

HPLC SEPARACE POLYKARBOXYLÁTOVÝCH DERIVÁTŮ CYKLENU S VYUŽITÍM BEZKONTAKTNÍ VODIVOSTNÍ DETEKCE

ANNA HAMPLOVÁ^{a*}, PAVEL COUFAL^a,
ZUZANA BOSÁKOVÁ^a, FRANTIŠEK OPEKAR^a
a VOJTĚCH KUBÍČEK^b

^a Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2,

^b Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra anorganické chemie, Albertov 6, 128 43 Praha 2
annahamplova@volny.cz

Došlo 16.10.07, přijato 27.12.07.

Klíčová slova: HPLC, deriváty cykluenu, bezkontaktní vodivostní detektor (CCD)

Úvod

Počet lidí v České republice, které každý rok postihne nádorové onemocnění, se každým rokem zvyšuje. Včasné odhalení nádoru a zahájení léčby výrazně zvyšuje šance pacienta na úplné vyléčení. Proto se vedle vývoje nových léčiv věnuje velká pozornost diagnostice a zobrazování nádorů. Jednou z nejúčinnějších neinvazivních diagnostických metod je v současnosti tomografie magnetické rezonance (MRI – Magnetic Resonance Imaging)¹. K dosažení lepšího zobrazení nádoru se u této metody používají kontrastní látky, jejichž základem jsou paramagnetické látky založené převážně na Gd^{3+} iontu. Pro využití v klinické praxi musí být tento, pro tělo velmi toxický ion, aplikován ve formě komplexu, který je dostatečně stabilní jak z hlediska termodynamického, tak z hlediska kinetického. Ligandy používané k tomuto účelu nejčastěji jsou polykarboxylátové deriváty cykluenu (1,4,7,10-tetraazacyklododekan) schopné koordinovat ion gadolinitý osmi koordinačně-kovalentními vazbami a vytvořit tak velmi stabilní komplex².

Polykarboxylátové deriváty cykluenu (obr. 1) se většinou připravují poměrně složitou několikastupňovou syntézou. Čištění jednotlivých reakčních meziproductů je obtížné, protože vedle žádané látky nelze zabránit vzniku vedlejších produktů s velmi podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. I s využitím opakovaně nízkotlaké sloupcové chromatografie je obtížné získat polykarboxylátové derivá-

ty cykluenu v čistotě požadované pro klinickou praxi. Možným řešením se zdá být použití HPLC, které nebylo u této skupiny látek dosud popsáno ani v analytickém ani v preparativním měřítku.

Studované deriváty cykluenu často nemají ve svých molekulách žádný výrazný chromofor a nejvíce absorbují záření až při vlnových délkách kolem 200 nm. V této oblasti UV jsou však spektrální odezvy analytů rušeny absorpcí methanolu a acetonitrilu, tedy rozpouštědel běžně používaných jako součást mobilní fáze pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s reverzními fázemi (RP-HPLC). Jedním z možných řešení problému detekce studovaných látek je použití bezkontaktního vodivostního detektoru (CCD – Contactless Conductivity Detector, v literatuře někdy také označovaný C^4D – Capacitively-Coupled Contactless Conductivity Detector)^{3,4}. Ačkoliv jde o poměrně častou metodu detekce v kapilární zónové elektroforéze^{5,6}, v literatuře byly zatím popsány jen dva případy použití CCD v RP-HPLC (cit.^{7,8}). Důvodem malého počtu prací může být to, že metodou RP-HPLC je separováno poměrně málo látek majících náboj, který je hlavní podmínkou pro použití CCD. Nevýhodou této metody detekce je závislost signálu nejen na vodivosti analyzovaného roztoku, ale také na jeho elektrické permitivitě. Proto i malá změna obsahu vody v mobilní fázi způsobí velkou změnu signálu CCD, což vede např. k výrazným systémovým pikům^{9,10}.

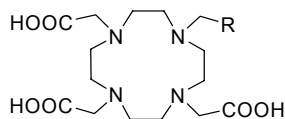
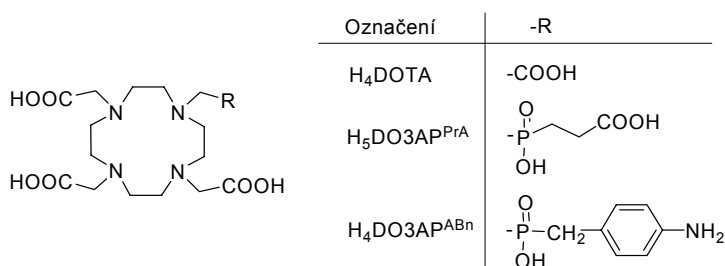
Cílem této práce bylo vyvinout metodu separace polykarboxylátových derivátů cykluenu pomocí RP-HPLC, která by umožnila rychlou kontrolu čistoty jednotlivých frakcí při dělení reakčních směsí sloupcovou chromatografií a dala se případně v budoucnu využít pro preparativní HPLC. Dalším úkolem bylo použití prototypu CCD jako vhodného detektoru pro vizualizaci polykarboxylátových derivátů cykluenu a jeho porovnání s UV detektorem při separaci těchto látek v RP-HPLC.

Experimentální část

Přístrojové vybavení

Měření byla prováděna na kapalinovém chromatografu, který se skládal z čerpadla LCP 4000, dávkovacího ventilu s 10 μ l smyčkou a spektrofotometrického UV detektoru LCD 2084 (vše Ecom, ČR). Současně byl použit prototyp bezkontaktního vodivostního detektoru s izolovanými drátkovými elektrodami¹¹ zkonstruovaný na katedře analytické chemie Univerzity Karlovy v Praze. Jako zdroj vysokofrekvenčního sinusového napětí pro CCD byl použit generátor FG 503 (Motech Industries, USA). Získaná data byla zpracována softwarem CSW 1.7 (DataApex, ČR).

* Anna Hamplová získala 3. místo v soutěži O cenu firmy Merck 2007 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.



Obr. 1. Struktury studovaných polykarboxylátových derivátů cyklenu

K vývoji metody separace byly použity tyto kolony: RP Select B (C8), 125 × 4 mm, velikost částic 5 μm (Merck, SRN), Biospher PSI 200 NH, 150 × 4,6 mm, velikost částic 7 μm (Labio, ČR), Ascentis RP-Amide, 250 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm (Supelco, USA) a Discovery HSF5, 150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm (Supelco, USA).

Použitá chemikálie

Methanol a acetonitril LiChrosolv pro HPLC a kyselina mravenčí (98–100%) byly zakoupeny od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Kyselina octová (99%), kyselina trifluoroctová (98%) a triethylamin (99,5%) byly zakoupeny od firmy Fluka (Neu-Ulm, Německo). Kyselina fosforečná (85%), hydrogenfosforečnan sodný, dihydrogenfosforečnan sodný a hydroxid draselný, vše v čistotě p.a., byly zakoupeny od firmy Lachema (Brno, ČR).

Všechny studované polykarboxylátové deriváty cyklenu s čistotou větší než 95 % dle NMR byly syntetizovány na Katedře anorganické chemie Univerzity Karlovy v Praze^{12–14}. Deionizovaná voda byla připravena přístrojem Milli-Q (Millipore Corporation, USA).

Příprava mobilních fází a vzorků pro analýzu

K analýzám byly používány roztoky polykarboxylátových derivátů cyklenu v mobilní fázi o koncentraci 1·10⁻⁴ mol dm⁻³, které byly uchovávány ve tmě v chladu. Mobilní fáze byly připraveny smísením organického rozpouštědla s deionizovanou vodou nebo pufrům o koncentraci 0,01 mol dm⁻³ v daném poměru a před použitím 15 min ultrazvukovány přístrojem Elmasonic S15H (P-LAB, ČR). Fosforečnanový pufr (pH 7,1) byl připraven rozpuštěním příslušného množství hydrogenfosforečnanu sodného a dihydrogenfosforečnanu sodného v deionizované vodě. Octanový (pH 4,7), mravenčanový (pH 3,5) a fosforečnanový pufr (pH 2,1) byly připraveny částečným zneutralizováním příslušných kyselin hydroxidem draselným. Hodnoty pH vodné složky mobilní fáze byly měřeny na pH metru Jenway 4330 (Essex, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou, který byl kalibrován na standardní pufrů o pH 4 a 7.

Experimentální podmínky

Všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě. Vzorek (10 μl) byl dávkován manuálně přes dávkovací ventil, průtok mobilní fáze byl 0,5 ml min⁻¹. Pro UV detekci byla zvolena vlnová délka 200 nm. Zdroj vysokofrekvenčního napětí pro CCD pracoval při frekvenci 100 kHz a amplitudě 4 V. Detektory byly zapojeny v sérii, přičemž CCD byl za výstupem z UV detektoru.

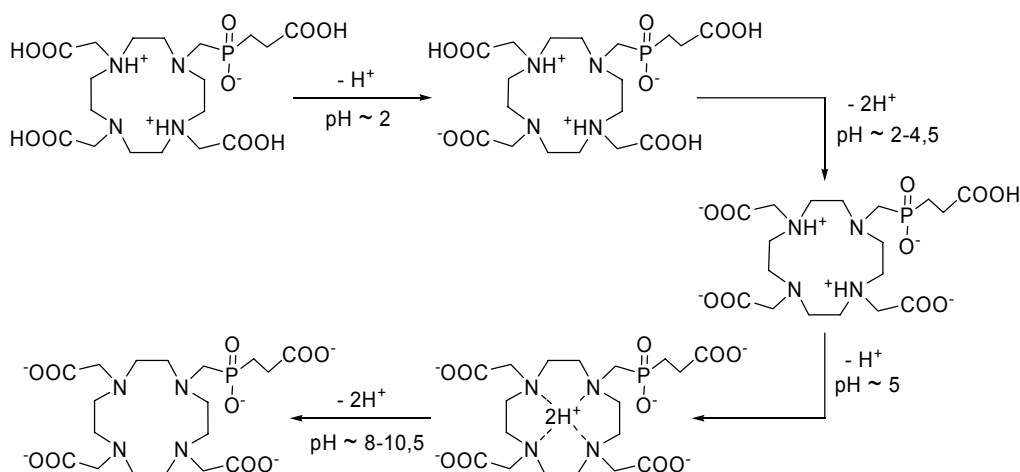
Výsledky a diskuse

Separace

Molekuly studovaných látek (obr. 1) obsahují vedle nepolárních částí také značně polární funkční skupiny. Separace tedy může být založena na hydrofilních i hydrofobních interakcích analytů se stacionární fází, které se budou uplatňovat různou měrou podle konkrétní sloučeniny. Další, pro chromatografii velmi důležitou, vlastností polykarboxylátových derivátů cyklenu je schopnost tvořit amfionty. Všechny studované deriváty cyklenu ve svých molekulách obsahují jednak aminoskupiny schopné protonizace, ale také karboxylové a fosfinátové skupiny, které mohou naopak deprotonizovat^{12,15}. Výsledný náboj jejich molekul se pak pohybuje od +3 do -4 podle pH mobilní fáze (obr. 2).

Pro vývoj metody separace polykarboxylátových derivátů cyklenu byla v této práci zvolena RP-HPLC, která je jednou z nejrozšířenějších analytických metod ve farmaceutickém průmyslu. Z velkého množství dostupných stacionárních fází byly vyzkoušeny tyto čtyři: klasická reverzní fáze C8 (kolona RP Select B), amidová (kolona Ascentis RP-Amide), aminopropyllová (kolona Biospher PSI) a pentafluorofenylpropyllová (kolona Discovery HS F5).

První experimenty byly provedeny na klasické reverzní fázi C8 (kolona RP Select B), která je díky deaktivovaným silanolovým skupinám doporučována pro analýzu bazických látek. Vzhledem k tomu, že molekuly všech analyzovaných látek obsahují několik silně polárních skupin, bylo možné předpokládat jejich malou retenci na tomto typu kolony. Výraznější interakci s klasickou reverzní stacionární fází může poskytovat pouze látka H₄DO3AP^{ABn}, u které se opro-

Obr. 2. Protonizace H_5DO3AP^{PrA} v závislosti na pH (cit.¹⁰)

ti ostatním studovaným látkám mohou navíc uplatnit hydrofobní interakce aromatického kruhu. Na této koloně byly testovány mobilní fáze obsahující od 15 do 85 obj.% organického modifikátoru (methanolu nebo acetonitrilu). Všechny studované látky eluovaly téměř s mrtvým časem kolony a k jejich separaci tedy nedošlo. Retenční čas H_4DO3AP^{ABn} se od retenčních časů ostatních polykarboxylátových derivátů cyklenu prakticky nelišil. Hodnota pH mobilní fáze byla postupně upravována pomocí pufrů o pH 2 až 7 s cílem změnit celkový náboj molekul studovaných látek. Výraznější zadržování polykarboxylátových derivátů cyklenu přesto nebylo pozorováno.

Lepší rozlišení látek obtížně separovatelných na klasické reverzní fázi C8 (C18) poskytují obvykle stacionární fáze se zakotvenou polární skupinou, protože k separaci na nich přispívají i hydrofilní interakce, zejména tvorba vodíkových vazeb¹⁶. Zakotvené polární skupiny navíc fungují jako velmi účinné chránění volných silanolových skupin¹⁷, a jsou tudíž doporučovány pro analýzu bazických a amfionických látek, jakými jsou i polykarboxylátové deriváty cyklenu. Pro separaci studovaných látek byla zvolena kolona Ascentis RP-Amide, která podle údajů výrobce obsahuje zakotvený amidový ligand. Opět byly testovány mobilní fáze s obsahem methanolu, resp. acetonitrilu, od 15 do 85 obj.% a pufrů s hodnotou pH v rozmezí od 2 do 7. K úspěšné separaci polykarboxylátových derivátů cyklenu však nedošlo. Všechny studované látky eluovaly prakticky s mrtvým časem kolony bez ohledu na použitou mobilní fázi. Jediným výraznějším rozdílem oproti výsledkům získaným na koloně RP-Select B byla větší symetrie píků studovaných látek, což bylo patrně způsobeno lepším chráněním volných silanolových skupin zakotvenou amidovou skupinou než trimethylsilanovými skupinami na koloně RP Select B.

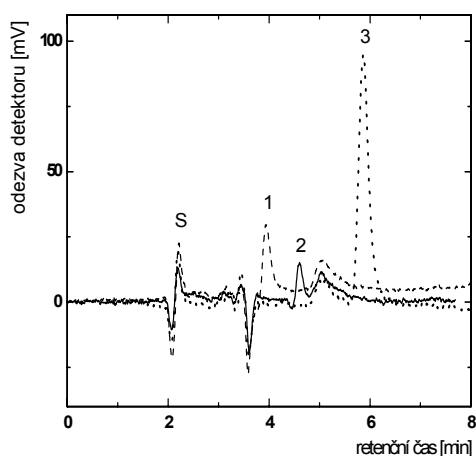
Jako další v pořadí byla testována aminopropyllová stacionární fáze (kolona Biospher PSI 200 NH), nejpolárnější stacionární fáze z testovaných sorbentů. Při použití

mobilních fází obsahujících 35 až 85 obj.% methanolu jako organického modifikátoru studované látky z kolony neeluovaly ani po 120 minutách nebo byly jejich píky již natolik rozmyté, že splynuly se základní linií. Vysvětlení může spočívat v charakteru sorbentu, neboť aminoskupiny stacionární fáze jsou za podmínek separace protonizovány, díky čemuž se tato kolona chová jako slabě bazický aniontový iontoměnič. Separované látky patrně byly na koloně pevně zadržovány a k jejich vymytí bylo třeba mobilní fáze o pH vyšším či nižším než dovoluje stabilita stacionární fáze (tj. mimo interval pH 2–7,5).

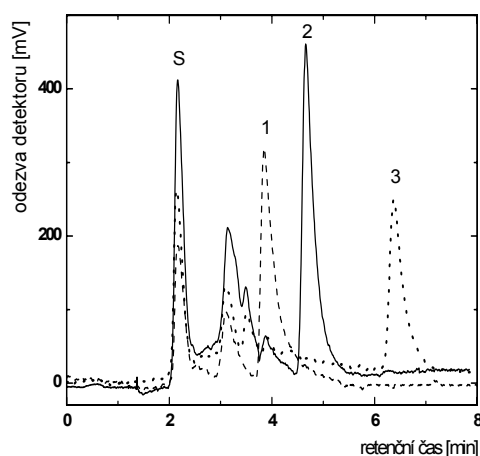
Experimenty provedené na předchozích třech kolonách ukázaly, že k úspěšné separaci polykarboxylátových derivátů cyklenu je třeba nalézt takovou stacionární fázi, na které se budou uplatňovat zejména hydrofilní interakce, které budou navíc doplněny o interakce hydrofobní. Z dostupných stacionárních fází byla vybrána pentafluorofenylpropyllová stacionární fáze s deaktivovanými silanolovými skupinami (kolona Discovery HS F5), jejíž základní charakteristikou je tzv. „U-shape retention“¹⁸. Při separaci polárních analytů se totiž tato kolona podle množství organického rozpouštědla v mobilní fázi chová buď jako reverzní, nebo jako normální fáze. Pokud je závislost retence na množství organického modifikátoru v mobilní fázi vynesena do grafu, výsledkem je křivka ve tvaru písmene U. Je-li použita mobilní fáze s vysokým obsahem organického modifikátoru, měly by převažovat interakce hydrofilní, zejména iontově výměnné a tvorba vodíkových vazeb mezi analytem a stacionární fází.

Polykarboxylátové deriváty cyklenu se podařilo úspěšně separovat na této koloně při použití mobilních fází obsahujících od 65 do 95 obj.% organického modifikátoru, tedy za podmínek, kdy kolona Discovery HS F5 pracuje spíše v modu normální fáze. Pokud byl jako organický modifikátor mobilní fáze použit acetonitril místo methanolu, nebyl pozorován žádný zásadní rozdíl ve tvaru píků studovaných látek. Podobných retenčních časů jednotlivě

a



b



Obr. 3. Chromatogramy vzorků H_4DOTA (1), H_5DO3AP^{PrA} (2) a H_4DO3AP^{ABn} (3); systémový pík je v chromatogramech označen písmenem S. Stacionární fáze: Discovery HSF5; mobilní fáze: methanol-voda (85:15, v/v); průtok: $0,5 \text{ ml min}^{-1}$; (a) UV detekce ($\lambda = 200 \text{ nm}$), (b) CCD detekce ($f = 100 \text{ kHz}$, $A = 4 \text{ V}$)

vých derivátů cyklenu bylo dosaženo, pokud mobilní fáze obsahovala asi o 10 obj.% méně acetonitrilu než methanolu. Čím více organického modifikátoru mobilní fáze obsahovala, tím více byly separované látky na koloně zadržovány, ale tím horší byl také tvar jejich píků. Nejlepšího dělení studovaných látek bylo dosaženo v mobilní fázi o složení methanol-voda (85:15, v/v), která je vhodným kompromisem mezi retencí jednotlivých separovaných látek a rozmýváním jejich píků (obr. 3). Píky jednotlivých studovaných látek byly symetrické a oddělené až k základní linii.

V další části práce bylo studováno chování polykarboxylátových derivátů cyklenu na této stacionární fázi při použití mobilních fází s malým obsahem organického modifikátoru (15–35 obj.%), tedy za podmínek, kdy kolona Discovery HS F5 pracuje spíše v modu reverzní fáze. Studované látky, s výjimkou H_4DO3AP^{ABn} , nebyly zadržovány ani při použití mobilní fáze o složení methanol-voda (15:85, v/v). Látka H_4DO3AP^{ABn} obsahující ve své molekule aromatický kruh, byla na této stacionární fázi pracující v reverzním módu zadržována ($k = 0,86$), ačkoli na klasické reverzní fázi C8 eluovala prakticky s čelem. Hlavním důvodem zadržování H_4DO3AP^{ABn} jsou pravděpodobně π - π interakce mezi aromatickými kruhy stacionární fáze a analyzované látky.

Detekce

Polykarboxylátové deriváty cyklenu poskytují i při vlnové délce odpovídající maximu absorpční křivky ($\lambda =$

200 nm) poměrně slabý signál, zejména pokud je jako organický modifikátor mobilní fáze použit methanol (obr. 3a). Na základě této skutečnosti byl za klasický UV detektor zařazen ještě CCD, kterým je možné detegovat nabitě látky, jakými jsou polykarboxylátové deriváty cyklenu, a to i ve velmi malých koncentracích.

Pokud byla pro separaci studovaných látek použita mobilní fáze s malou vodivostí, tzn. neobsahující kyselinu ani pufr, poskytoval CCD, v souladu s očekáváním, podstatně větší odezvu než standardní UV detektor. To je jasně patrné z chromatogramů jednotlivých studovaných látek získaných na koloně Discovery HS F5 v optimální mobilní fázi methanol-voda (85:15, v/v) při současně UV (obr. 3a) a CCD detekci (obr. 3b). Poměr signálu a šumu (S/N) všech studovaných látek byl pro CCD větší, v případě látky H_5DO3AP^{PrA} dokonce více než desetkrát, ve srovnání s UV detektorem (tab. I).

Píky zaznamenané CCD vykazují větší asymetrii oproti těm, které byly získány UV detektorem. To je způsobeno pravděpodobně tím, že CCD byl zařazen až jako druhý v pořadí, což vedlo k výraznějšímu rozmývání zón analytů. Díky větší citlivosti vodivostní detekce jsou v chromatogramech na obr. 3b vidět nečistoty eluující s retenčním časem kolem 3 min, které při použití UV detekce téměř zanikají v šumu základní linie. Chromatogramy navíc ukazují, že jak vzorek H_5DO3AP^{PrA} , tak H_4DO3AP^{ABn} je znečištěn malým množstvím H_4DOTA , což při UV detekci není vůbec patrné.

Tabulka I

Poměr signálu a šumu (*S/N*) pro UV a bezkontaktní vodivostní detekci

Látka	UV detektor <i>S/N</i>	CCD detektor <i>S/N</i>
H ₄ DOTA	24	58
H ₅ DO3AP ^{PrA}	10	128
H ₄ DO3AP ^{ABn}	63	77

Závěr

V rámci této práce bylo studováno chromatografické chování polykarboxylátových derivátů cyklenu. Byly vyzkoušeny čtyři typy moderních stacionárních fází: klasická reverzní fáze C8 (kolona RP Select B), aminopropylová (kolona Biospher PSI 200 NH), amidová (kolona Ascentis RP-Amide) a pentafluorofenylpropylová (kolona Discovery HS F5). Ze studovaných stacionárních fází je k separaci polykarboxylátových derivátů cyklenu vhodná pouze kolona Discovery HS F5, na které se uplatňují jak hydrofilní, tak hydrofobní interakce separovaných látek se stacionární fází. Nejlepšího výsledku separace bylo dosaženo při použití mobilní fáze o složení methanol-voda (85:15, v/v).

Bylo zjištěno, že CCD, zatím používaný převážně v kapilární zónové elektroforéze, je vhodný pro detekci nabitých látek i v RP-HPLC, kterou lze uplatnit zejména, jde-li o látky slabě absorbující v UV oblasti. Neobsahuje-li mobilní fáze kyselinu ani pufr, poskytuje CCD lepší výsledky než běžný UV detektor. Signály studovaných látek byly při použití CCD natolik zřetelné, že bylo možné identifikovat ve vzorcích nečistoty, které na záznamu pořízeném UV detektorem nebyly patrné.

Seznam symbolů a zkratek

<i>A</i>	amplituda, V
CCD	bezkontaktní vodivostní detektor
<i>f</i>	frekvence, Hz
MRI	tomografie magnetické rezonance („Magnetic Resonance Imaging“)
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi
H ₄ DOTA	kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová
H ₄ DO3AP ^{ABn}	kyselina-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová-1-{methyl[(4-amino-fenyl)methyl]fosfinová}
H ₅ DO3AP ^{PrA}	kyselina-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová-1-[methyl(2-karboxy-ethyl)fosfinová]
<i>k</i>	retenční faktor
<i>S/N</i>	poměr signálu a šumu

Autoři děkují Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt MSM 0021620857), Grantové agentuře České republiky (projekt č. 203/06/0467), Grantové agentuře Akademie věd České republiky (projekt č. KAN201110651) a mezinárodnímu projektu COST D38 za finanční podporu.

LITERATURA

1. Merbach A. E., Tóth E.: *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. John Wiley & Sons, New York 2001.
2. Caravan P., Ellison J. J., McMurry T. J., Laufer R. B.: *Chem. Rev.* 99, 2293 (1999).
3. Kubáň P., Hauser P. C.: *Electroanalysis* 16, 2009 (2004).
4. Guijt R. M., Evenhuis Ch. J., Macka M., Haddad P. R.: *Electrophoresis* 25, 4032 (2004).
5. Abad-Villar E. M., Kubáň P., Hauser P. C.: *J. Sep. Sci.* 29, 1031 (2006).
6. Šolínová V., Kašička V.: *J. Sep. Sci.* 29, 1743 (2006).
7. Kubáň P., Hauser P. C.: *J. Chromatogr., A* 1128, 97 (2006).
8. Kubáň P., Abad-Villar E. M., Hauser P. C.: *J. Chromatogr., A* 1107, 159 (2006).
9. Kafková B., Bosáková Z., Tesařová E., Suchánková J., Coufal P., Štulík K.: *Chromatographia* 56, 445 (2002).
10. Srbek J., Coufal P., Bosáková Z., Tesařová E.: *J. Sep. Sci.* 28, 1263 (2005).
11. Hoherčáková Z., Opekar F., Štulík K.: *Electroanalysis* 17, 1924 (2005).
12. Försterová M., Svobodová I., Lubal P., Táborský P., Kotek J., Hermann P., Lukeš I.: *Dalton Trans.* 5, 535 (2007).
13. Desreux J. F.: *Inorg. Chem.* 19, 1319 (1980).
14. Rudovský J., Kotek J., Hermann P., Lukeš I., Mainero V.: *Org. Biomol. Chem.* 3, 112 (2005).
15. Anderegg G., Arnaud-Neu F., Delgado R., Felcman J., Popov K.: *Pure Appl. Chem.* 77, 1445 (2005).
16. Euerby M. E., Petersson P.: *J. Chromatogr., A* 994, 13 (2003).
17. Ascah T. L., Feibush B.: *J. Chromatogr.* 506, 357 (1990).
18. Bell D. S., Jones A. D.: *J. Chromatogr., A* 1073, 99 (2005).

A. Hamplová^a, P. Coufal^a, Z. Bosáková^a, F. Opekar^a, and V. Kubíček^b (^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic, ^b Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic.): **HPLC Separation of Cyclen Polycarboxylates Using Contactless Conductivity Detection**

Polycarboxylate derivatives of cyclen are potential La (III) ion carriers for application in medicine, e.g. in magnetic resonance imaging (MRI). The compounds are prepared in multistep syntheses and hence the development of efficient separation and analytical methods for the determination of purity of the products and intermediates is desirable. This work was focused on HPLC methods suitable for the purpose. Out of the four modified stationary phases, only the pentafluorophenylpropyl modification,

offering mix-mode interactions, was found suitable. The effect of the mobile phase composition was investigated using aqueous methanol, acetonitrile and buffers of different pH. The best results were obtained with a methanol-water mixture (85:15, v/v). UV detection is unsuitable for the purpose because of its low absorption coefficients, even at short wavelengths. A new type of contactless conductivity detector provided a better sensitivity than the UV detector.