

Ciklodextrinek, mint királis szelektorok alkalmazása a CE-ben

Varga Erzsébet¹, Iványi Róbert¹

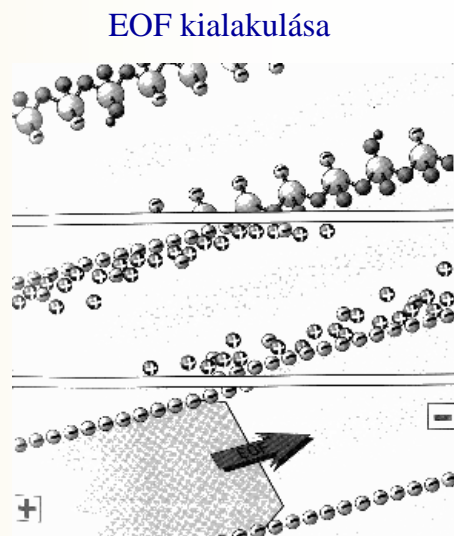
¹CycloLab R&D. Lab., H-1097, Budapest, Illatos út 7.

Elektroforézis történeti fejlődése

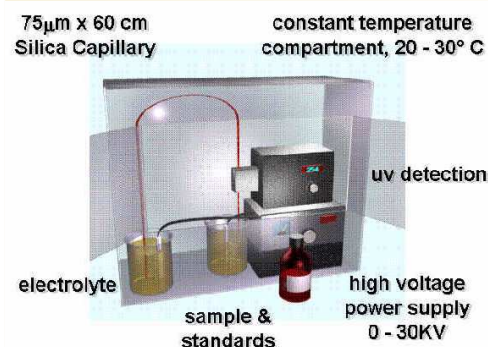
- 1925-1930 Tiselius (1948 kémiai Nóbeldíj) : folyadék fázisú elektroforézis készülék fehérjék elválasztására
- 1950-1960: - szintetikus polimerek (poliakrilamid) gélek bevezetése
 - készülékek, segédberendezések fejlesztése
- 1980: elérhetővé válnak a kis átmérőjű kvarckapillárisok → Jorgenson és Lukacs elkészítik az első kapilláris elektroforézis készüléket
- 1990: kapilláris elektroforézis (elektrokromatográfiás) módszerek fejlesztése

Kapilláris elektroforetikus módszer I.

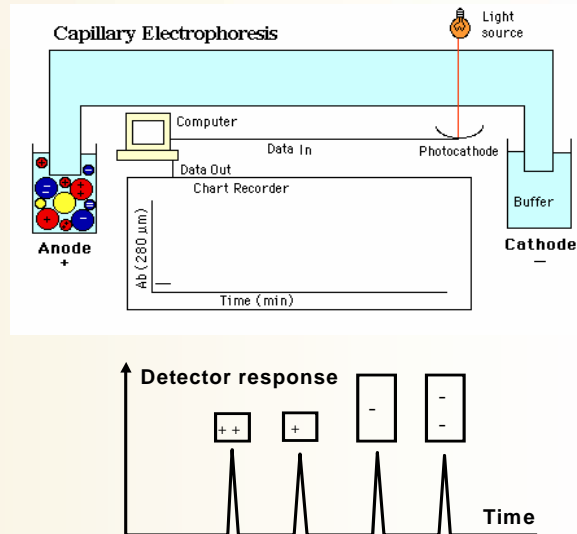
- elektromos térben az oldott anyagok különböző sebességgel vándorolnak (q/m)
- vékony (25-75 μ m) kapilláris
- elektroosmotikus áramlás (EOF) jelenlétében
- elektroosmotikus áramlás (EOF) lehetővé teszi anionok és kationok egyidejű meghatározását



CE készülék vázlatos felépítése



Kapilláris elektroforetikus módszer II.

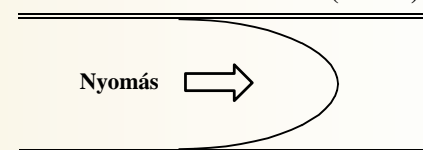


Áramlási profil: CE vs. HPLC

Az áramlási profil keresztmetszete Elektroosztatikus Áramlás (CE)



Az áramlási profil keresztmetszete Hidrodinamikusan Áramlás (HPLC)



Elektroforézisen alapuló eljárások összefoglalása

Módszer	Kapilláris	Az elválasztás alapja	Alkalmazási lehetőségek
Kapilláris zónaelektroforézis (CZE)	módosított / nem módosított	ionmozgékonyosság	sokrétű alkalmazás
Micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC)	nem módosított	az elektrolit és a micellák közötti megoszlás	sokrétű alkalmazás
Kapilláris gélelektroforézis (CGE)	módosított és töltött	a részecskék elektroforetikus vándorlása és a közeg molekulaszűrő hatása	fehérjék molekulaméret szerinti elválasztása
Kapilláris izoelektromos fókuszálás (CIEF)	módosított / nem módosított	izoelektromos pont	amfoter sajátságú anyagok elválasztása
Kapilláris izotachoforézis (CITP)	nem módosított	ionmozgékonyosság	híg oldatok dúsítása a CZE-t megelőzően
Kapilláris elektrokromatográfia (CEC)	töltött kapillárisok	elsősorban az állófázissal történő kölcsönhatások	általában megegyezik a HPLC-nél ismertekkel

A kapilláris elektroforézis analitikai kémiai alkalmazásai

Kisméretű ionok:

- Szervetlen anionok és kationok
- Szerves anionok és kationok
- Alkohokok, fenolok, szénhidrátok
- Aminosavak, peptidek, oligopeptidek
- Nukleozidok, nukleotidok
- Vitaminok, toxinok
- Növényvédőszer, gyógyszerhatóanyagok

Nagyméretű ionok:

- Fehérjék
- Nukleinsavak és fragmentjeik
- Vírusok és sejtek
- Nanorészecskék



The Cyclodextrin Company

Kapilláris elektroforézis

- nagy felbontóképesség ($N > 10^5 - 10^6$)
- rövid analízis idő (ált. 30', de akár 5' alatt)
- széles körben változtatható paraméterek (pH, c(puffer, adalékok), ionerősség, T, U)
- gyors módszerfejlesztés (kond.: 2-10')
- egyszerű mintaelőkészítés
- kicsiny mintaigény (injektálva 1-50 nl)
- hidrodinamikusan és elektrokinetikus injektálás
- vizes vagy nemvizes puffer
- magas szintű automatizáltság (replenishment)
- UV detektálás kapillárisban (v. indirekt, F, LIF, Amp., Vez.kép., MS.)

**Gyors,
Egyszerű,
Olcsó**



The Cyclodextrin Company

Királis kapilláris elektroforézis (vagy elektrokinetikus kromatográfia)

- Gyors, egyszerű és olcsó analitikai módszer.
- Királis szelektorok: ciklodextrinek, koronaéterek, makrociklusos antibiotikumok, fehérjék, micellák
- A ciklodextrinek és származékaik a leggyakrabban alkalmazott királis puffer adalékok.
- Több mint 1300 publikáció alkalmaz ciklodextrinokat kapilláris elektroforézisben (utóbbi 15-20 év).
- Nagy és növekvő számú KIRÁLIS SZELEKTOROK
- Enantiomerarány és királis nyomszennyezés meghatározás
- Enantiomersorrend megváltoztatás



The Cyclodextrin Company

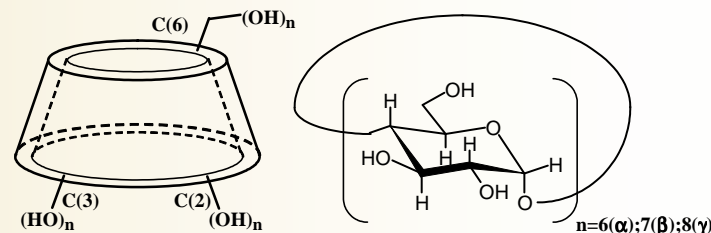
A királis kapilláris elektroforézis alkalmazási területei

- Enantiomerek elválasztása fontos különböző biológiai aktivitásuk miatt
- Az enantiomerek szelektív elválasztására folyamatosan növekszik az igény a tudomány és az ipar területén:
 - természetes királis anyagok analitikája
 - enantioszelektív szintézisek analitikája
 - gyógyszerhatóanyagok (pl. profének, béta-blokkerek)
 - farmakokinetikai vizsgálatok
 - agrokémiai anyagok (pl. herbicidek)



The Cyclodextrin Company

Ciklodextrinek, mint királis szelektorok



- ciklikus, nem-redukáló oligoszacharidok
- α -, β - ill. γ CD-eket különböztetünk meg
- molekula két peremének hidofil jellege miatt a CD-k jól oldódnak vízben (kivéve a β CD)

Ciklodextrinek és CD származékok csoportosítása

Ciklodextrin töltése	Elválasztható enantiomer	Ciklodextrin származékok
semleges	ionos	α -, β -, γ -CD, acetilezett, DIMEB, TRIMEB
negatív	ionos és semleges	karboxi-alkil, szulfatált, foszfátált
pozitív	ionos és semleges	amino: pri., szek., terc., kvat.

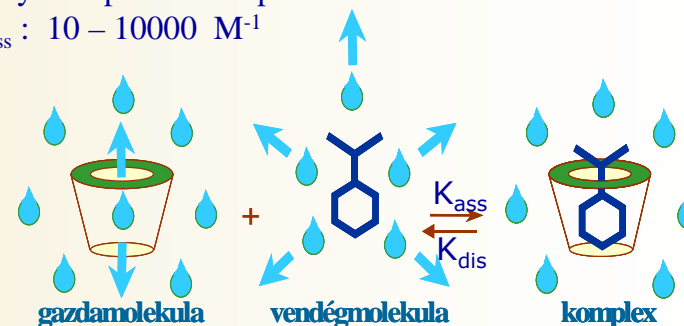
A származékolás célja:

- a stabilitási állandó megváltoztatása
- a „belső” szelektivitás növelése
- a mozgékony-ság-különbség növelése a szabad és komplexált formák között

Zárványkomplex-képzés

➤ ciklodextrinek általában 1:1 arányú (diasztereomer!) zárvány-komplexekeket képeznek

➤ $K_{ass} : 10 - 10000 \text{ M}^{-1}$



K_{ass} : asszociációs állandó
 K_{dis} : disszociációs állandó

A királis elválasztás követelményei

Kiindulás: $\mu_R = \mu_S = \mu_{free}$

CD típusú szelektor hozzáadásával a mozgékony-ság-különbség:

$$\Delta\mu = \mu_R^{eff} - \mu_S^{eff} = \frac{[CD](\mu_{free} - \mu_{cplx})(K_S - K_R)}{1 + [CD](K_R + K_S) + K_R K_S [CD]^2}$$

Két feltételnek kell teljesülnie:

- legalább az egyik enantiomer esetén legyen:
 $\mu_{free} \neq \mu_{cplx}$
- a komplex-stabilitási állandók különbözzenek:
 $K_S \neq K_R$

$m_{R,S,free}$: nem komplexált enantiomerek mozgékony-sága

m_{cplx} : komplexált enantiomer mozgékony-sága

$m_{R,S}^{eff}$: enantiomerek effektív mozgékony-sága

K_S, K_R : enantiomerek stabilitási állandói

Látszólagos komplex-stabilitási állandók meghatározása

$$\mu_{eff}^i = \frac{\mu_{free} + \mu_{cplx} K[CD]}{1 + K[CD]}$$

Linearizáció (x-reciprok módszer):

$$\frac{(\mu_{eff}^i - \mu_{free})}{[CD]} = -K(\mu_{eff}^i - \mu_{free}) + K(\mu_{cplx} - \mu_{free})$$

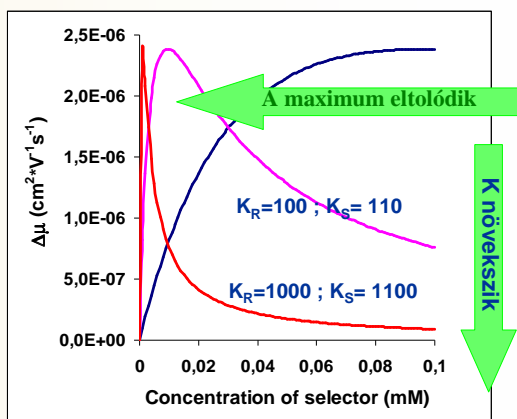
Ábrázolás:

$$\frac{(\mu_{eff}^i - \mu_{free})}{[CD]} \quad \text{versus} \quad (\mu_{eff}^i - \mu_{free})$$

A Wren-féle mozgékony-ság-különbség elmélet

$$[CD]_{\Delta\mu}^{opt} = \frac{1}{\sqrt{K_R K_S}}$$

K_{ass}	$[CD]^{opt}$
1000 M ⁻¹	1 mM
100 M ⁻¹	10 mM
10 M ⁻¹	100 mM



Wren S.A.C. és Rowe R.C.:
J. Chromatogr. 603 (1992) 235-241.

Stratégia

pH kiválasztása:

- bázis: pH 2.5 – 3
- sav: pH > pK_a
- semleges: pH 2.5, 7.2, 9.2

Egyféle CD-t tartalmazó rendszerek:

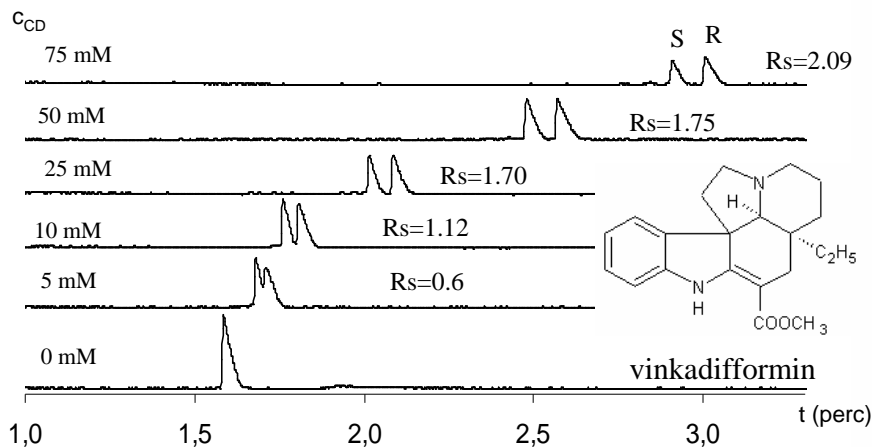
- a három natív CD (α, β és γ) négy-négy koncentráció pontban (üregméret kölcsönhatás vizsgálatok)
- a látszólagos stabilitási állandók meghatározása néhány új koncentráció pontban (ha szükséges)
- semleges CD származékok (HP, acetil, metil)
1-3 koncentráció pontban
- ionizálható CD származékok (CM, amino, szulfát stb.)
1-3 konc. pontban

Optimalizálás (pH, konc., puffer, hőmérséklet stb.)

CD-ek kombinálása (dual rendszerek) vagy másik pH-án előlről

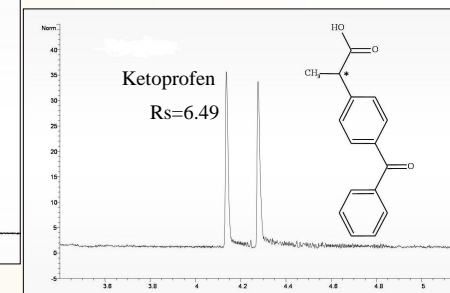
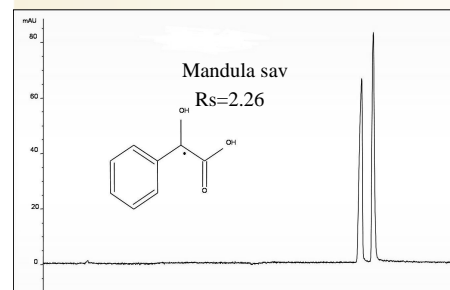
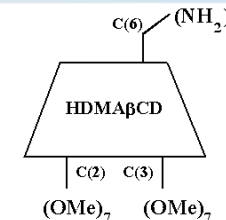
Semleges ciklodextrin, mint királis szelektor

pH=2,5 (15 mM foszfát puffer)

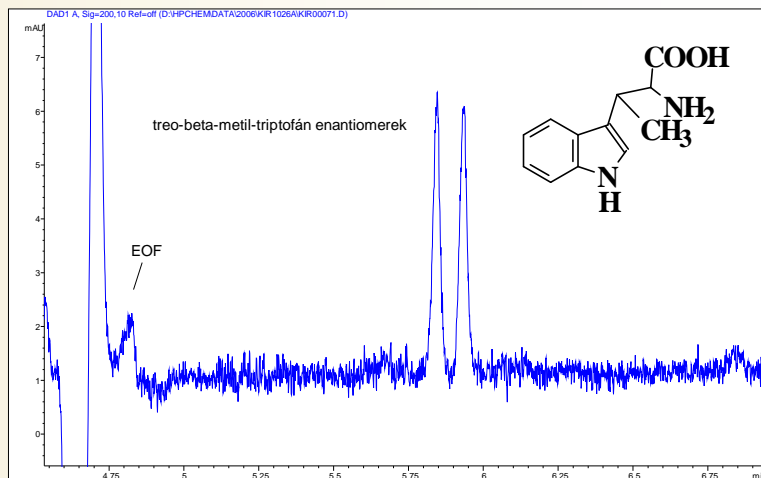


Kationos ciklodextrin, mint királis szelektor

40 mM bórsav, 40 mM ecetsav és
40 mM foszforsav puffer
1:2:2 arányban (Britton-Robinson) pH=5
5 mM HDMAβCD
(heptakis(2,3-dimethyl-6-amino-6-deoxy)-β-cyclodextrin)



75 mM bórsav pH=9.0 30 mM CE β CD



semleges+ionos ciklodextrin együttes alkalmazása

