě tak lze získat odlišné komplexy. Na základě množství provedených měření, je možné konstatovat, že dominantním konečným produktem v přítomnosti čtyřikrát vyššího molárního poměru TEA je $[Re^{VII}(O)_2(PG)_2]$. Zatímco nižší koncentrace přídavku TEA vede k tvorbě komplexu $[Re^{VII}Cl(PG)_2]$. Z naměřených výsledků je zjevná souvislost mezi stechiometrií vznikajícího komplexu a nezbytným množstvím přídavku TEA, pro kompletní neutralizaci chlorovodíku jako vedlejšího produktu reakce.



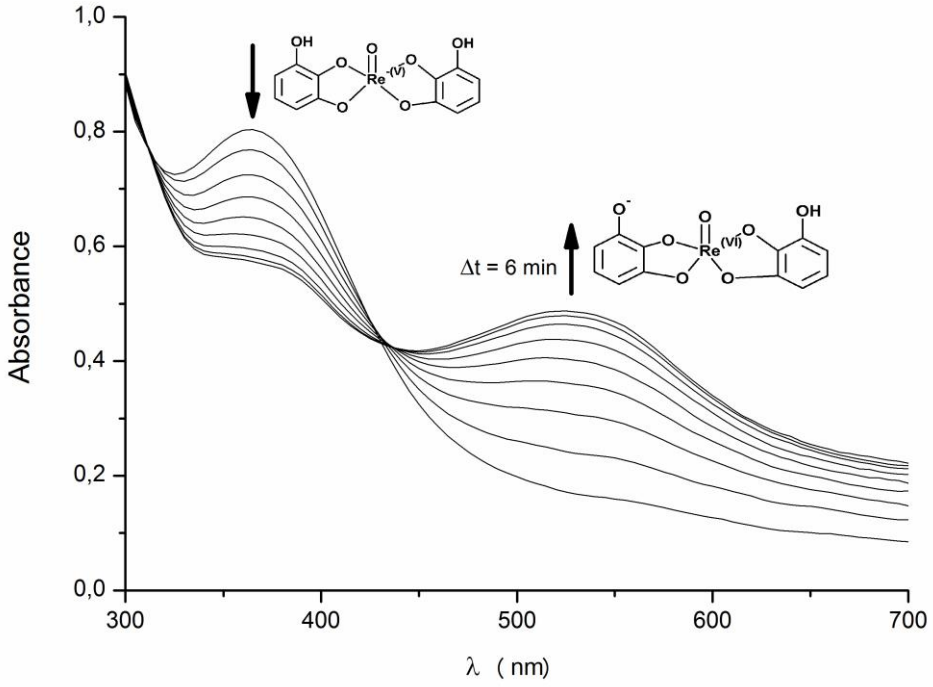
Obrázek 23 Schéma možných reakcí mezi [(*n*-Bu_4N)($ReOCl_4$)] a PG v přítomnosti různých množství TEA.

Výsledky ESI-MS měření reakcí [(*n*-Bu_4N)($ReOCl_4$)] s dvojnásobným přebytkem PG v přítomnosti dvou ekvivalentů TEA je znázorněno na **obrázku 24**. Komplex $[Re^{V}(O)(PG)_2]^-$ vzniká téměř okamžitě. Během následujících 60 minut jeho množství v roztoku vzorku exponenciálně klesá ve prospěch komplexu $[Re^{VI}(O)(PG)_2]^-$.



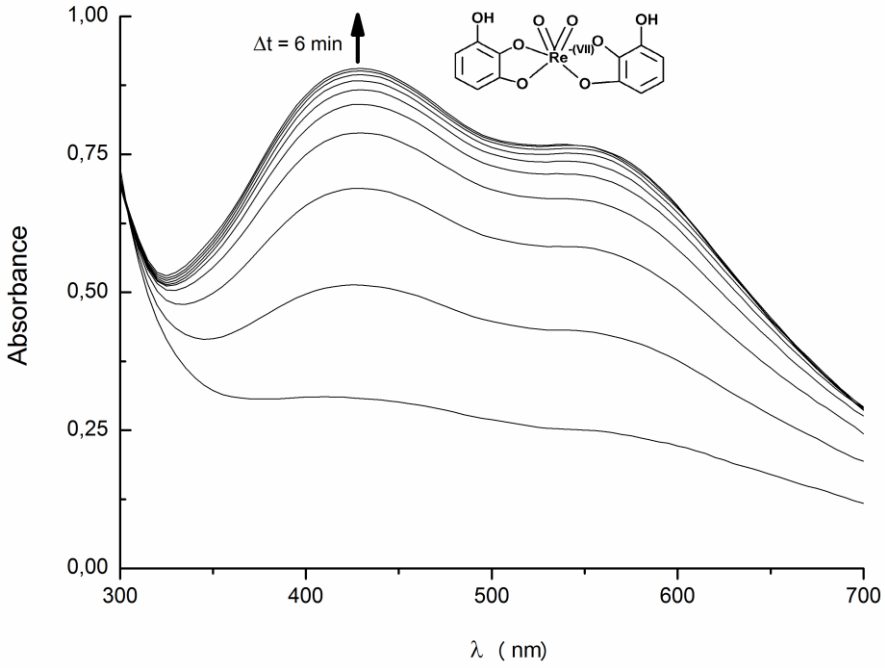
Obrázek 24 Časový vývoj signálů ESI-MS pro reakci [(*n*-Bu_4N)($ReOCl_4$)] a PG v acetonitrilu se 2 ekvivalenty TEA přidanými k reakční směsi. Získaný ion (EIC) při m/z 451 exponenciálně klesá ve prospěch EIC při m/z 450. Komplex 1 se převede na 2.

Stejný postup je dokumentován na UV-VIS absorpčním spektru znázorněném na **obrázku 25**. Počáteční světle žluté zbarvení reakční směsi dané převažujícím komplexem $[Re^{V}(O)(PG)_2]^-$ přechází na karmínově červenou s převažujícím komplexem $[Re^{VI}(O)(PG)_2]^-$, který je stabilním meziproduktem dané reakce. Během 60 minut absorpční maximum při λ = 370 nm téměř úplně zmizí ve prospěch vznikajícího maxima při λ = 530 nm. Na obrázku je dobře viditelný izosbestický bod při λ = 425 nm, odpovídající jednoduchému reakčnímu mechanismu transformace komplexu $[Re^{V}(O)(PG)_2]^-$ na komplex $[Re^{VI}(O)(PG)_2]^-$.



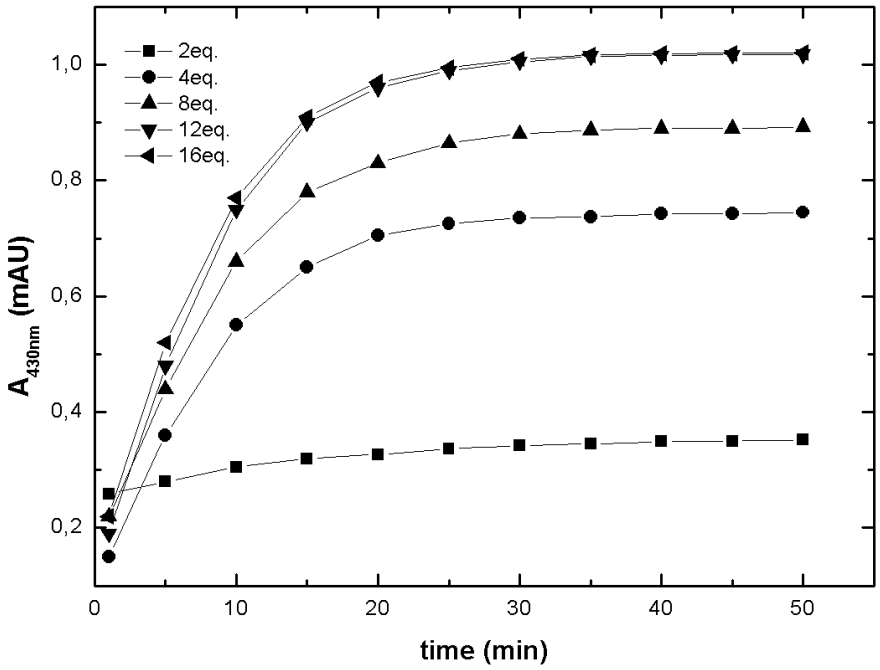
Obrázek 25 UV-VIS absorpční spektra zobrazující konverzi světle žlutého komplexu 1 na karmínově červený komplex 2 v přítomnosti 2 ekvivalentů TEA. Šipky ukazují nárůst a/nebo pokles absorpčních maxim obou komplexů. Spektra byla shromažďována po dobu 60 minut a zobrazována v časovém intervalu 6 minut.

Vyšší koncentrace TEA výrazně urychluje následnou oxidaci na $[Re^{VII}(O)_2(PG)_2]^-$. Bylo zjištěno, že pro koncentrace TEA vyšší než 4 ekvivalenty, je tento komplex dominujícím produktem v této reakční směsi. Monitorování reakcí pomocí UV-VIS dokumentuje tento postup v přítomnosti 8 ekvivalentů TEA, jak je zobrazeno na **obrázku 26.**



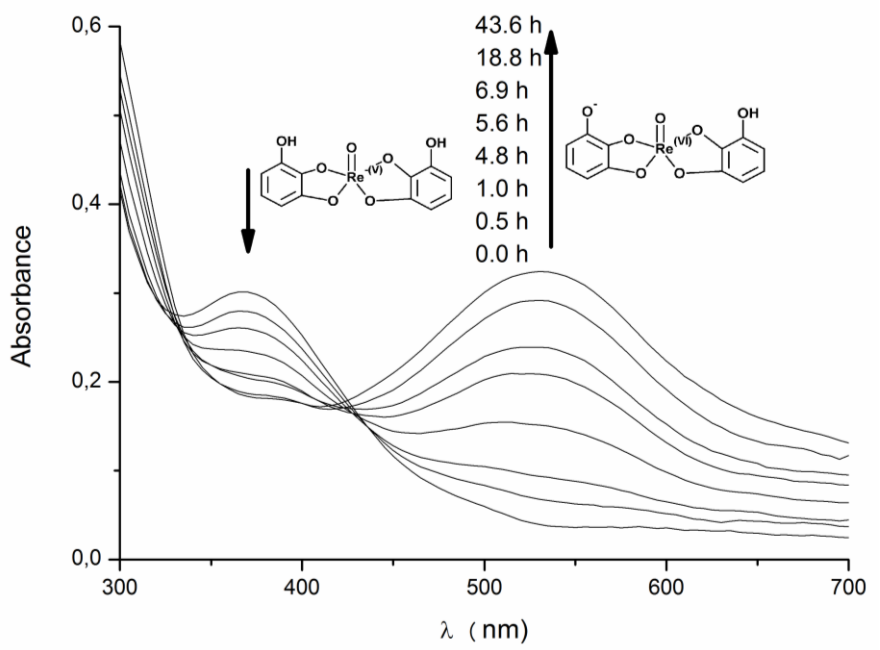
Obrázek 26 UV-VIS absorpční spektra zobrazující přeměnu karmínově zbarveného komplexu 2 na hnědě zbarvený komplex 4 v přítomnosti 8 ekvivalentů TEA. Šipky ukazují nárůst a / nebo pokles absorpčních maxim obou komplexů. Spektra byla shromažďována po dobu 60 minut a zobrazována v časovém intervalu 6 minut.

Z obrázku je vidět současný vznik dvou absorpčních maxim při λ = 430 nm a λ = 560 nm, naznačující tvorbu stabilního hnědého komplexu $[Re^{VII}(O)_2(PG)_2]^-$. Podrobnější závislost rychlosti reakce vzniku tohoto komplexu na molárním přebytku TEA je popsána na **obrázku 27.** Časová závislost výšky absorčpního maxima při λ = 430 nm potvrzuje významný vliv TEA až do molárního přebytku 12 ekvivalentů. Další zvyšování koncentrace TEA už nevede k výraznému urychlení reakce.

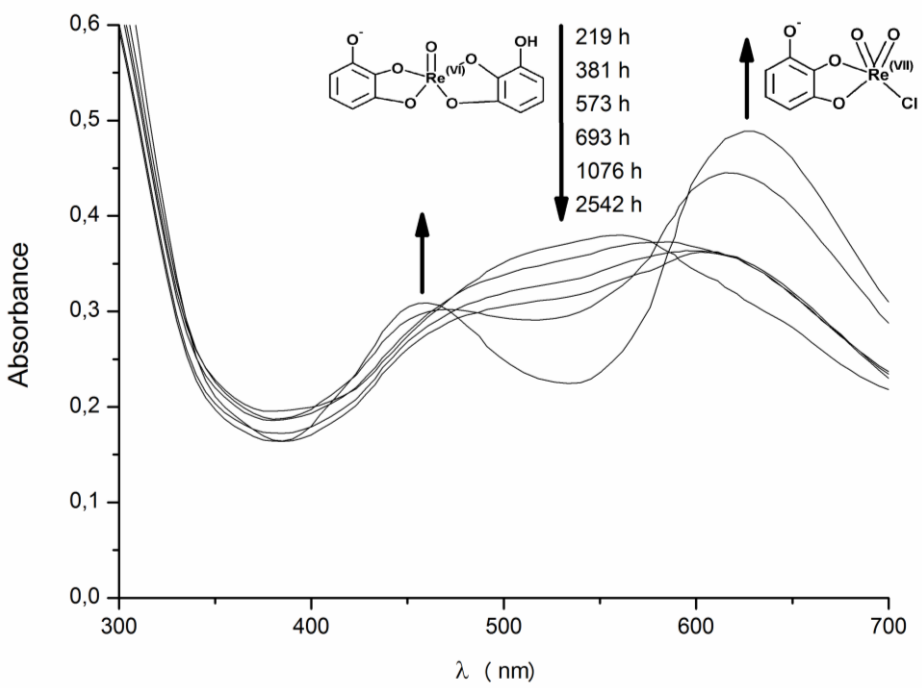


Obrázek 27 Časové závislosti výšky absorpčních maxim při λ = 430 nm (λ_{max} komplexu 4) v reakční směsi [(*n*-Bu_4N)($ReOCl_4$)] – PG se 2 až 16 ekvivalenty TEA do této směsi přidanými.

Během dlouhodobého sledování reakce v nepřítomnosti TEA byly pozorovány různé reakční cesty. Jak je vidět na **obrázku 28A**, tvorba komplexu $[Re^{VI}(O)(PG)_2]^-$ se významně prodlužuje. Maximální absorbance při λ = 530 nm je dosaženo během desítek hodin. Další dlouhodobá konverze $[Re^{VI}(O)(PG)_2]^-$ zahrnuje ligandovou výměnou reakci s Cl^- ionty, které vznikají jako vedlejší produkt reakce mezi [(*n*-Bu_4N)($ReOCl_4$)] a PG. Oxidace Re iontu je doprovázena štěpením jednoho ligandu, čímž vzniká konečný modrozelený produkt reakce - komplex $[Re^{VII}(O)_2Cl(PG)]^-$. Vznik tohoto komplexu je patrný na **obrázku 28B**, kde absorpční maximum při λ = 530 nm klesá ve prospěch současně vznikajících maxim při λ = 460 nm a λ = 630 nm.

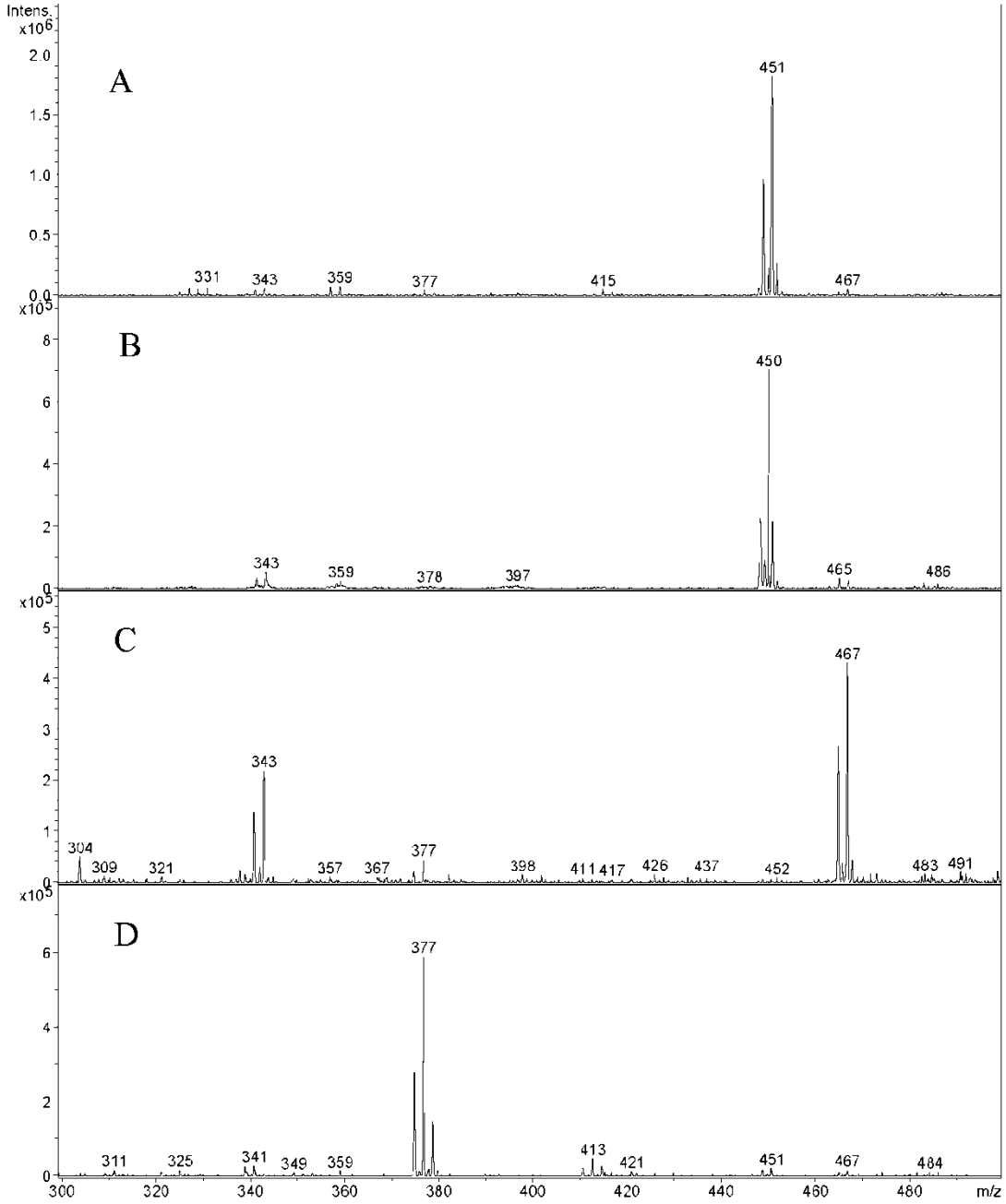


Obrázek 28A UV-VIS absorpční spektra zobrazující reakci [(*n*-Bu_4N)($ReOCl_4$)] s PG v nepřítomnosti TEA. Okamžitě vzniklý žlutý komplex 1 (λ_{max} = 370 nm) se přejde na azurově zbarvený komplex 2 (λ_{max} = 530 mn). Šipky ukazují nárůst a / nebo pokles absorpčních maxim obou komplexů. Spektra jsou uvedena v časovém intervalu 0,0 až 43,6 hod.



Obrázek 28B UV-VIS absorpční spektra znázorňující dlouhodobou transformaci azurově barevného komplexu 2 (λ_{max} = 530 nm) na modro-zelený komplex 3 (λ_{max} = 460 a 630 nm). Šipky ukazují nárůst a / nebo pokles absorpčních maxim obou komplexů. Spektra jsou uvedena v časovém intervalu 219 – 2542 hod.

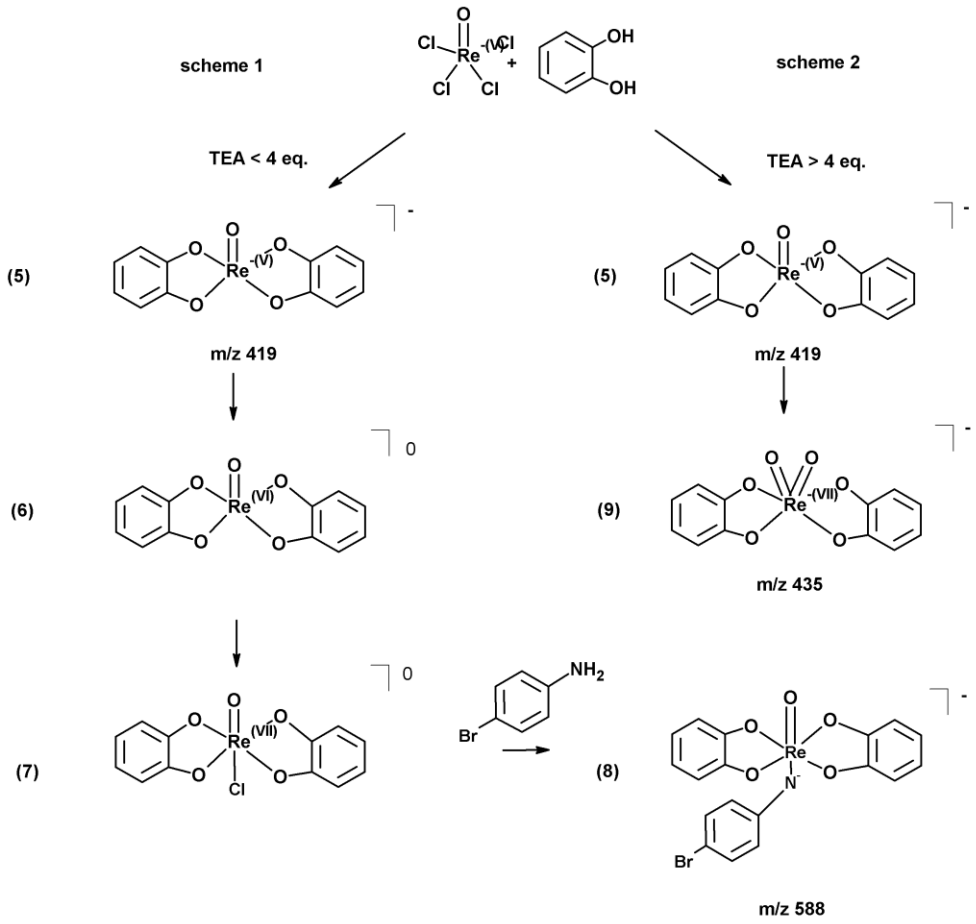
Struktury komplexů vzniklých v reakční směsi [(*n*-Bu_4N)($ReOCl_4$)] s PG byly potvrzeny pomocí ESI-MS spekter viz **obrázek 29**. Spektrum A odpovídá složení reakční směsi se dvěma ekvivalenty TEA ihned po zahájení reakce. Za těchto podmínek byl pozorován dominantní molekulární iontový shluk $[Re^{V}(O)(PG)_2]^-$ při m/z 451. Spektrum B odpovídá složení stejné reakční směsi avšak po 60 minut. Dominantní pík m/z 450 odpovídá převažující deprotonaci komplexu $[Re^{VI}(O)(PG)_2]^-$. Menší pík viditelný v obou spektrech A i B při m/z 467 odpovídá přítomnosti stop komplexu $[Re^{VII}(O)_2(PG)_2]^-$ v rané fázi jeho vzniku. Ve spektru C pík m/z 467 potvrzuje přítomnost dioxo komplexu, který je hlavní složkou v reakční směsi s 8 ekvivalenty TEA po 60 minutách od zahájení reakce. Menší pík při m/z 377 dokumentuje přítomnost deprotonovaného komplexu $[Re^{VII}(O)_2Cl(PG)]^-$, jako konečného a dalšího stabilního reakčního produktu. Elementární složení všech Re komplexů s pyrogallolem byla ověřena srovnáním teoretických a experimentálně získaných iontově izotopových profilů, které jsou velmi podobné.



Obrázek 29 ESI-MS spektra v módu negativních iontů po přímém nástřiku, odráží složení vzorku odebraného z reakční směsi [(*n*-Bu_4N)($ReOCl_4$)] – PG a analyzovaného ve fázi s (A) převládající komplex 1; (B) převažující komplex 2; (C) převažující komplex 4 a (D) převažující komplex 3. Podrobnosti jsou uvedeny v textu.

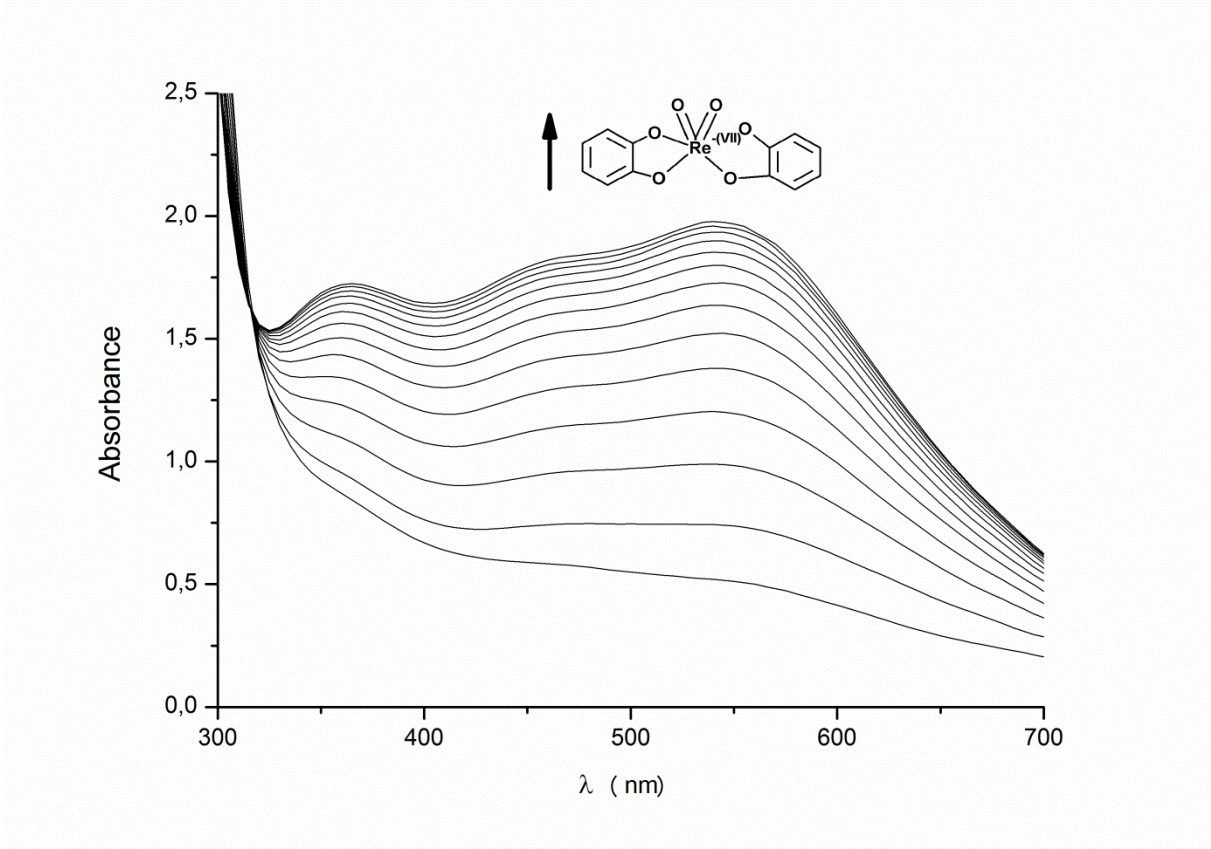
- Komplexy rhenia s katecholem

Byla provedena srovnávací kinetická měření sledování vzniku a následné chemické transformace komplexů vzniklých v reakční směsi katecholu s [(*n*-Bu_4N)($ReOCl_4$)]. Stejně jako v předchozích pokusech byla potvrzena významná role TEA při vzniku jednotlivých komplexů a jejich transformací. Navrhované reakční schéma založené na UV-VIS a ESI-MS měřeních, popsané níže, je znázorněno na **obrázku 30**.



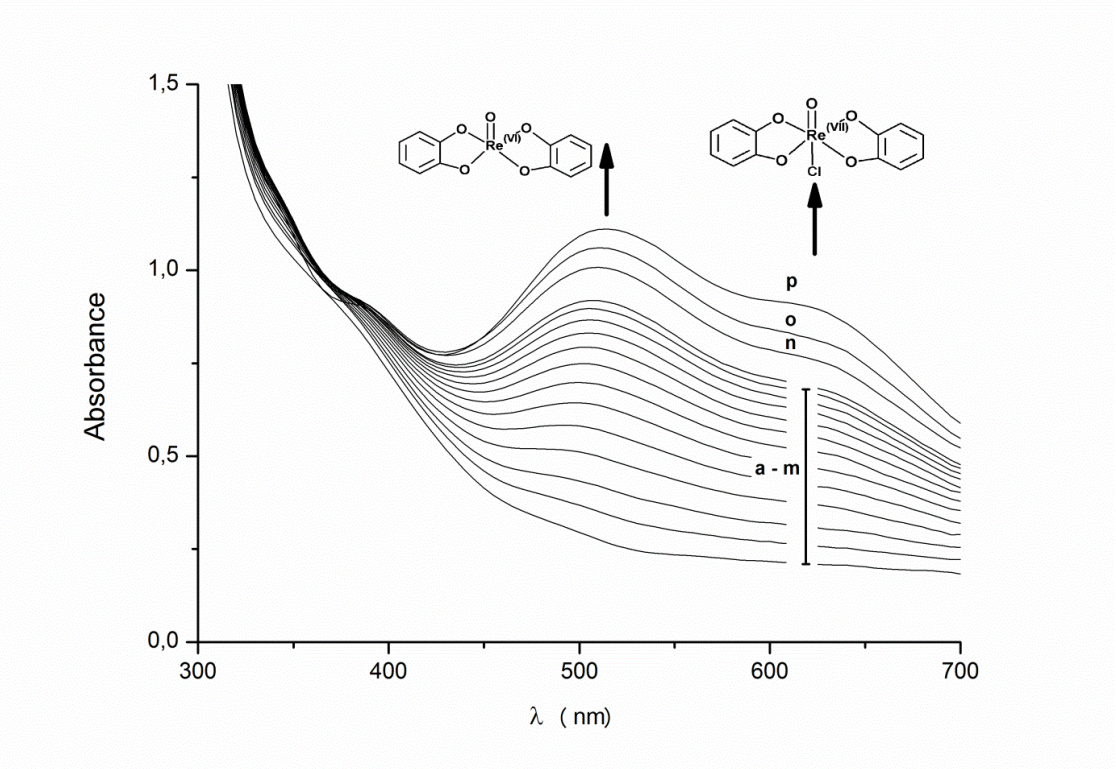
Obrázek 30 Schéma možných reakcí mezi [(*n*-Bu_4N)($ReOCl_4$)] a katecholem v přítomnosti různých množství TEA.

Na obrázku je vidět, že při molárním poměru TEA vzhledem k [(*n*-Bu_4N)($ReOCl_4$)] vyšším než 4 ekvivalenty, vzniká ihned $[Re^{V}(O)(CAT)_2]^-$, který je následně přeměněn na stabilní $[Re^{VII}(O)_2(CAT)_2]^-$, jako konečný oxidační produkt. Odpovídající reakční rychlosti jsou srovnatelné s těmi pozorovanými s ligandem PG. Absorpční spektrum na **obrázku 31** demonstruje poměr Re(V) a Re(VII) při oxidaci komplexu v přítomnosti 8 ekvivalentů TEA. Přeměny na $[Re^{VII}(O)_2(CAT)_2]^-$ je dosaženo během 60 minut. Počáteční světle žluté zbarvení reakční směsi přechází během 60 minut v tmavě fialové, tak jak koncentrace oxidačního produktu s absorpčními maximy λ = 365 nm, λ = 460 nm a λ = 540 nm vzrůstá.



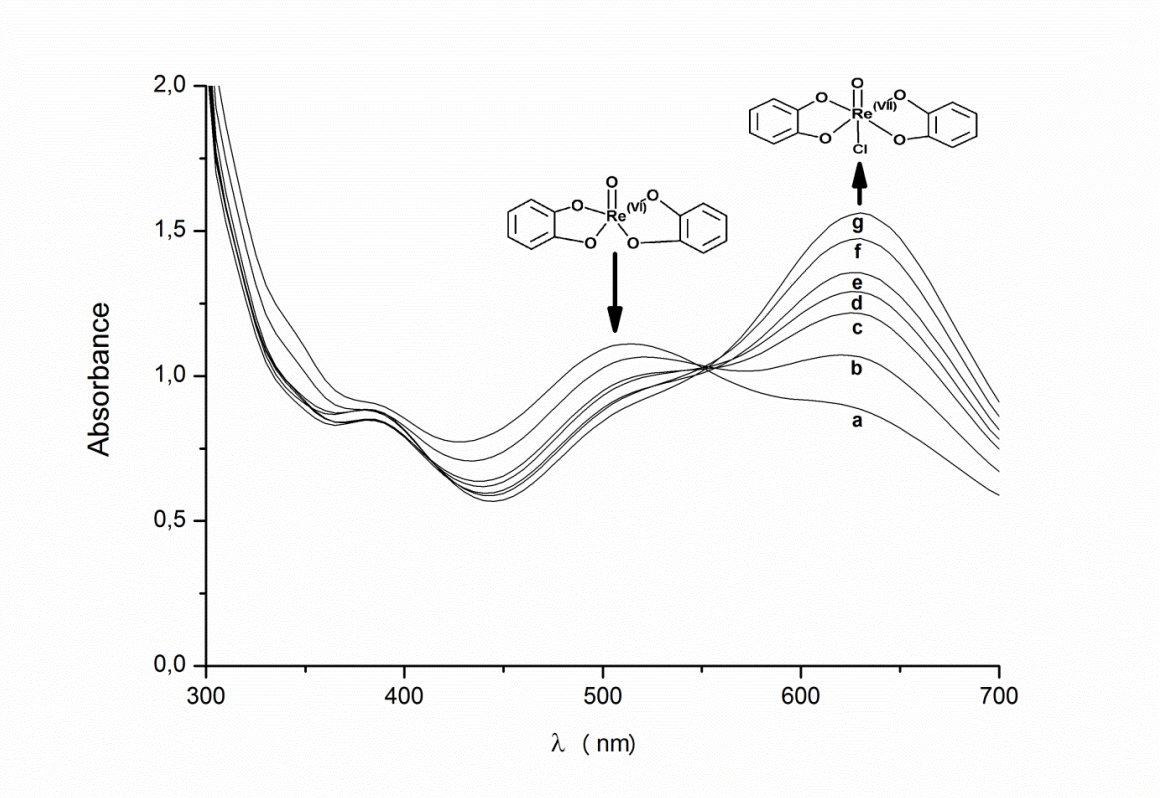
Obrázek 31 UV-VIS absorpční spektra zobrazující konverzi světle žlutě zbarveného komplexu 5 až tmavě fialový komplex 9 v přítomnosti 8 ekvivalentů TEA. Šipky ukazují zvýšení absorpčních maxim při λ = 365 nm, 460 nm a 540 nm, která jsou charakteristická pro komplex 9. Spektra jsou shromažďovány během 60 minut s obrazovým záznamem každých 6 minut.

Rozdíl mezi ligandy katecholem a pyrogallolem, z hlediska struktury vytvořených komplexů a rychlostí jednotlivých reakcí, se stává významný pro koncentrace TEA nižší než 4 ekvivalenty, zvláště pak v její nepřítomnosti v reakční směsi. Jak je patrné na UV-VIS absorpčním spektru znázorněného na **obrázku 32A**, rychlost konverze původně vytvořeného $[Re^{V}(O)(cat)_2]^-$ na meziprodukt $[Re^{VI}(O)(cat)_2]^0$ s absorpčním maximem při λ = 510 nm v přítomnosti 2 ekvivalentů TEA je značně snížena. Na rozdíl od pyrogalollu, katechol neobsahuje po komplexaci s Re volnou hydroxylovou skupinu, která by mohla disociovat. Díky tomu zůstává vzniklý meziprodukt $[Re^{VI}(O)(Cat)_2]^0$ při ESI, APPI a APCI ionizaci bez náboje a v důsledku toho je nemožná jeho strukturní charakterizace pomocí MS.



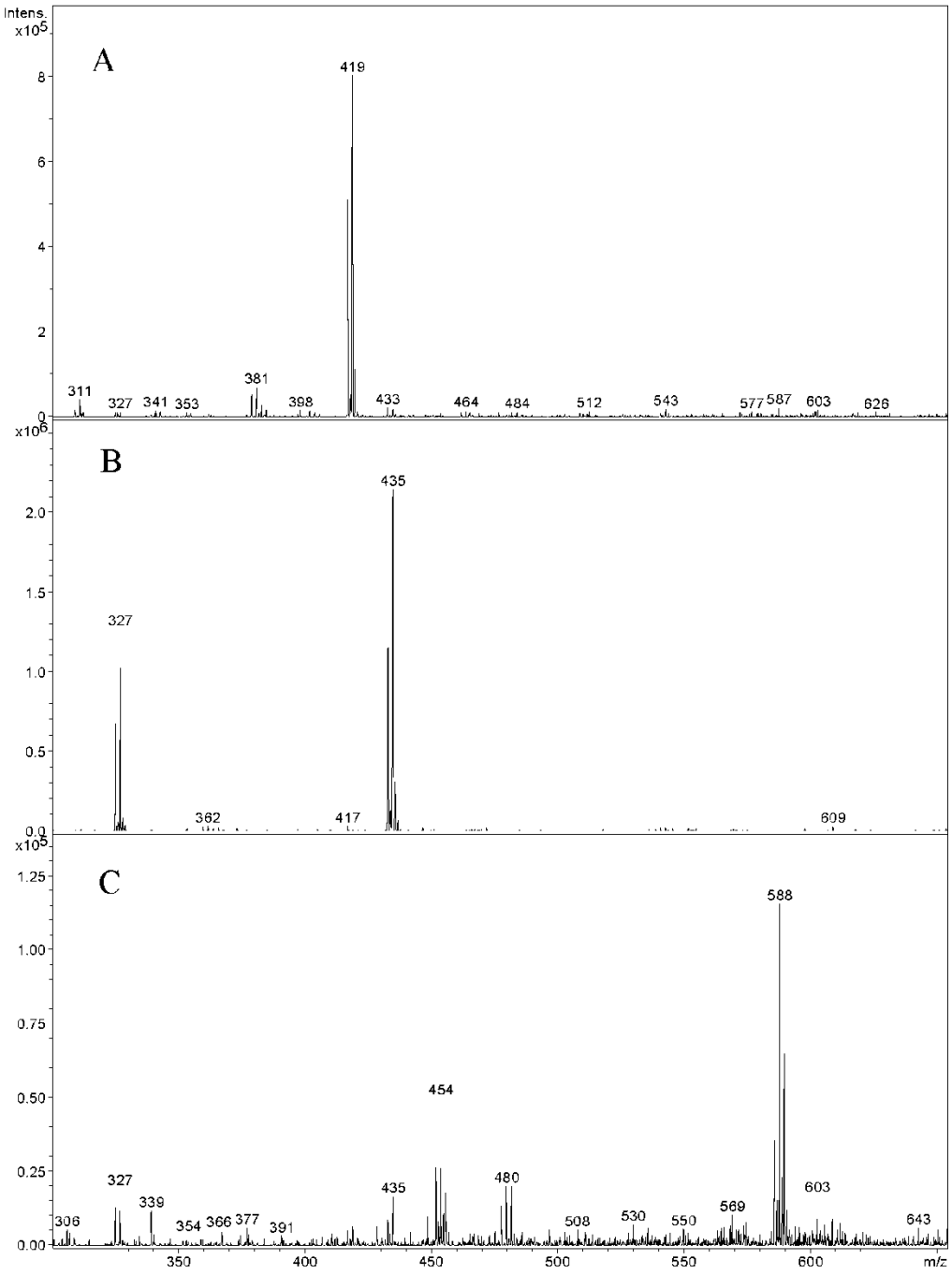
Obrázek 32A UV-VIS absorpční spektra zobrazující přeměnu komplexu 5 na fialový komplex 6 (λ_{max} = 510 nm). Druhé vznikající absorpční maximum při λ = 620 nm naznačuje tvorbu komplexu 7. Ten odpovídá produktu souběžně probíhající oxidaci Re a reakcí výměny ligandu v přítomnosti 2 ekvivalentů TEA. Šipky ukazují nárůst a / nebo pokles absorpčních maxim obou komplexů. Spektra byla shromažďována během 60 minut s obrazovým záznamem po 6 minutách.

Přítomnost komplexu $[Re^{VI}(O)(Cat)_2]^0$ v reakční směsi se pouze odhaduje na základě podobnosti absorpčních spekter popisujících tvorbu deprotonovaného $[Re^{VI}(O)(PG)_2]^-$ se spektry odpovídajícími tvorbě $[Re^{VI}(O)(Cat)_2]^0$. Jeho další a relativně pomalá oxidace je doprovázena výměnnou reakcí ligandu se zbytkovými Cl^- ionty přítomnými v reakční směsi za vzniku konečného stabilního produktu reakce $[Re^{VII}(O)Cl(Cat)_2]^0$. Jeho vznik dokazuje růst druhého absorpčního maxima při λ = 620 nm. Rychlost a celkový rozsah přeměny $[Re^{VI}(O)(Cat)_2]^0$ na $[Re^{VII}(O)Cl(Cat)_2]^0$ je znázorněn na **obrázku 32B**. Absorpční maximum při λ = 510 nm klesá ve prospěch rostoucího maxima při λ = 620 nm. Barva reakční směsi se v důsledku toho mění z fialové na modrou. Vzniklý komplex $[Re^{VII}(O)Cl(Cat)_2]^0$ je také neutrální, přesto je možno ho po reakci s *p*-bromoanilinem za vzniku komplexu 8, pomocí ESI-MS strukturně charakterizovat.



Obrázek 32B UV-VIS absorpční spektra ukazující dlouhodobou přeměnu komplexu 6 modrý komplex 7 (λ_{max} = 620 nm). Šipky ukazují nárůst a / nebo pokles absorpčních maxim obou komplexů.

ESI-MS spektra zobrazující struktury komplexů vzniklých v reakční směsi Cat-[(*n*-Bu_4N)($ReOCl_4$)] jsou uvedeny na **obrázku 33**. Spektrum A odráží složení reakční směsi po přídavku 8 ekvivalentů TEA bezprostředně po zahájení reakce. Výrazný pík při m/z 419 odpovídá převažující formě komplexu $[Re^{V}(O)(Cat)_2]^-$. Spektrum B s dominantním iontem m/z 425 a fragmentovým iontem při m/z 327 zobrazuje stejné složení reakční směsi po 60 minutách, kde převažuje komplex $[Re^{VII}(O)_2Cat)_2]^-$. Spektrum C odpovídá konečnému složení reakční směsi se 2 ekvivalenty TEA. Vznik komplexu $[Re^{VII}(O)Cl(Cat)_2]^0$ v tomto spektru je potvrzen přítomností iontů při m/z 588 a fragmentem při m/z 480, což odpovídá produktu reakce s *p*-bromoanilinem.



Obrázek 33 ESI-MS spektra v módu negativních iontů po přímém nástřiku, odráží složení vzorku odebraného z reakční směsi [(*n*-Bu_4N)($ReOCl_4$)] – CAT a analyzovaného ve fázi s (A) převládající komplex 5; (B) převažující komplexu 9; (C) převažující komplex 7, který byl identifikován po jeho derivatizaci *p*-bromoanilinem jako komplexech 8. Podrobnosti jsou uvedeny v textu.

Elementární složení všech sledovaných komplexů bylo ověřeno srovnáním teoretických a experimentálně získaných izotopových profilů molekulárních iontů, které vykazují velkou podobnost.

5. Závěr

V práci jsme prokázali, že hmotnostní spektrometrie s ESI, APPI a LDI ionizační technikou je užitečný nástroj pro charakterizaci struktury Re komplexů s aromatickými alkoholovými ligandy a pro analýzu jiných sloučenin přítomných v reakční směsi v průběhu komplexní přípravy. Získaná hmotnostní spektra poskytla jednoznačné informace o molekulových hmotnostech a struktuře studovaných sloučenin, díky dominantním molekulovým iontům komplexů a strukturně charakteristickým fragmentům přítomným ve spektrech. Přímé informace o složení reakční směsi je v zásadě přístupná bez předchozí problematické a pracné chromatografické separace. Nejistota správné strukturní charakterizace sledovaných iontů, na bázi s nízkým rozlišením MS dat, je výrazně snížena komplementárním vyhodnocením charakteristických izotopových profilů a jejich porovnání s teoretickými hodnotami.

Také jsme demonstrovali syntézu tří strukturně podobných Re komplexů připravených reakcí prekurzoru tetrabutylammonium tetrachlorooxorhenátu s aromatickými alkoholovými ligandy (1,2-dihydroxybenzenem (cat), 2,3-dihydroxynaftalenem (dhn) a pyrogalolem (PG)) v acetonitrilu. Vedle hmotnostní spektrometrie, byly připravené komplexy (bis(1,2-dihydroxybenzen)oxorhenium(-), bis(1,2,3-trihydroxybenzen)oxorhenium(-) a bis(2,3-dihydroxynaftalen)oxorhenium(-)) charakterizovány i pomocí ^{1}H NMR a IR spektroskopie. Srovnání získaných spekter všech těchto metod jasně ukazuje na spolehlivost a vysoký obsah informací, které nám hmotnostní spektra poskytují. Hmotnostní spektrometrie s využitím měkkých ionizačních technik je perspektivní analytická metoda vhodná pro sledování reakční kinetiky ve složitých formacích a stability připravených komplexů. Reprezentativní spektra byla zaznamenána při mikromolárních koncentracích analytů. I když jsou MS spektra méně vhodná pro charakterizaci blízce příbuzných struktur, jako jsou *cis* a *trans* izomery, je citlivost této metody nesrovnatelně vyšší v porovnání s běžně používanou NMR spektrometrií. Proto je MS technika jako jediná vhodná pro reálné klinické a farmakokinetické studie. Data získaná pomocí ESI-MS/MS poskytují prvotní pochopení mechanismu fragmentace Re oxokomplexů.

Námi provedené studie dokazují rozmanitost chemických reakcí mezi tetrachlorooxorhenátem a silně se vázajícími strukturně podobnými ligandy PG a Cat. Bez ohledu na zvolený ligand, pozorované reakce mohou být členěny na reakce rychlé, při nichž se okamžitě tvoří komplexy Re (V) a reakce pomalejší, zahrnující oxidaci centrálního atomu Re doprovázenou možnými výměnnými reakcemi ligandů. Zatímco prvně zmíněný typ reakce není závislý na skutečné struktuře ligandu, vykazují pomalejší reakce značnou závislost na přesné struktuře ligandu a aktuálním složení reakční směsi.

Přítomnost TEA v reakční směsi hraje ve sledovaných reakčních schématech a aktuálních rychlostech rozhodující roli. Molární poměr TEA vyšší než 4 ekvivalenty vede k tvorbě

komplexů $[Re^{VII}(O_2)(PG)_2]^-$ and $[Re^{VII}(O_2)(cat)_2]^-$. Nižší koncentrace, či dokonce nepřítomnost TEA, vede k výraznému zpomalení reakční rychlosti a zvyšuje pravděpodobnost výměnných reakcí ligandů. Při dlouhodobém sledování reakcí s méně než 4 ekvivalenty TEA, byly identifikovány konečné stabilní formy komplexů $[Re^{VII}(O)Cl(cat)_2]^0$ a deprotonovaného $[Re^{VII}(O_2)Cl(PG)]^-$.

Na rozdíl od komplexů s PG, analoga komplexů Re(VI) a Re(VII) s Cat zůstávají často bez náboje. Nepřítomnost volně ionizovatelných skupin v komplexech neumožňuje jejich strukturní charakterizaci v ESI-MS. Nicméně konečný reakční produkt komplex $[Re^{VII}(O)Cl(Cat)_2]^0$ je možné derivatizací s *p*-bromoanilinem převést na produkt, který pomocí ESI ionizovat lze.

Byly vypracovány metody chromatografické separace majoritních komponent reakční směsi při přípravě rheniových komplexů s vybranými fenolickými ligandy na dvou kolonách s různým typem stacionárních fází – slabě polární Reprosil NH_2 koloně a anexové Zorbax SAX koloně. V analytickém módu bylo za použití izokratické eluce dosaženo úplné separace připraveného komplexu od doprovodných složek reakční směsi, tj. nadbytečného ligandu a rhenistanu jako produktu pozvolného rozkladu komplexu a nezreagovaného výchozího tetrachlorooxorhenátu. Modifikované výsledky optimalizace na analytických kolonách byly úspěšně využity při izolaci čistého komplexu Re(VII) s katecholem na semipreparativní koloně LUNA 5 NH_2.

Pro rychlou kontrolu složení reakční směsi při přípravě Re(VII) s katecholem byla vypracována metodika stanovení kapilární zónovou elektroforézou. Bylo prostudováno migrační chování připraveného Re(VII) katecholového komplexu, katecholu a rhenistanu v sérii borátových nosných elektrolytů v rozmezí hodnot pH = 6,23 – 11,26. Linearita závislosti efektivní elektroforetické pohyblivosti komplexu na pH nosného elektrolytu prokázala, že komplex má charakter silného elektrolytu. Všechny hydroxylové skupiny katecholových ligandů jsou vázány koordinačně kovalentními vazbami v rámci komplexu a k jeho celkovému náboji nepřispívají. Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti katecholu má charakteristický sigmoidální charakter odpovídající slabé kyselině. Určený inflexní bod při hodnotě 7,35, odpovídající zdánlivé disociační konstantě katecholu, je významně nižší hodnoty než je tabelovaná hodnota pK_a= 9, 85. Domníváme se, že příčinou tohoto rozdílu je tvorba stabilního katechol-borátového komplexu, který vykazuje výrazně kyselejší charakter než samotný katechol. V nosném elektrolytu obsahujícím 10 mM tetraboritan sodný (pH = 9,45) bylo dosaženo úplné separace Re(VII) katecholového komplexu od katecholu a rhenistanu v čase analýzy nižším než 7 minut. CZE v tomto nosném elektrolytu byla průběžně využívána pro komplementární hodnocení složení reakční směsi při přípravě Re(VII) katecholového komplexu a hodnocení výsledné čistoty preparátů po preparaci s pomocí HPLC.

6. Použitá literatura

Abidi S. L.: High-performance liquid chromatography of phosphatidic acids and related polar lipids. *Journal of Chromatography A*, 587: 193 – 203 (1991).

Abram U., Alberto R.: Technetium and Rhenium – Coordination Chemistry and Nuclear Medical Applications. *J. Braz. Chem. Soc.* 17(8): 1486 – 1500 (2006).

Altria K. D.: Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* 856: 443 - 463 (1999).

Bandoli G., Dolmella A., Gerber T. I. A., Mpinda D., Perils J., duPreez J. G. H.: Complexes of Oxorhenium(V) with Aromatic 2-Amino-Alcohols. *Journal of Coordination Chemistry* 55 (7): 823 – 833 (2002).

Bharti S. K., Roy R.: Quantitative ^{1}H NMR spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry* 35: 5 – 25 (2012).

Blower P. J., Dilworth J. R., Hutchinson J. P., Nicholson T., Zubieta J.: Rhenium complexes with di- and tri-thiolate ligands. The synthesis and *X*-ray crystal structures of square pyramidal $[PPh_4][ReO(SCH_2CH_2S)_2]$ and $[NMe_4][ReS(SCH_2CH_2S)_2]$ and trigonal prismatic $[PPh_4][Re\{(SCH_2)_3CCH_3\}_2]$, *Journal of the Chemical Society, Dalton Trans.* 7: 1339 - 1345 (1986).

Blower P. J., Singh J., Clarke S. E. M., Bisundan M. M., Went M. J.: Preparation and characterisation of pentavalent Re-186 DMSA. A possible tumour therapy agent. *Journal of Nuclear Medicine* 31: 212 – 213 (1990).

Booysen I., Gerber T. I. A., Hosten E., Mayer P: Monodentate imido coordination of 2-aminodiphenylamine to rhenium(V). *Journal of Coordination Chemistry* 60: 1749 - 1753 (2007).

Burešová H.: Studium faktorů ovlivňujících redukci rhenistanu (Study of Factors Influencing the Reduction of Rhenistane).Praha 1-24 str.11. cit. 2.2.2016 (2012).

Cech N. B., Krone J. R., Enke C. G.: Predicting Electrospray Response from Chromatographic Retention Time. *Analztical Chemistry* 73 (2): 208 – 213 (2001).

De Souza E. J., Fernandes A. G. A., Maia P. I. S., Lemos S. S., Ellena J., Abram U., Deflon V. M.: Oxorhenium(V) complexes with 2,3-dihydroxynaphthalene. *Zeit schrift für anorganische und allgemeine Chemie* 636: 2467 – 2470 (2010).

De Vries N., Costello C. E., Jones A. G., Davison A.: Technetium nitrido complexes with amine and thiolateligands: structural characterization of TcN $(SC_6HMe_4)_2(NHC(NMe_2)_2)_2$, a complex with coordinatively bound 1,1,2,2-tetramethylguanidine.*Inorganic Chemistry* 29: 1348 - 1352 (1990).

Dilworth J. R., Parrott S. J.: The Biomedical chemistry of technetium and rhenium. *Chemical Society Reviews* 27: 43 - 55 (1998).

Donnelly P. S.: The role of coordination chemistry in the development of copper and rhenium radiopharmaceuticals. *Dalton Transactions* 40 (5):999-1010(2011).

Feiters M. C., Rowan A. E., Nolte R. J. M.: From simple to supramolecular cytochrome P450 mimics. *Chemical Society Reviews* 29: 375 – 384 (2000).

Gerber T. I. A., Luzipo D. G., Mayer P.: Form at ionof and oxo-free Rhenium(V) complex with 2-aminophenol. *Journal of Coordination Chemistry* 57: 1393 – 1398 (2004).

Gerber T. I. A., Mayer P.: Versatility of bidentate aniline derivatives as ligands for Rhenium(V) and Technetium(V). *Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences* 6: 165 -168 (2005).

Gerber T. I. A., Luzipo D. G., Mayer P.: Monodentate imido and bidentate aminophenolate coordination of 2-aminophenol in Rhenium(V) complexes. *Journal of Coordination Chemistry* 59: 1055 – 1062 (2006).

Greenwood N. N., Earnshaw A.: Chemistry of the Elements (Second Edition): 24 - Manganese, Technetium and Rhenium. 1040-1069 (1997), ISBN978-0- 7506-3365-9.

Hanai T.: HPLC – A practical Guide, Health Research Foundation,. *The Royal Society of Chemistry*, Kyoto, Japan (1999), ISBN 0-85404-515-5.

Henderson W., Nickleson B. K., McCaffrey L. J.: Applications of electrospray mass spektrometry inorganometallic chemismy. *Polyhedron* 17 (25-26): 4291 – 4313(1998).

Henderson W., McIndoeJ. S.: Mass Spectrometry of Inorganic, Coordination and Organometallic Compounds: Tools – Techniques – Tips. Wiltshire, UK: Wiley (2005), ISBN 9780470014318.

Holčapek M., Jandera P.: Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS), *Chemické Listy* 92: 278 – 286 (1998).

Holder G. N., Bottomley L. A.: Redox tuning of binuclear rhenium(V) complexes: The influence of pyridine substituents on the voltammetry of μ-oxobis[cis-dichloro-cis-dipyridyloxorhenium(V)]. *Inorganica Chimica Acta* 194 (2): 133 – 137 (1992).

Hori H., IshitaniO., KoikeK., TakeuchiK., Ibusuki T.: Electrospray mass spectrometric detection of unstable rhenium complexes as reaction intermediates of photochemical CO_2-fixation. *Analytical Sciences* 12: 587 – 590 (1996).

Hori H., Ishihara J., Koike K., Takeuchi K., Ibusuki T., Ishitani O.: Electrospray mass-spectrometric detection of neutral rhenium bipyridine complexes using $NaNO_3$ as anionization agent. *Chemistry Letters*3: 273 – 74 (1997).

Jurisson S., Berning D., WelJia, DangsheMa.: Coordination compounds in nuclear medicine. *Chemical Reviews* 93 (3): 1137 – 1156 (1993).

Kašička V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické Listy* 91: 320 - 329 (1997).

Kohlíčková-Koudelková M., Jedináková-Křížová V., Deyl Z.: Study of perrhenate reduction by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 23 (2): 245 – 248 (2002).

Kohlíčková M., Jedináková-Křížová V.,Konířová R.: Chromatographic study of ^{186}Re complexes with various ligands. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 242 (2): 545 - 549 (1999).

Kohlíčková-Koudelková M., Konířová R., Jedináková-Křížová V.: Chromatographic and electromigration analysis of rhenium compounds used in radiopharmacy. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 258 (3): 627 – 633 (2003).

Kohlíčková M., Jedináková-Křížová V., Melichar F.: Komplexní sloučeniny Rhenia v nukleární medicíně. *Chemické Listy* 94: 151 – 158 (2000).

Kohlíčková M., Jedináková-Křížová V., Melichar F.: Komplexní sloučeniny Technecia – jejich využití v přípravě radiofarmak a některé farmakokinetické vlastnosti. *Chemické Listy* 92: 643 – 655 (1998).

Koudelková M., Jedináková-Křížová V.: Capillaryelectrophoretic and thin-layer chromatographic characterization of rhenium complexation with 1-hydroxyethylidenediphosphonic acid. *Journal of Chromatography A* 990 (1-2): 317 – 323 (2003).

Kupiec T.: Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding* 8 (3): 223 - 227 (2004).

Kupka K., Kubinyi J., Šámal M. a kol.: Nukleární medicína. (2007). ISBN 978-80-903584-9-2.

Libson K., Helm L., Cutler C., Merbach A., Deutsch E.: Kinetics and mechanism of ligand substitution on an alogous technetium (V) and rhenium (V) complexes.*Journal of Nuclear Medicine* 30: 31 - 34 (1990).

Liu S.: The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. *Chemical Society Reviews* 33: 445 – 461 (2004).

Liu S., Edwards D. S.: ^{99m}Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals. *Chemical Reviews* 99: 2235 – 2268 (1999).

Machura B., Kusz J.: Synthesis, spectroscopic characterisation, crystal and molecular structure of [ReOBr(quin-2-c)2] and [ReOCl(quin-2-c)2] complexes: DFT and TD-DFT calculations for [ReOBr(quin-2-c)2]. *Polyhedron* 27: 187 – 195 (2008).

Machura B., Wolff M., Gryca I.: Rhenium(V) oxocomplexes [ReOX(N-O)2] and [ReOL(N-O)2]$^{+}$ - Synthesis, structure, spectroscopy and catalytic properties. *Coordination Chemistry Reviews* 275: 154 – 164 (2014).

Malviya R., Bansal V., Pal O. P., Sharma P. K.: High performance liquid chromatography: A short review. *Journal of Global Pharma Technology* 2 (5): 22 - 26 (2010), ISSN 0975-8542.

Martin M., Guiochon, G. Effects of high pressure in liquid chromatogramy. *Journal of Chromatography A* 1090 (1-2): 16 – 38 (2005).

McMurry J.: Organická chemie. 394-451 (2007), ISBN 978-80-7080-637-1.

Opekar F.: Aparatura pro elektroforetické separace v krátkých kapilárách. *Chemické Listy* 106: 289 - 292 (2012).

Pathy S. K.: Basic skills training guide – HPLC method development and validation – an overview. (2013) Dostupné z WWW: https://www.researchgate.net/publication/256561891

Pelecanou M., Pirmettis I. C., Papadopoulos M. S., Raptopoulou C. P., Terzis A., Chiotellis E., C. I.
Stassinopoulou: Structural studie of ReO(V) mixed ligand [SNS][Cl] and [SNS][S] complexes, *Inorganica Chimica Acta* 287: 142 - 151 (1999).

Petroselli G., Mandal M. K., Chen L. C., Ruiz G. T., Wolcan E., Hiraoka K., Nonami H., Erra-Balsells R.: Mass spektrometry of rhenium complexes: A comparative study by using LDI-MS, MALDI-MS, PESI-MS and ESI-MS. *Journal of Mass Spectrometry* 47: 313 – 21 (2012).

Plaček L.: Nezapomeňte na kapilární elektroforézu! *Chemagazín* 2 (ročník XXI): 11(2011).

Sanjay K. D., Kumar D. R. H.: Importance of RP-HPLC in analytical method development: A review. Kumar and Kumar, *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*3 (12): 4626 – 4633 (2012), ISSN:0975-8232.

Sobotníková J., Bosáková Z., Čabala R., Coufal P., Pacáková V., Štulík K.: Historie, současnost a perspektivy analytických separačních metod na katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze., *Chemické Listy* 104: 1226-1231 (2010).

Stuart B.: Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications (2004), ISBNs0-470-85427-8 (HB), 0-470-85428-6 (PB).

Štícha M., Jelínek I., Poláková J., Kaliba D.: Characterization of rhenium(V) complexes with phenols using mass spektrometry with selected soft ionization techniques. *Analytical Letters* 48: 2329 - 2342 2015).

Tisato F., Bolzati C., Porchia M., Refosco F: Contribution of Electrospary Mass Spectrometry for the characterization, design, and development of Nitrido Technecium and Rhenium Heterocomplexes as potentia lradiopharmaceuticals. *Mass Spectrometry Reviews* 23: 309 – 332 (2004).

Tubaro M., Marotta E., Traldi P., Bolzati C., Porchia M., Refosco F.,Tisato F.: ESI/MS^n in the structural characterisation of some nitrido-Re heterocomplexes. *International Journal of Mass Spectrometry* 232 (3): 239 – 247 (2004).

Ullmann V.: Jaderná a radiační fyzika online. 2000 cit.2015_11_23. Astro Nukl Fyzika. Dostupné z WWW: http://astronuklfyzika.cz/JadRadFyzika.htm.

Van Berkel G. J.: An overview of some recent developments in ionization methods for mass spektrometry. *European Journal of Mass Spectromtry* 9 (6): 539 – 562 (2003).

Van Kirk C. C., Bereau V., Abu-Omar M. M., Evans D. H.: Voltammetric studies of rhenium(V) compounds containing the 2-(2´-hydroxyphenyl)-2-oxazoline ligand. *Journal of Electroanalytica lChemistry* 541: 31 – 38 (2003).

Vikrant V.: A review on HPLC and RP-HPLC analysis method. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*4(4): 50 – 64 (2014).

Vohlídal J., Julák A., Štulík K.: Chemické a analytické tabulky. Grada 1999, str.115 (12.5.2016). ISBN 80-7169-855-5.

Volkert W. A., DeutschE. A.: *Advancesin metals in medicine*. State College, PA: JAI Press(1993).

Wan K. X., Vidavsky I., Gross M. L.: Comparing simile spectra: From similarity index to spectral contrastangle. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 13: 85 – 88 (2002).

Wyatt M. F.: MALDI-TOF MS analysis of coordination and organometallic complexes: A nic(h)e area to work in. *Journal of Mass Spectrometry* 46: 712 – 719 (2011).

Wyatt M. F., Stein B. K., Brenton A. G.:.Characterization of various analytes using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and 2-[(2E)-3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene]malononitrile matrix. *Analytical Chemistry* 78: 199 – 206 (2006).

www.sge.com: How do I develop an HPLC method. SGE Analytical Science. Trajan Scientific Australia (2014). Cit. 28.2.2016 Dostupné z WWW:

http://www.sge.com/uploads/8a/72/8a72fb7f2a8739c5408322351675ab3a/BR-0433-H_ProteCol-Brochure.pdf

Xiang Y., Liu Y., Lee M. L.: Ultra high pressure liquid chromatography using elevated temperature. *Journal of Chromatography A* 1104 (1-2): 198 – 202 (2006).

Xu Y.: Tutorial: Capillary Electrophoresis. *The chemical educator* Springer-Verlag New Yourk, INC. 1(2): 1 -14 (1996), ISSN 1430-4171.

Young R. C., Irvine J. W., Jr.: Reduction of Perrhenate. *Chemical Review* 23 (1): 187 - 191(1938).