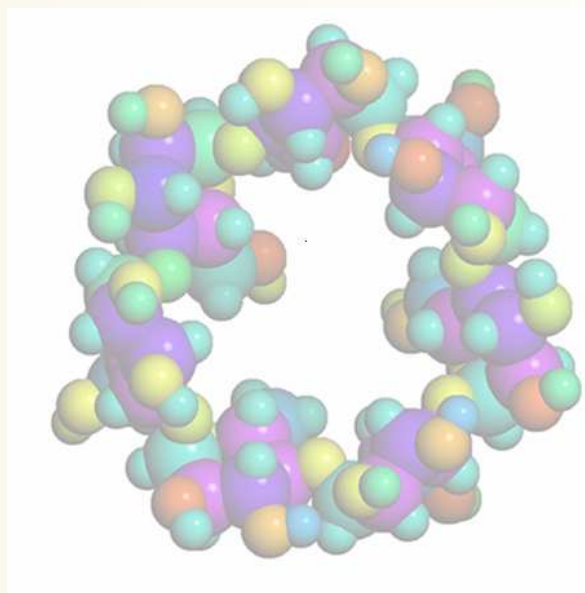




Ciklodextrinek alkalmazása folyadékkromatográfiás módszerekben



Dr. Szemán Julianna

Cyclolab Ciklodextrin Kutató-Fejlesztő Laboratórium Kft.

1097. Budapest, Illatos u. 7. cyclolab@cyclolab.hu

www.cyclolab.hu



A ciklodextrinek szerepe

- ✧ Befolyásolja a szelektivitást
- ✧ Királis felismerőképesség
- ✧ Ciklodextrinek alkalmazása az eluensben
- ✧ Ciklodextrin tartalmú folyadékkromatográfiás állófázisok



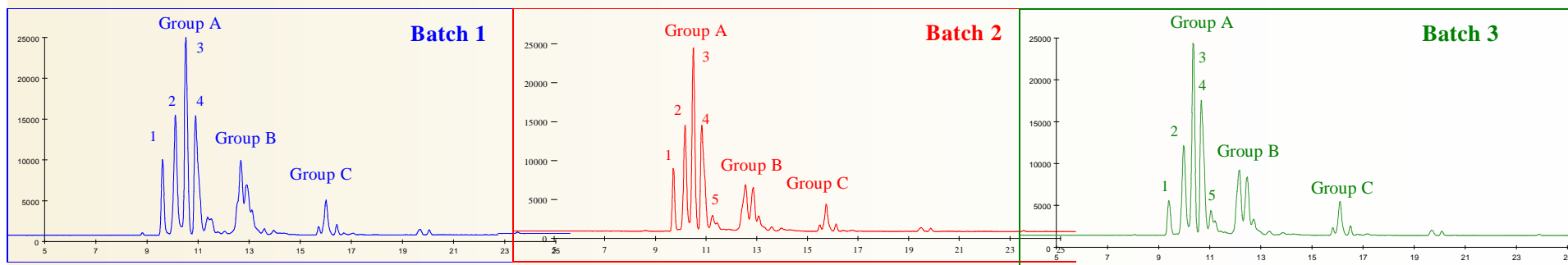
A ciklodextrin kiválasztása

- ❖ Oldhatóság – alap CD-nél probléma
- ❖ Elválasztandó anyag – molekulaméret, funkciós csoportok
Single isomer vagy statisztikusan szubsztituált
- ❖ Ár

Statisztikusan szubsztituált származékok

- ❖ A homológok/izomerek száma rendkívül nagy
- ❖ Jellemzők: szubsztitúció fok (DS) és a szubsztituensek eloszlása
- ❖ A batch-to-batch reprodukálhatóság rendkívül fontos.

CMBCD batch-to-batch reprodukálhatósága





The Cyclodextrin Company

Ciklodextrinek alkalmazása az eluensben

Az állófázis kiválasztása



- ➔ Fordított fázisú töltet, vizes eluens
- ➔ Függ az elválasztandó anyagtól
- ➔ k : 10-15 MeOH-víz < 50%
- ➔ RP állófázisok: C18, C8, C4, CN
- ➔ Töltet típustól is függ (C tartalom, end-cap)

P. Zarzycki et al. J. Chromatogr. A 955 (2002) 71-78

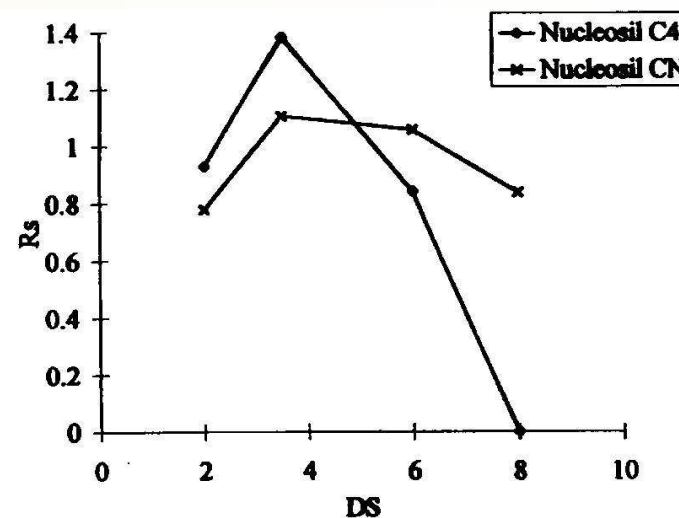


Fig. 5. Resolution of AMEBD enantiomers on different HPLC columns as a function of degree of substitution. Mobile phase, 5 mg/ml aqueous CMBCD (DS 3.5) solution-ethanol (95:5, v/v); pH = 5.5.

J. Szemán et al. J. Chromatogr. A 728 (1996) 423



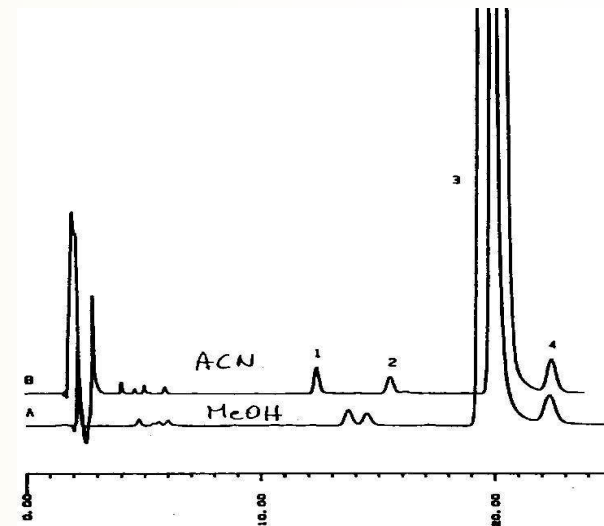
Puffer hatása

- ☞ pH
- ☞ ionerősség
- ☞ puffer kation-anion
- ☞ ionpárképzés és komplexképzés

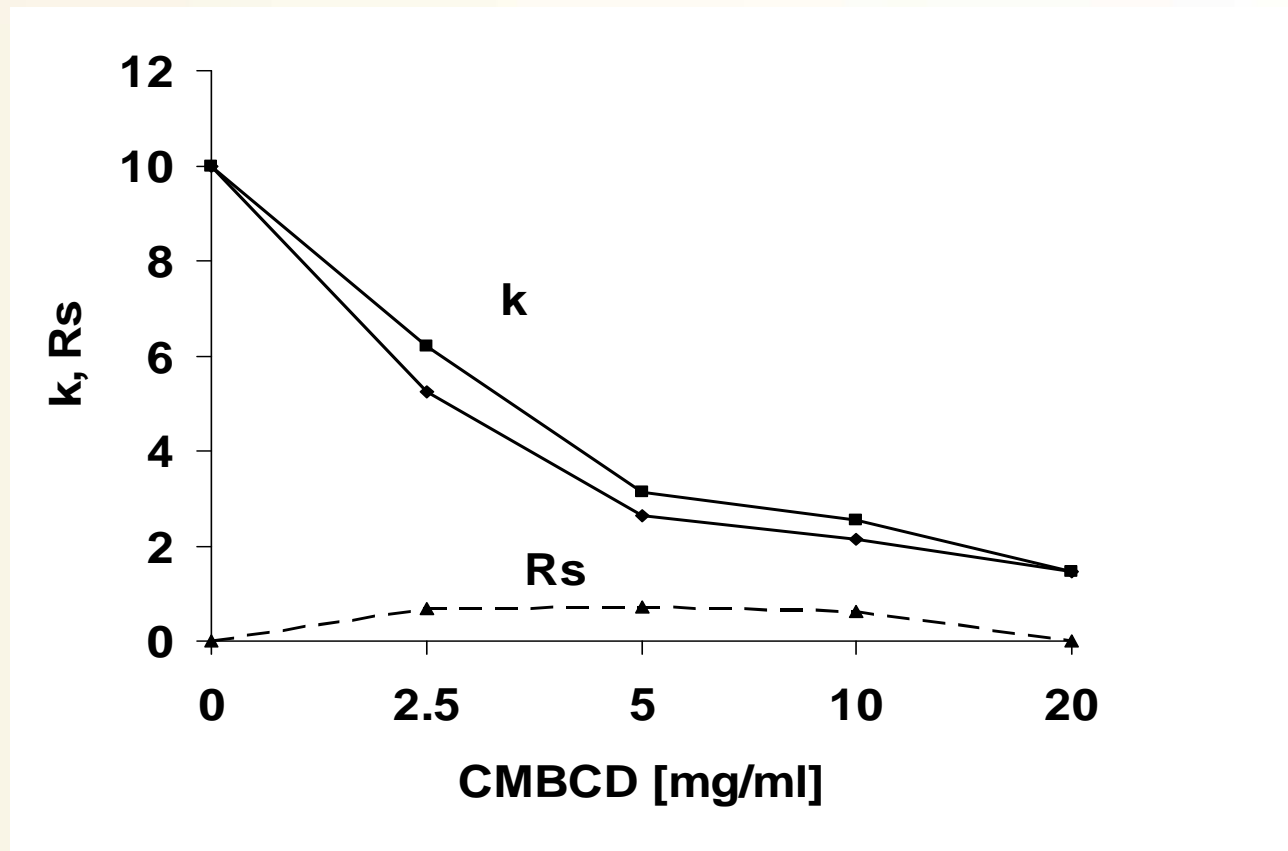
Szerves oldószer hatása

MeOH, EtOH, IPA, ACN, (THF)

- ☞ a komplex stabilitási állandóra
- ☞ solute - állófázis kölcsönhatásra



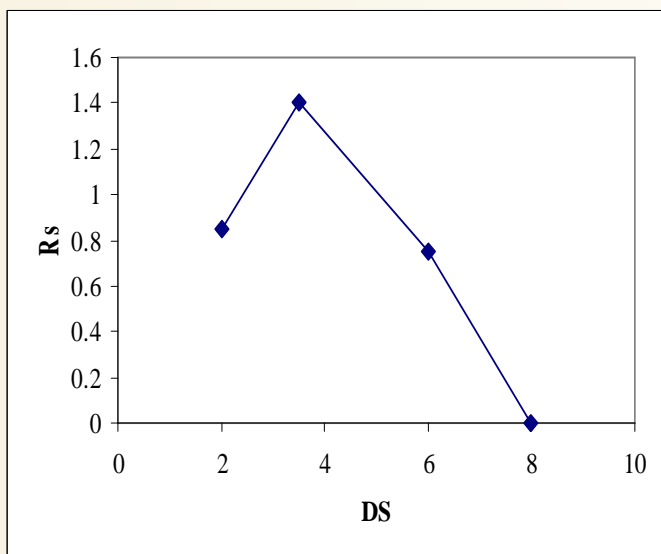
*Norgestrel elválasztás, szelektivitás változás a szennyezőkre is!
M. Gazdag et al. J. Chromatogr. 450 (1988) 145*



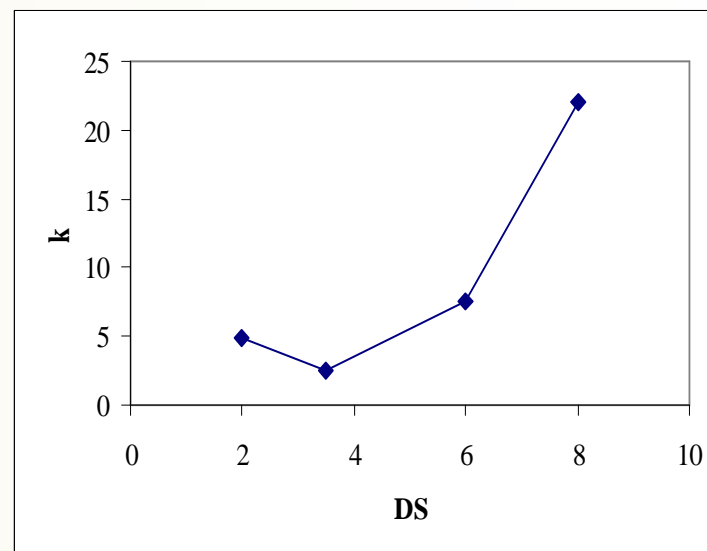
Aminoetil-benzodioxán származék elválasztása karboximetil-BCD-vel



R_s



k



Aminoetil-benzodioxán származék elválasztása karboximetil-BCD-vel



Ciklodextrinek alkalmazása az eluensben

CD keverékek használata



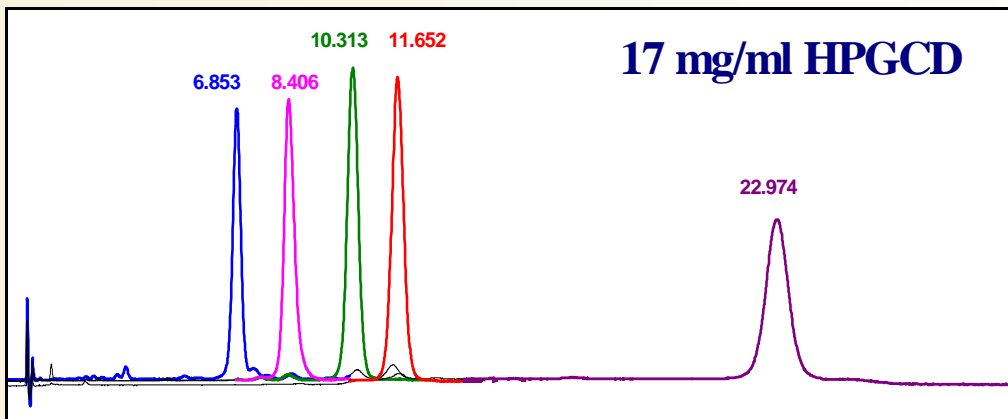
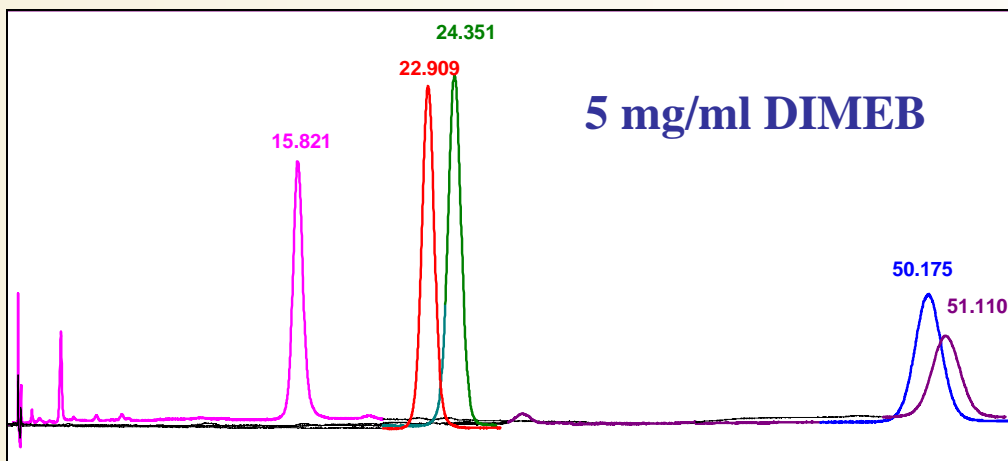
Különböző szelektivitású CD származékok együttes használata (CE-ben elterjedt)

- ❖ HPLC: barbiturát enantiomerek elválasztása α CD és permetilezett-BCD (TRIMEB) keverékkel
- ❖ TRIMEB szerepe az állófázis módosítása: csökken a retenció, kevesebb oldószer kell, ezért jobb az enantiomer elválasztás

R. Nowakovski et al. J. Chromatogr. A, 782, 1-11, 1997



Szelektivitás növelése nem királis anyagoknál



FLN: Flunisolide

BRFLN: Bromoflunisolide

FLNAL: Flunisolide alcohol

DS: Desonide

CLDS: Chlorodesonide



The Cyclodextrin Company

Ciklodextrinek alkalmazása az eluensben

Gyógyszerkönyvi példa

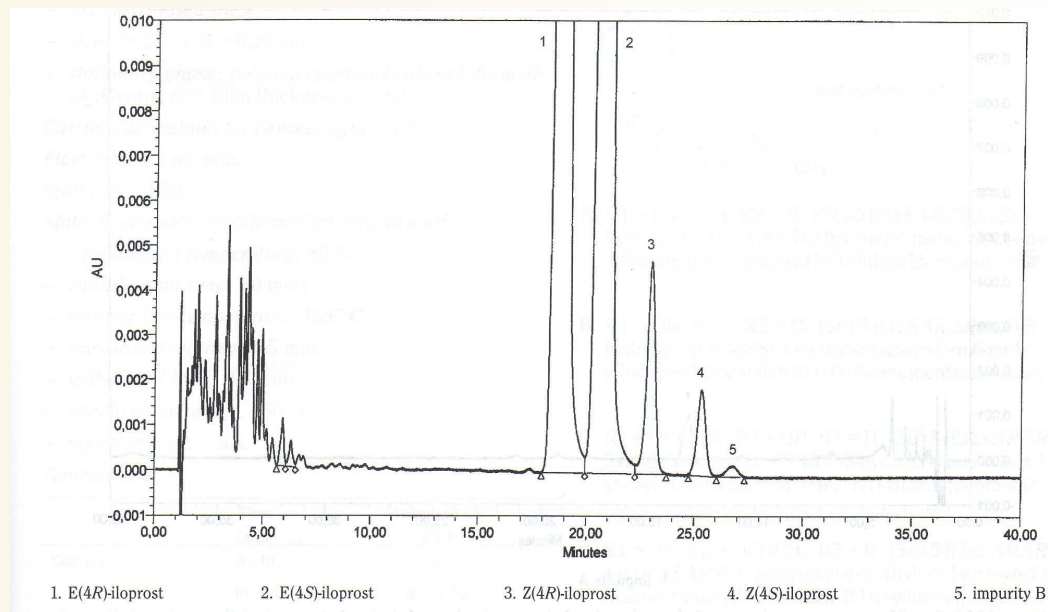


Pharmeuropa 20.1 (2008. január)

Iloprost, Polar related substances

Mobile phase: mix 330 ml of acetonitrile R1 and 670 ml of a 12 g/l solution of β -cyclodextrin R adjusted to pH 2.0 with phosphoric acid R.

Opálos eluens, kiválás





Előnyök

- A szelektor minősége és koncentrációja könnyen változtatható
- Olcsó oszlopok ill. olcsó adalékok használhatók

Hátrányok

- A szelektor zavarhatja a detektálást (UV, MS)
- A szelektor igény viszonylag nagy
- (A szelektor minősége változó lehet)



The Cyclodextrin Company

Ciklodextrin tartalmú állófázisok



Ciklodextrin tartalmú állófázisok

- a kereskedelemben
- az irodalomban leírt

Ajánlott irodalom:

- Chiral Separations, Methods and Protocols;
G. Gübitz és M.G. Schmid
- CYCLOBOND handbook
<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/chiral/cyclobond.html>
- www.cyclodextrin.net (Armstrong cikkek)



Fordított fázisú elválasztás

- ugyanazok az optimalizációs paraméterek érvényesek, mint az eluensben használt (oldószer, puffer , pH, ionerősség, hőmérséklet)

Polar-organikus mód

- Acetonitril/metanol/ecetsav/trietilamin mozgófázis

Normál fázisú elválasztás

- Hexan/Ipa, EtOH



Saját fejlesztésű királis állófázisok (Natursep)

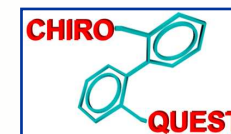
Az állófázis előállítás szempontjai

- a szelektor minősége
- a szilikagélhez kötés módja
- a szilikagél minősége
- a szabad szilanolok mennyisége

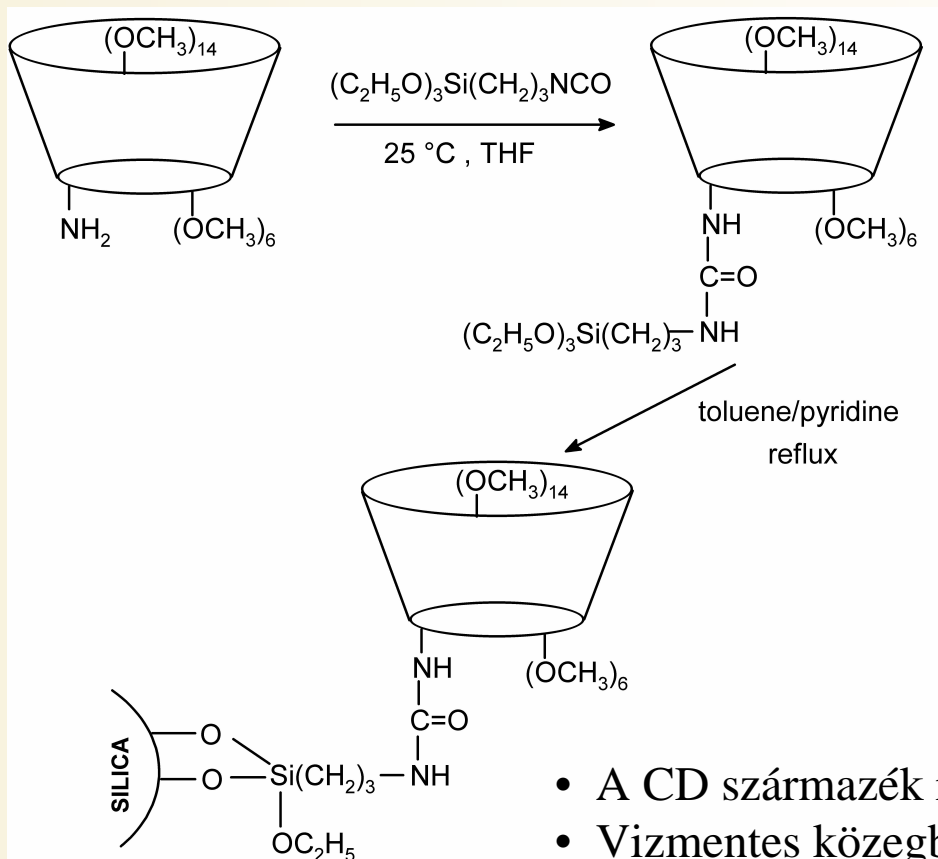
Mono-szubsztituált CD-származék immobilizálásának előnyei:

A jól definiált, izomertiszta származékolószerezrel

- homogén felület
- monomer borítottság (víz kizárásával történik) érhető el



Az állófázis előállítása

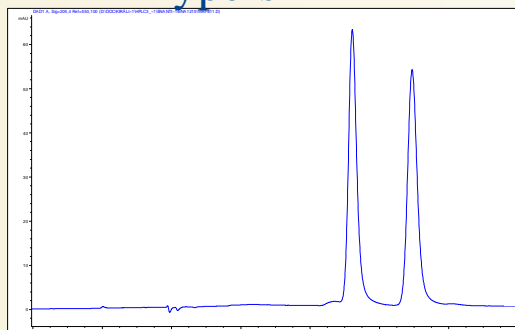


- A CD származék reakciója trietoxi-szilil-propil-izocianát
- Vizmentes közegben kötés a szilikagélhez
- Szabad szilanolok: trimetil szilil endcap
- Az állófázis minőségének ellenőrzése (NMR)

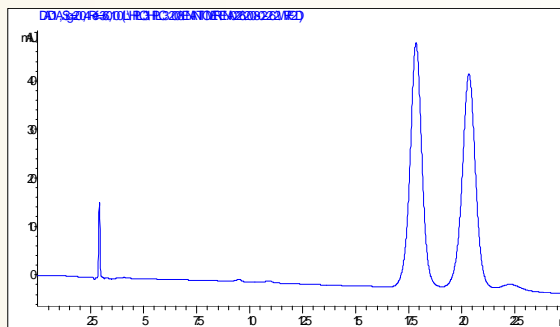
A szilikagél minőségének hatása – Királis teszt - warfarin

Metanol : TEAPbuffer (pH3) = 35:65 ill *54,5% MeOH

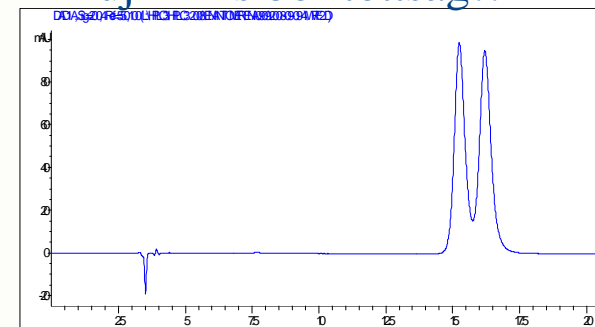
Hypersil



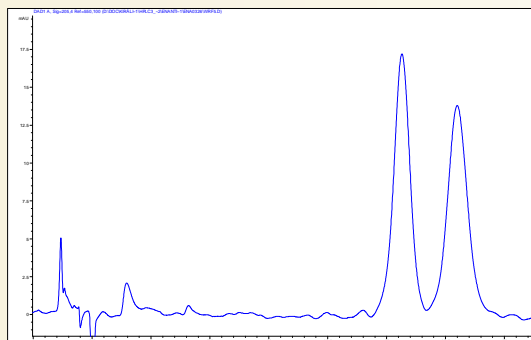
Exsil



Fuji – kis boritottság!!



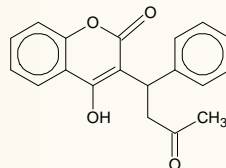
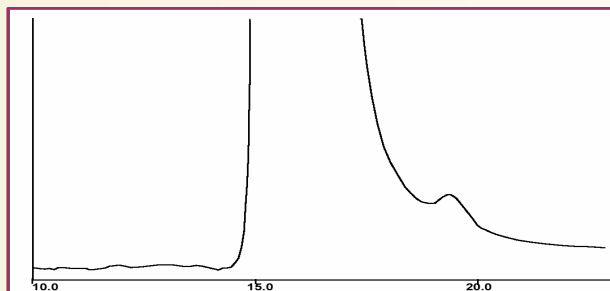
MN



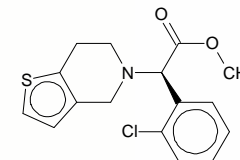
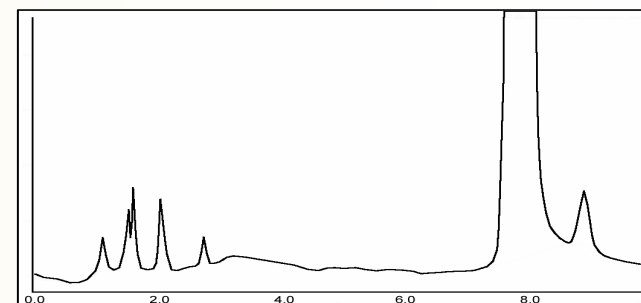
	t_R	R_s	α	N
Hypersil	9,2	3,7	1,19	30 000
Exsil	17,8	2,4	1,14	21 000
Fuji	15,2	1,3	1,06	28 000
Macherey-N.	15,7*	1,7	1,15	11 000

Analitikai elválasztások PMMBCD oszlopon

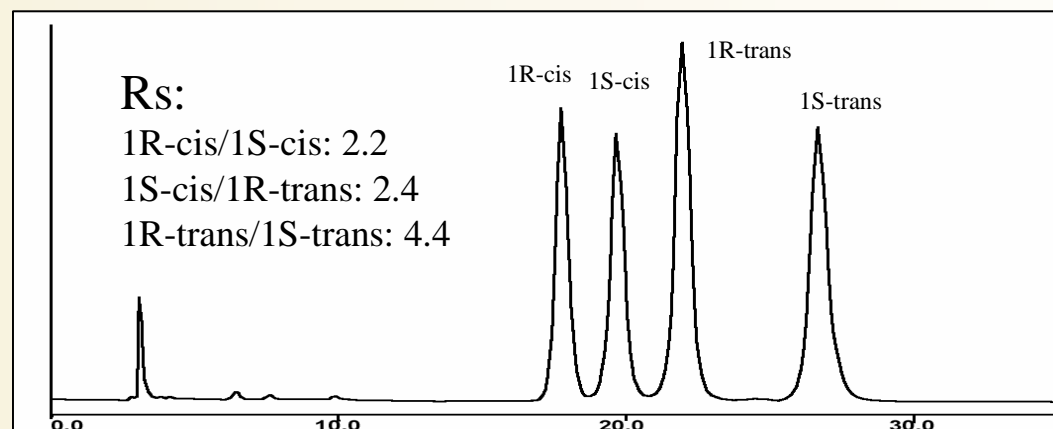
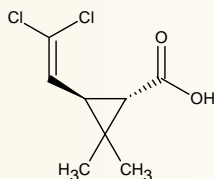
Warfarin 0.1% R szennyezés



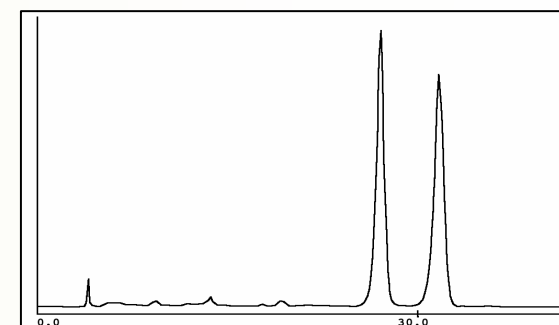
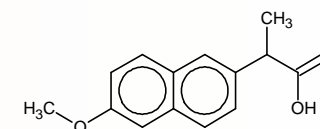
Clopidogrel
0.5% R szennyezés



Permetrinsav



Naproxen



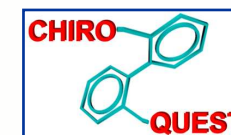
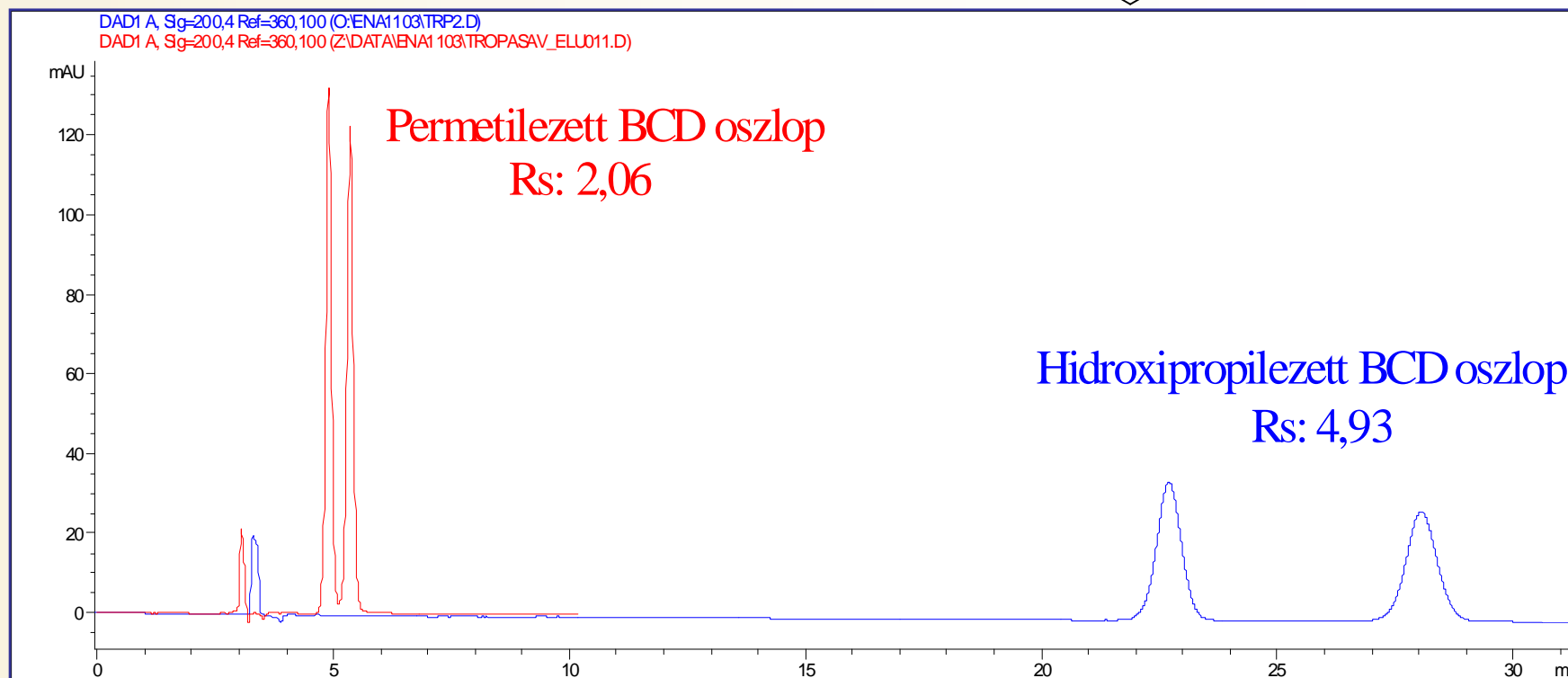
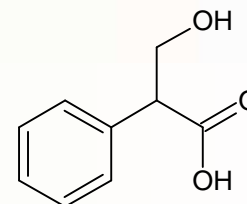


The Cyclodextrin Company

Permetilezett és hidroxipropilezett BCD-s állófázisok összehasonlítása



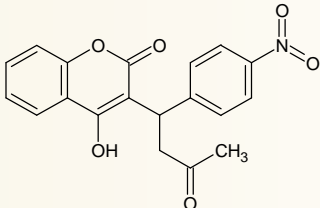
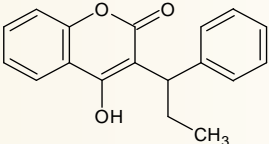
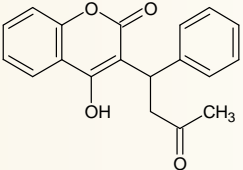
Tropa sav





Különböző CD-s állófázisok elválasztóképességének összehasonlítása

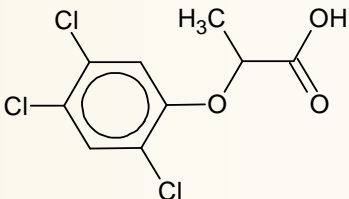
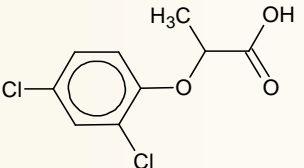
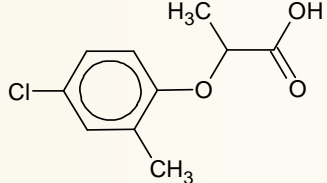
KUMARINOK

Anyag		BCD	HPBCD	PMBCD	CMBCD
Acenokumarol		0.75	0.83	2.14	0.62
Fenprokumon		1.13	1.04	0.78	1.61
Warfarin		0.46	1.47	2.94	0.50

0.1 % TEA-foszfát puffer, pH: 3,5 – metanol, 0,7 ml/perc, 25 °C

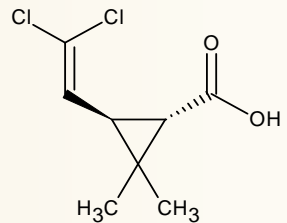
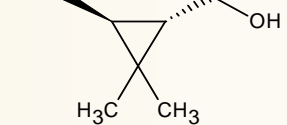
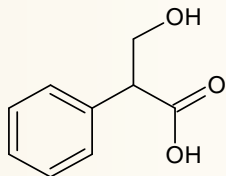
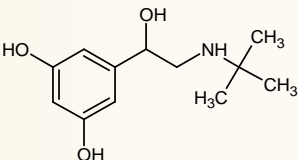
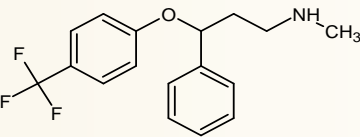


Különböző CD-s állófázisok elválasztóképességének összehasonlítása

Anyag	Képlet	BCD	HPBCD	PMBCD	CMBCD
Fenoprop		0.00	0.00	2.37	0.00
2,4-DP		0.87	0.63	0.50	0.00
Mecoprop		1.09	0.48	1.40	0.00

0.1 % TEA-foszfát puffer, pH: 3,5 – metanol, 0,7 ml/perc, 25 °C

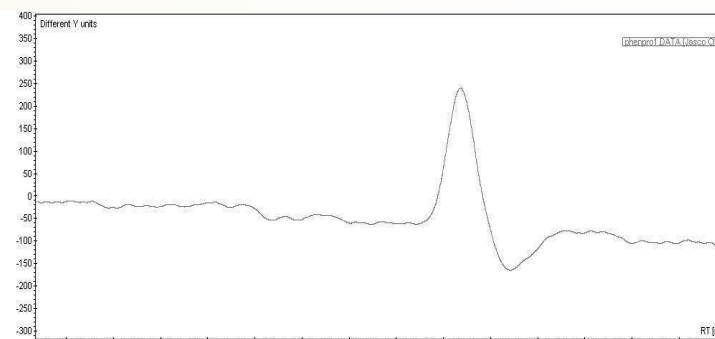
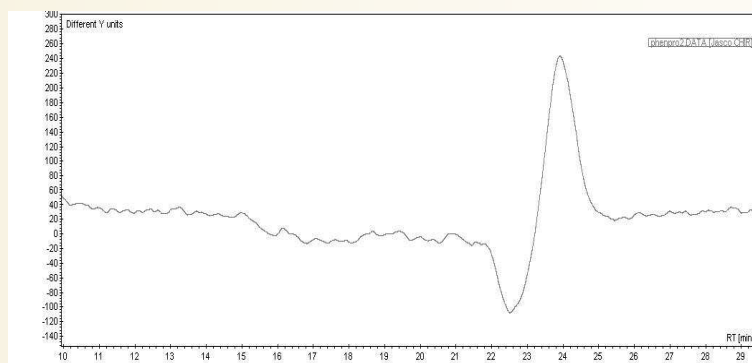
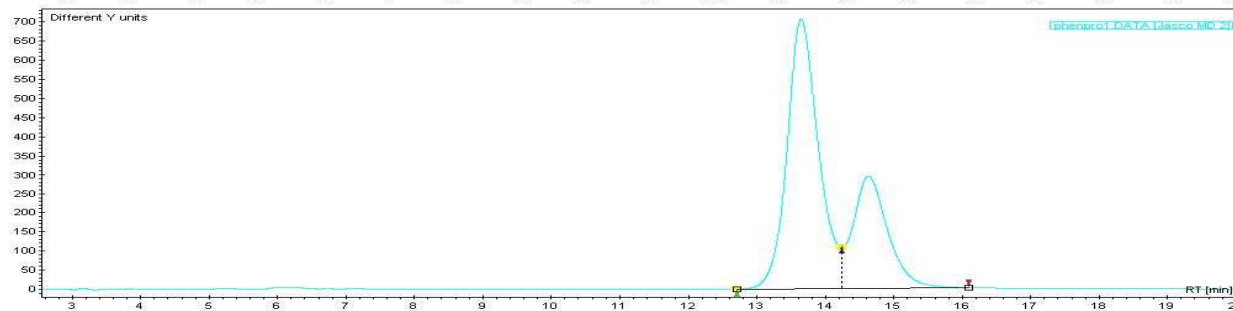
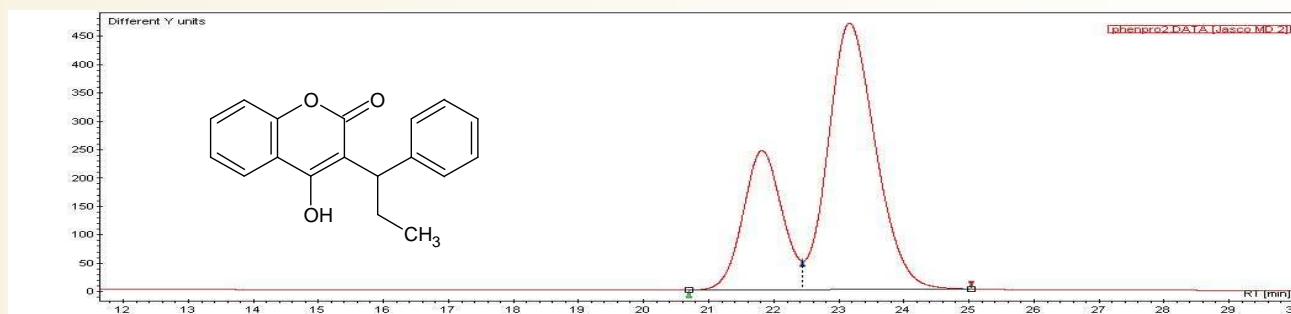
Különböző CD-s állófázisok elválasztóképességének összehasonlítása

Anyag	Képlet	BCD	HPBCD	PMBCD	CMBCD
Cisz-permetrinsav		0.00	1.21	2.33	0.00
Transz-permetrinsav		1.21	0.76	4.66	0.00
Tropasav		0.61	4.18	2.06	n.a.
Terbutalin		1.78	2.54	0.00	1.90
Fluoxetin		1.39	1.80	2.33	n.a.

0.1 % TEA-foszfát puffer, pH: 3,5 – metanol, 0,7 ml/perc, 25 °C

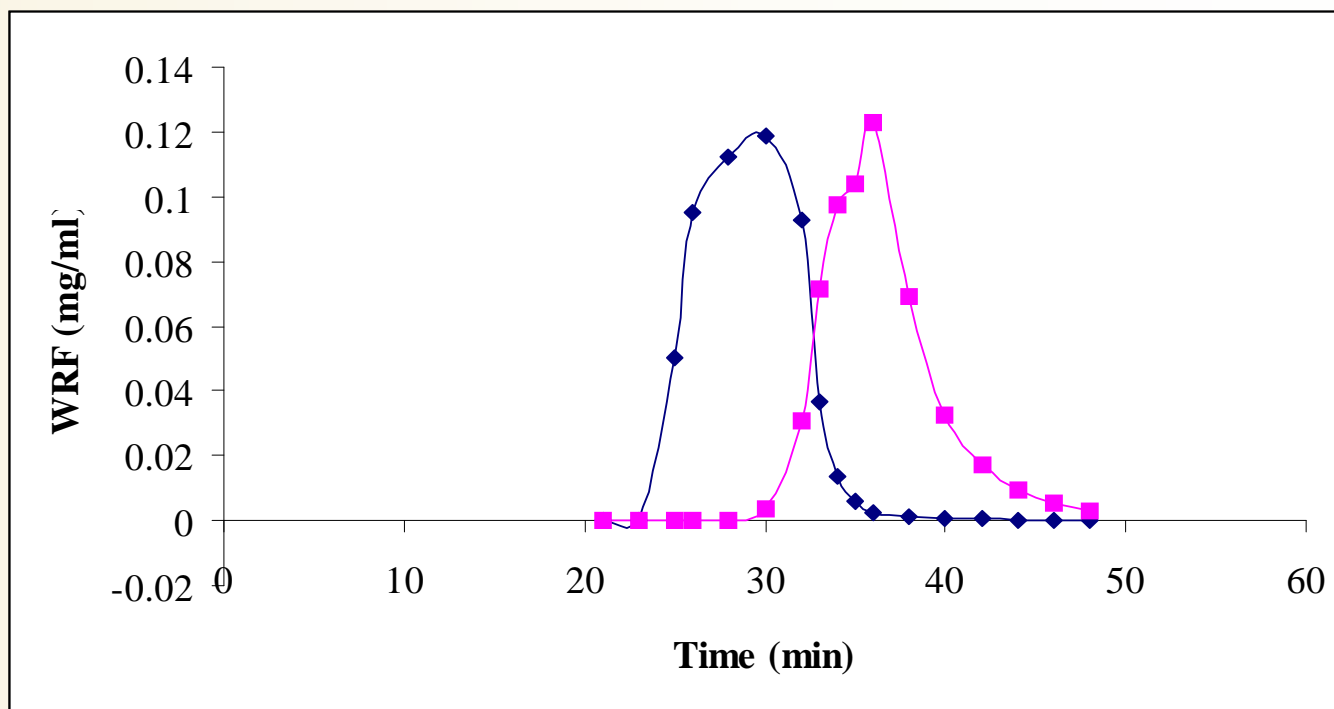
Különböző CD-s állófázisok elválasztóképességének összehasonlítása

Phenprocoumon enantiomerek (R>S) fordított elúciója BCD és PMBCD oszlopokon, UV és polarimetriás detektálással.





Szemipreparatív elválasztás Warfarin 1 mg



1R : 0.52 mg Purity: 95.2%

1S : 0.42 mg Purity: 95.2%

