



Ciklodextrin komplexképzésen alapuló királis elválasztás vizsgálata kapilláris elektroforézissel

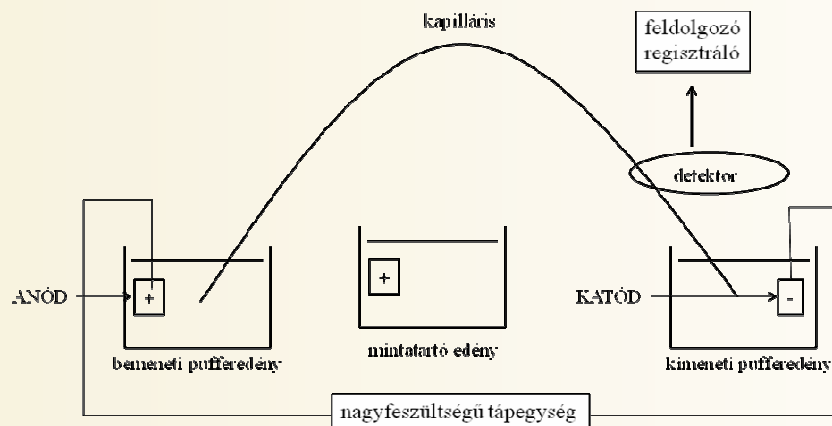
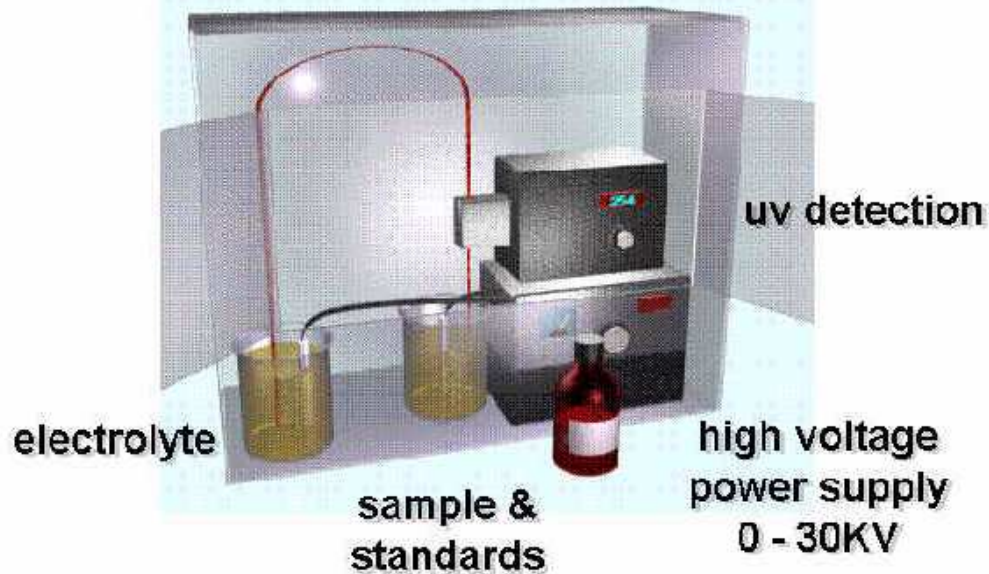
Sohajda Tamás

*Cyclolab Ciklodextrin Kutató-Fejlesztő Laboratórium Kft.
1097. Budapest, Illatos u. 7. cyclolab@cyclolab.hu
www.cyclolab.hu*

CE készülék vázlatos felépítése

75 μ m x 60 cm
Silica Capillary

constant temperature
compartment, 20 - 30° C

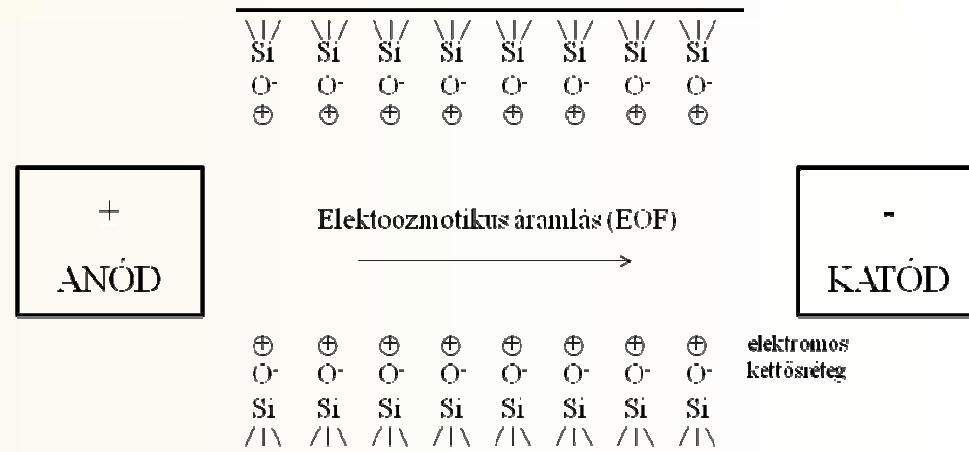




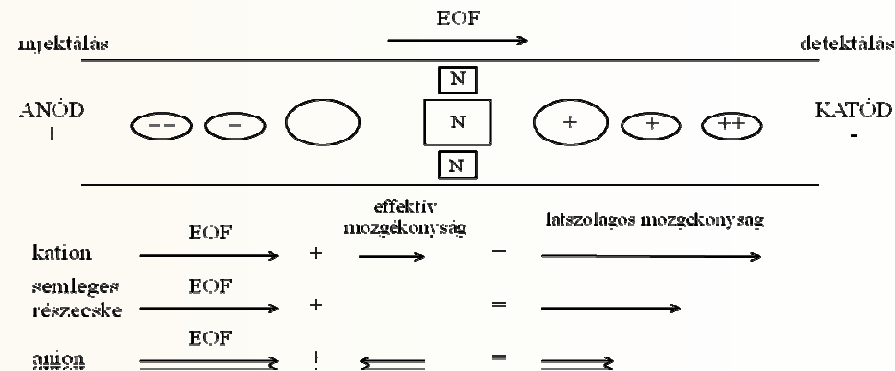
Az EOF és a látszólagos mozgékonyaság



EOF kialakulása



A látszólagos mozgékonyaság



$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{l_d}{t_m \cdot E} = \frac{l_d \cdot l_t}{t_m \cdot U}$$

$$\mu_{eff} = \frac{l_d \cdot l_t}{U} \cdot \left(\frac{1}{t} - \frac{1}{t_{EOF}} \right)$$



The Cyclodextrin Company

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



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)
- hidrodinamikus 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*



A kapilláris elektroforézis analitikai kémiai alkalmazásai

Kisméretű ionok:

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

Nagyméretű ionok:

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



- Gyors, egyszerű és olcsó analitikai módszer
- Királis szelektorok: ciklodextrinek, koronaéterek, makrociklusos antibiotikumok, fehérjék, micellák - számuk egyre növekszik
- A ciklodextrinek és származékaik a leggyakrabban alkalmazott királis puffer adalékok.
- Több mint 4000 publikáció alkalmaz ciklodextrineket kapilláris elektroforézisben (utóbbi 15-20 év).
- Enantiomerarány és királis nyomszennyezés meghatározás
- Enantiomer sorrend megváltoztatás



A királis kapilláris elektroforézis alkalmazási területei I.

- 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-blokkolók, stb.)
 - farmakokinetikai vizsgálatok
 - agrokémiai anyagok (pl. herbicidek)



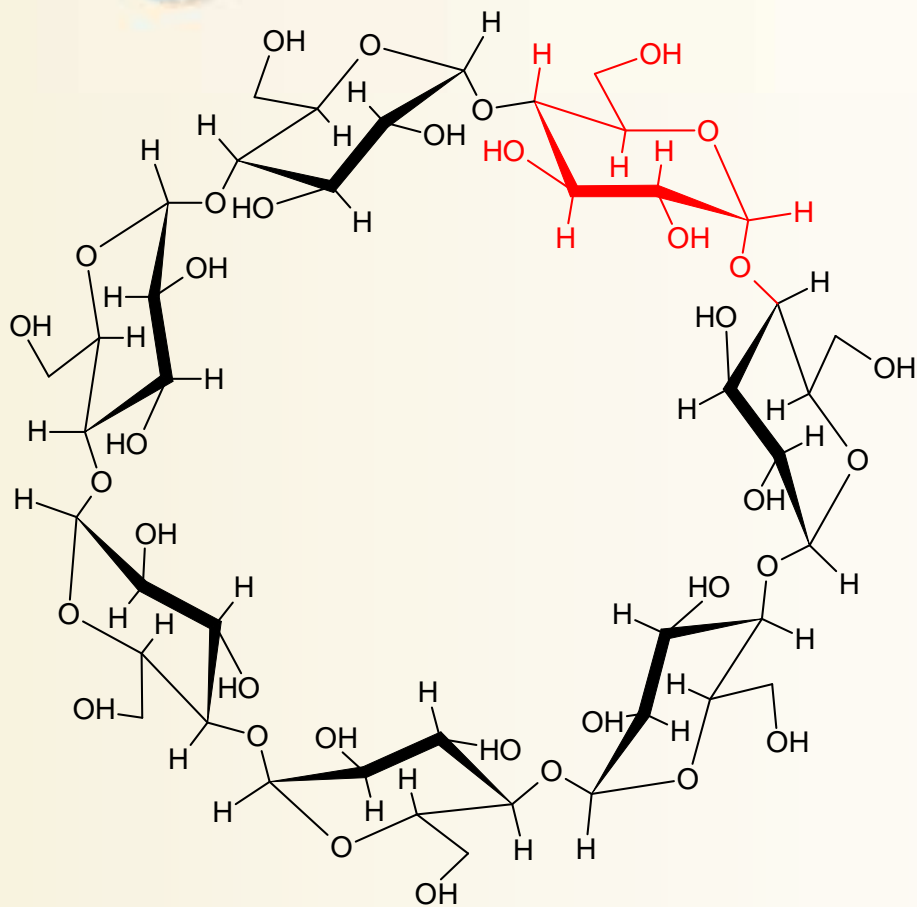
A királis kapilláris elektroforézis alkalmazási területei II.

- Enantiomerek elválasztása egyéb ipar- és tudományterületeken:
 - Kozmetikai ipar (illatszerek, parfümök)
 - Élelmiszeripar (bakteriális fertőzések)
 - Környezetvédelem (szennyezések biodegradációja)
 - Régészet (kormeghatározás)
 - Űrkutatás (Murchison meteorit, MOD I-II-II)



Murchison meteorit

Ciklodextrinek, mint királis szelektorok



β -ciklodextrin

- Apoláros üreg
- Zárványkomplex képzés
- Felhasználás

oldékonyság (+)

stabilitás (+)/(-)

biohasznosíthatóság (+)

peptidaggregáció (-)

mellékhatás, irritáció (-)

királis szelektor (+)

Ciklodextrin töltése	Elválasztható enantiomer	Ciklodextrin származékok
semleges	ionos	α -, β -, γ -CD, alkil-, hidroxialkil-, acetyl-CD
negatív	ionos és semleges	karboxi-alkil-, szukcinil-szulfatált-, szulfoalkil-, foszfátált-CD
pozitív	ionos és semleges	amino: pri., szek., terc., kvat.,

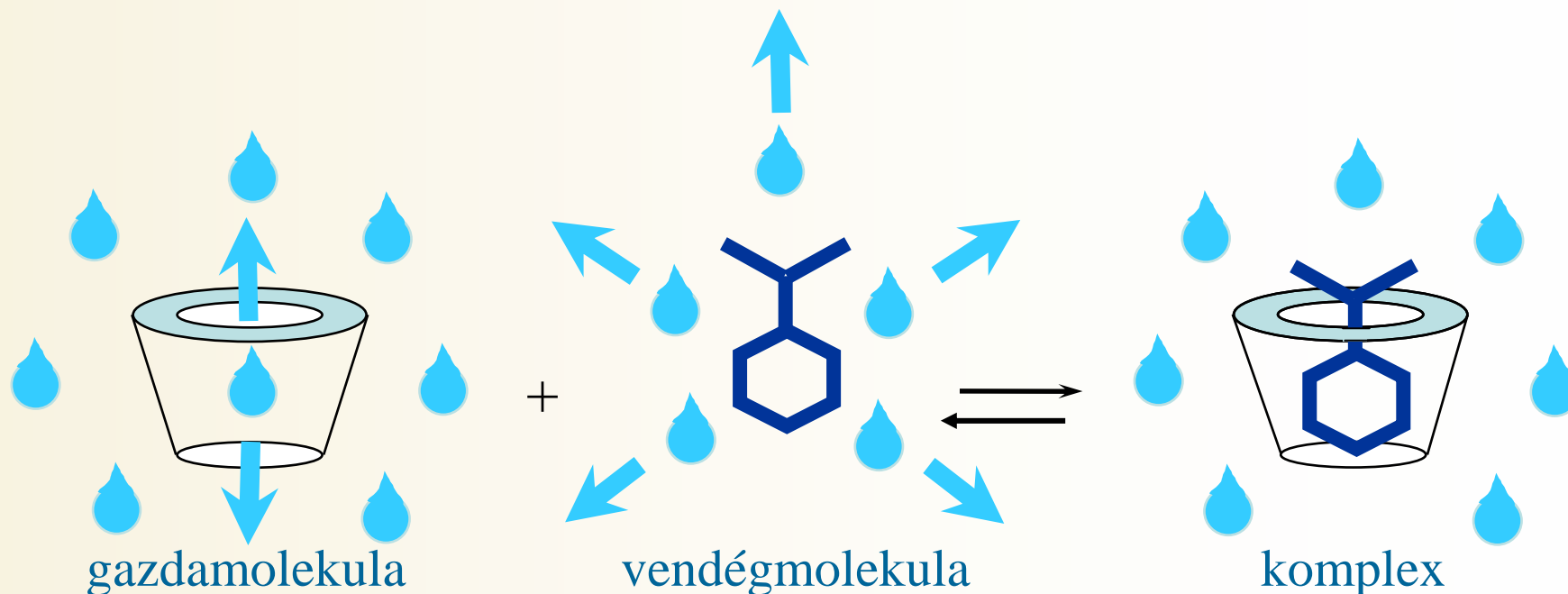
A származékolás célja:

- flexibilis, de nem szelektív
- a stabilitási állandó megváltoztatása
- a „belső” szelektivitás növelése
- a mozgékony-különbség növelése a szabad és komplexált formák között

A zárványkomplex képzés

A ciklodextrinek zárványkomplexeket képeznek általában 1:1 sztöchiometriával.

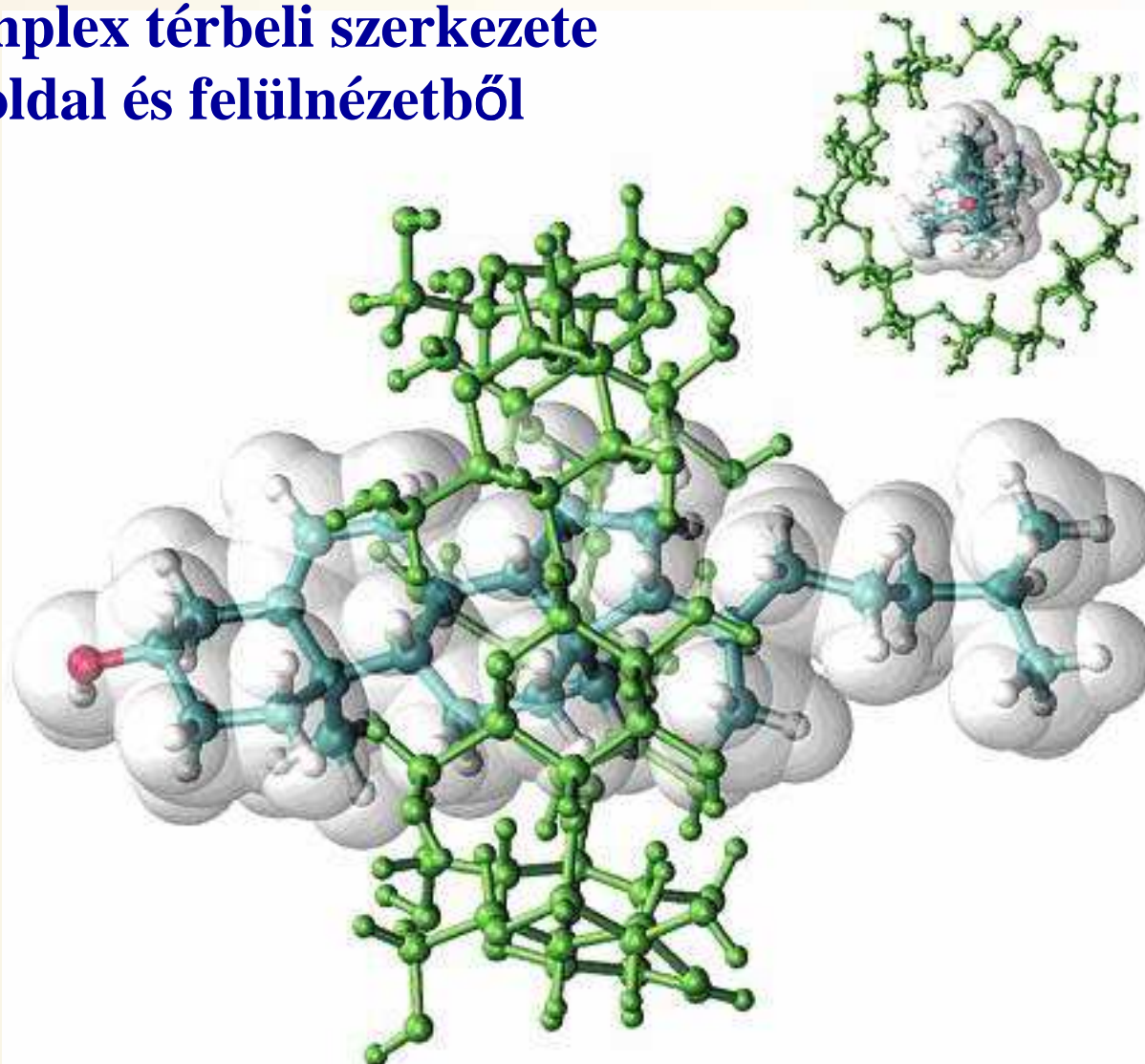
$K_a : 10 - 10000 \text{ M}^{-1}$



A zárványkomplex képzés sémája: a ciklodextrin hidrofób üregében elhelyezkedő vízmolekulákat kiszorítja a hidrofób vendégmolekula



A koleszterin – β -ciklodextrin komplex térbeli szerkezete oldal és felülnézetből





The Cyclodextrin Company

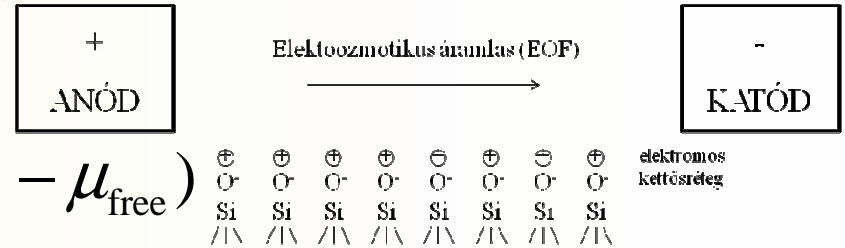
Látszólagos komplex-stabilitási állandók meghatározása

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

Linearizáció (x-reciprok módszer):

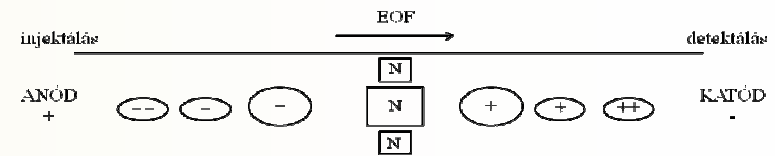
EOF kialakulása

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



Ábrázolás:

A látszólagos mozgékonyság



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

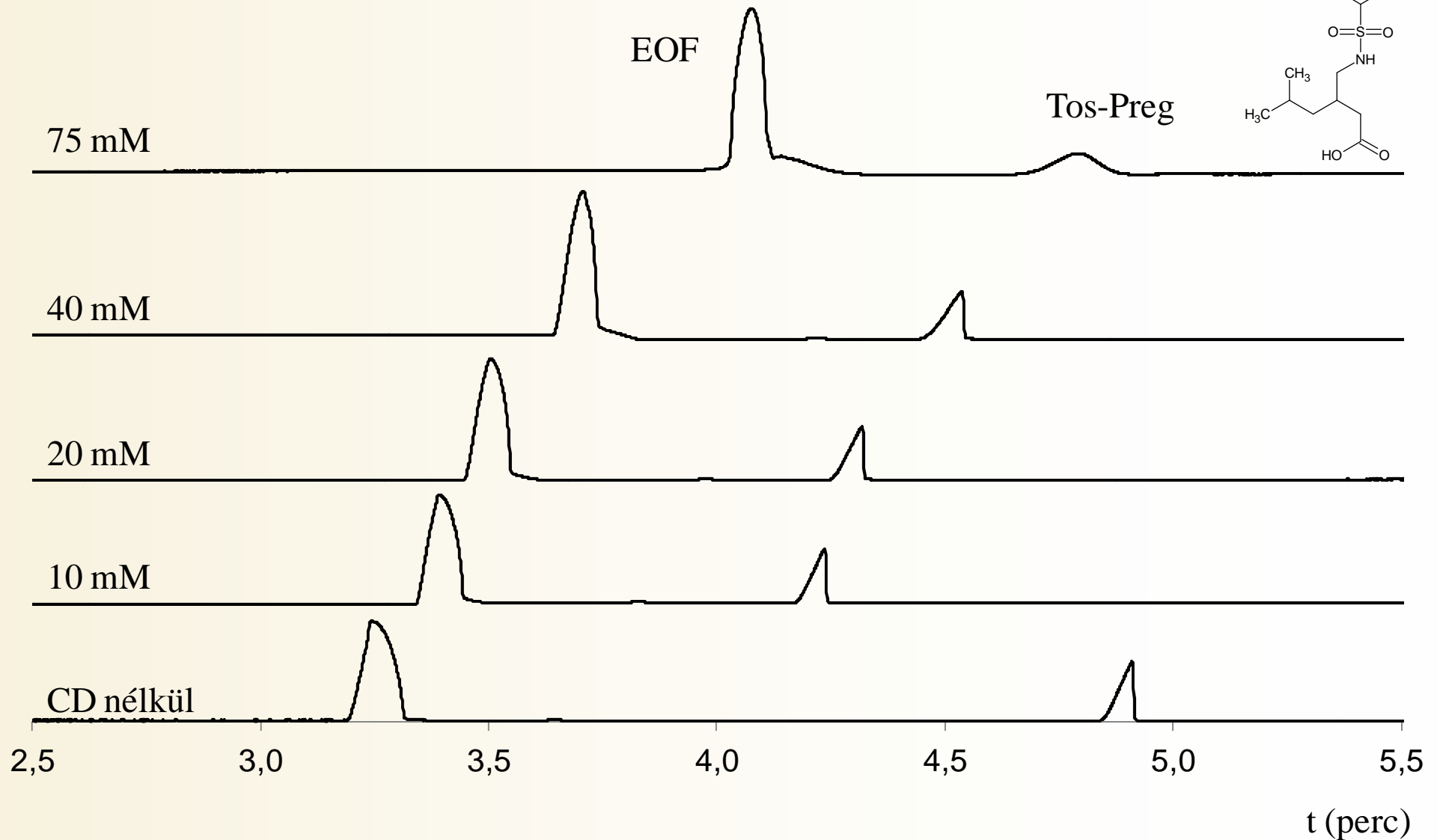
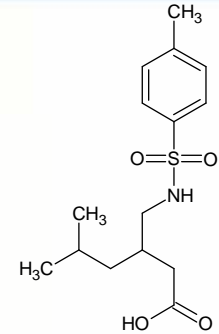


$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{l_d}{t_m \cdot E} = \frac{l_d \cdot l_t}{t_m \cdot U}$$

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{l_d \cdot l_t}{U} \cdot \left(\frac{1}{t} - \frac{1}{t_{\text{EOF}}} \right)$$

Stabilitási állandók meghatározása

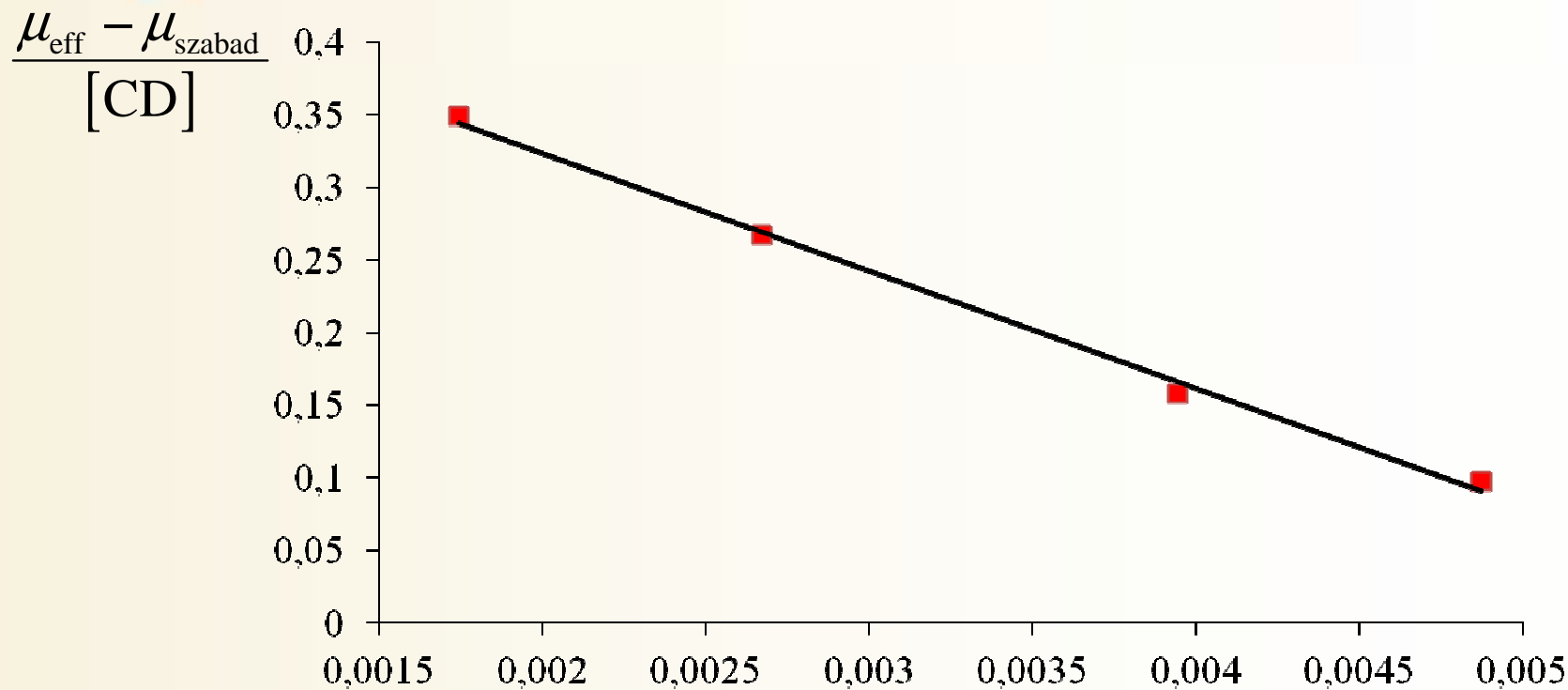
(pH=9,2 Tos-Preg + HP- α -CD)





The Cyclodextrin Company

x-reciprok módszer

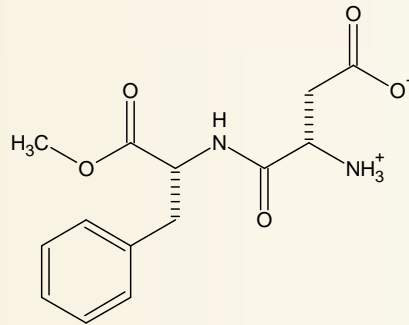


$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{\text{szabad}} + \mu_{\text{kplx}} K [\text{CD}]}{1 + K [\text{CD}]}$$

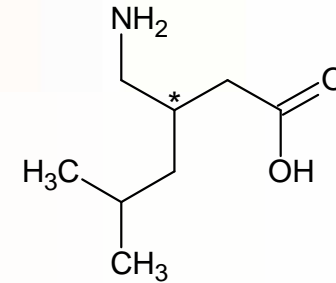
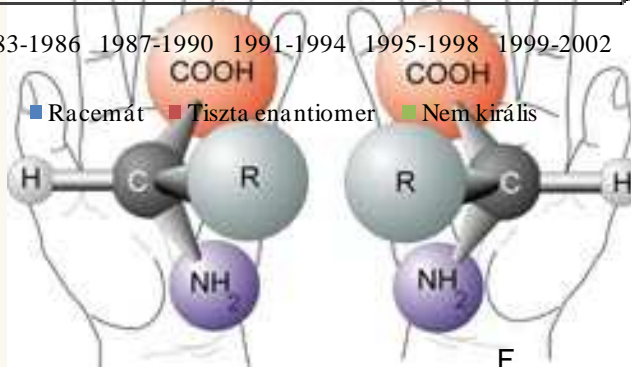
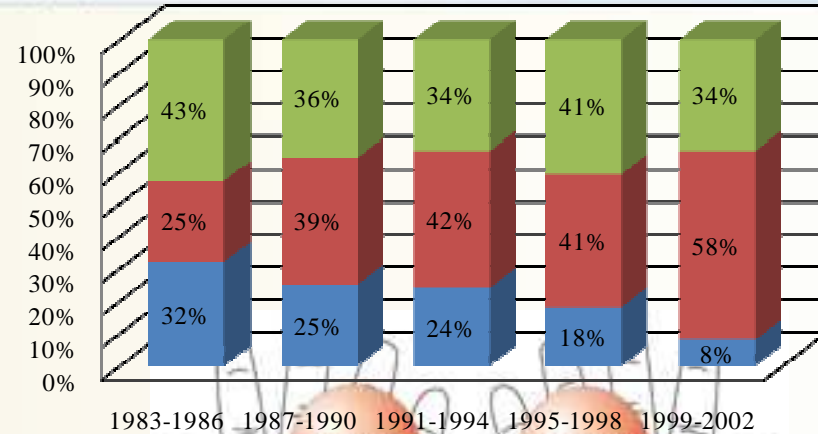
Rundlett K. L., Armstrong D.W.: J. Chromatogr. A 721 (1) 173-186, 1996.



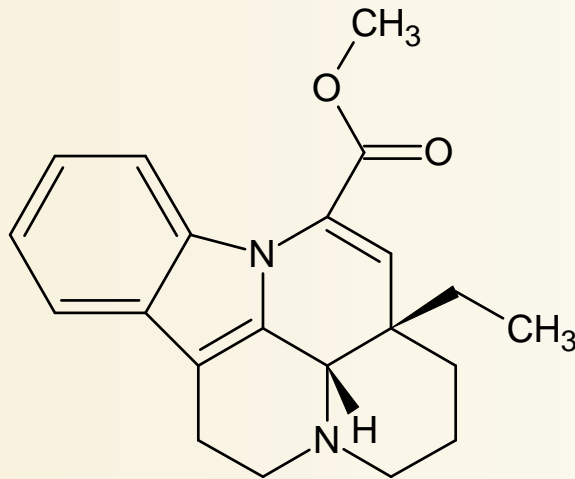
Kiralitás



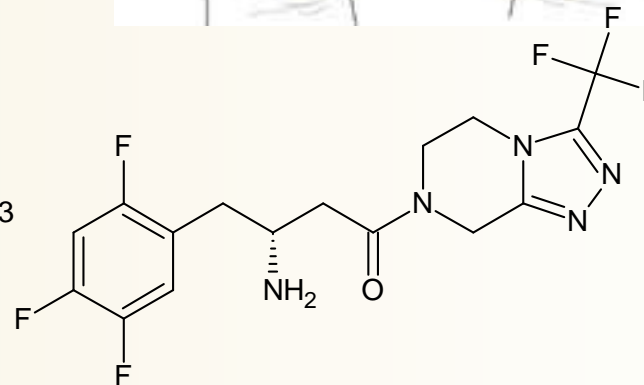
aszpartám (Asm)
(Nutrasweet®)



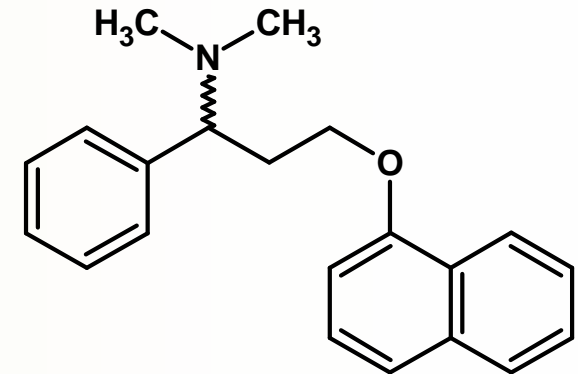
pregabalin (Preg)
(Lyrica®)



vinpocetin



szitagliptin (Sgli)
(Januvia®)



dapoxetin (Dpx)
(Priligy®)



A királis elválasztás követelményei

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

CD típusú szelektor hozzáadásával a mozgékonyág-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:

1. - legalább az egyik enantiomer esetén legyen:

$$\mu_{szabad} \neq \mu_{komplex}$$

2. - a komplexek mozgékonyágai különbözzenek:

$$\mu_{S,kplx} \neq \mu_{R,kplx} \quad (K_S \neq K_R)$$

$\mu_{R,S,szabad}$: nem komplexált enantiomerek mozgékonyága

μ_{kplx} : komplexált enantiomer mozgékonyága

$\mu_{R,S}^{eff}$: enantiomerek effektív mozgékonyága

K_S, K_R : enantiomerek stabilitási állandói



Az elválasztást befolyásoló főbb tényezők

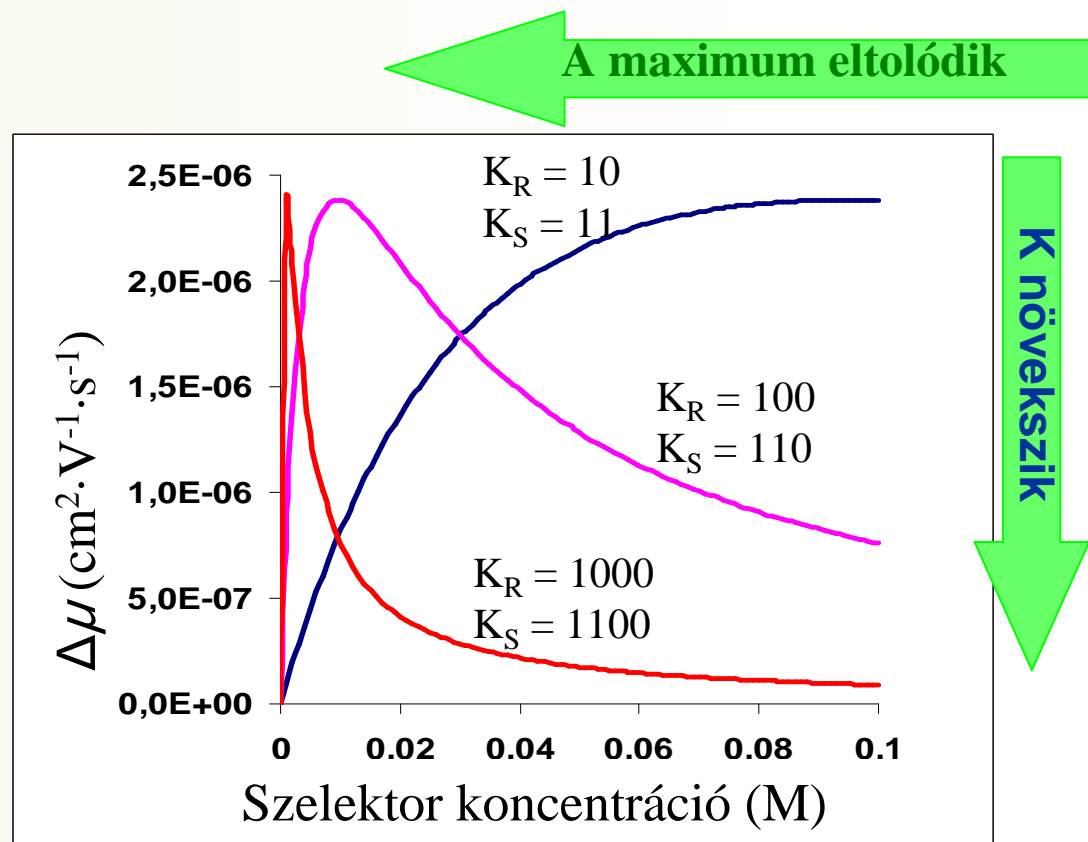
- Ciklodextrin koncentráció (viszkozitás, felbontás, stb.)
- pH (protonáltsági állapot, EOF mobilitás)
- Alkalmazott feszültség (mobilitás)
- Puffer koncentráció (ionerősség)
- Hőmérséklet (viszkozitás, komplex stabilitás)
- Szerves adalékanyag (stabilitás, viszkozitás, adszorpció)

Az elválasztás jellemzése: felbontási érték (R_s), szelektivitás (α)

A Wren-féle mozgékonyág-különbség elmélet

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

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





Stratégia

pH kiválasztása:

CE → ionizált részecske → pK_s függő pH választás

bázis: pH 2.5 – 3; sav: pH > pK_s ; semleges: pH 2.5, 7.2, 9.2

Ciklodextrin kiválasztása:

Üregméret-függés → α -, β -, γ -CD származékok (natív, HP- vagy metil)

Szubsztituens-függés → natív-, semleges-, pozitív- és negatív CD-k

Optimalizálás:

pH, CD konc., puffer konc., hőmérséklet, feszültség, szerves adalék

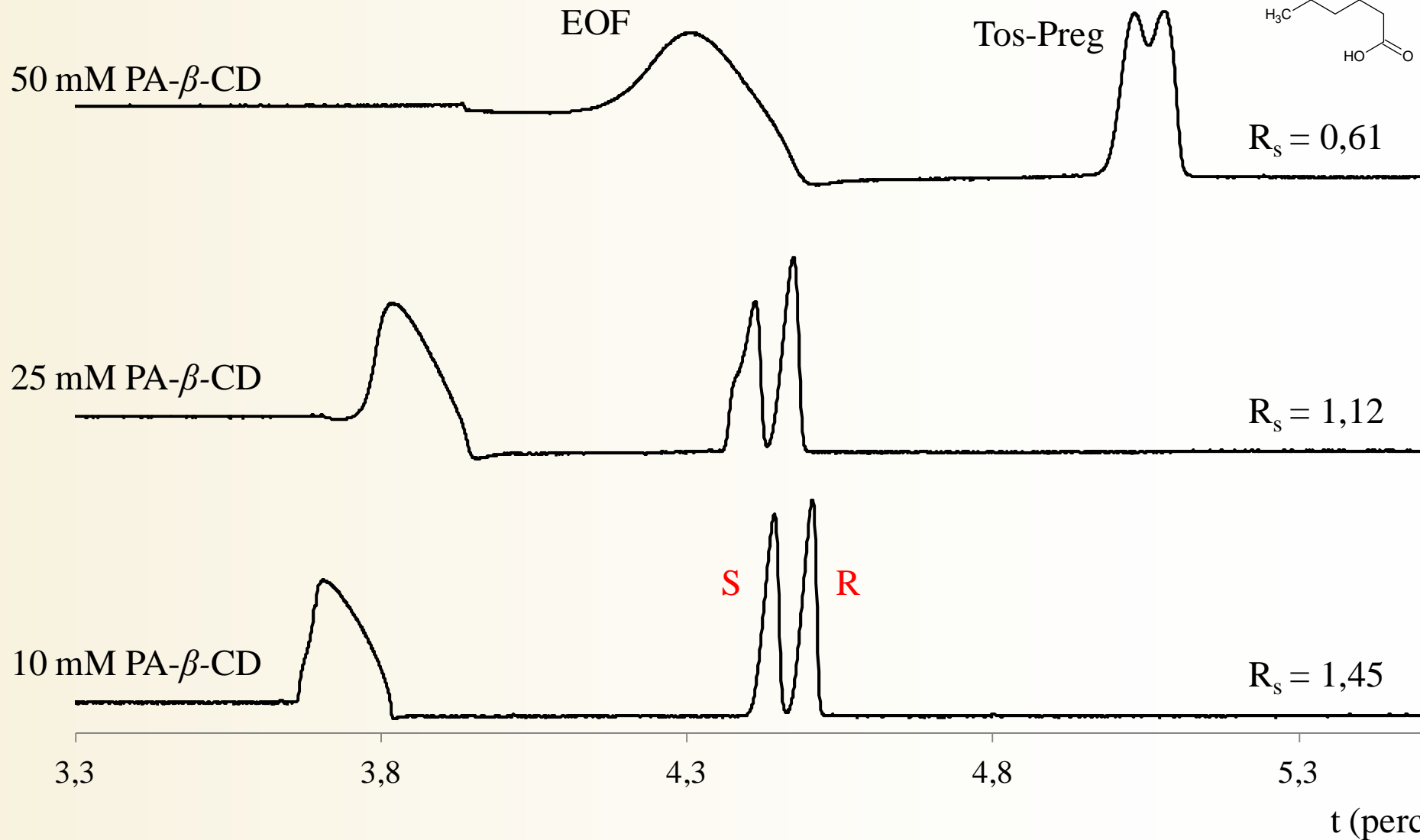
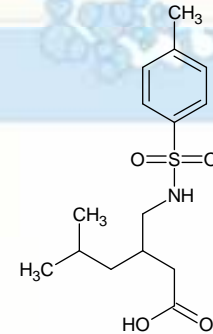
CD-ek kombinálása – duál rendszerek



The Cyclodextrin Company

Az elválasztás CD koncentráció függése

(pH=9,2 Tos-Preg + PA- β -CD)

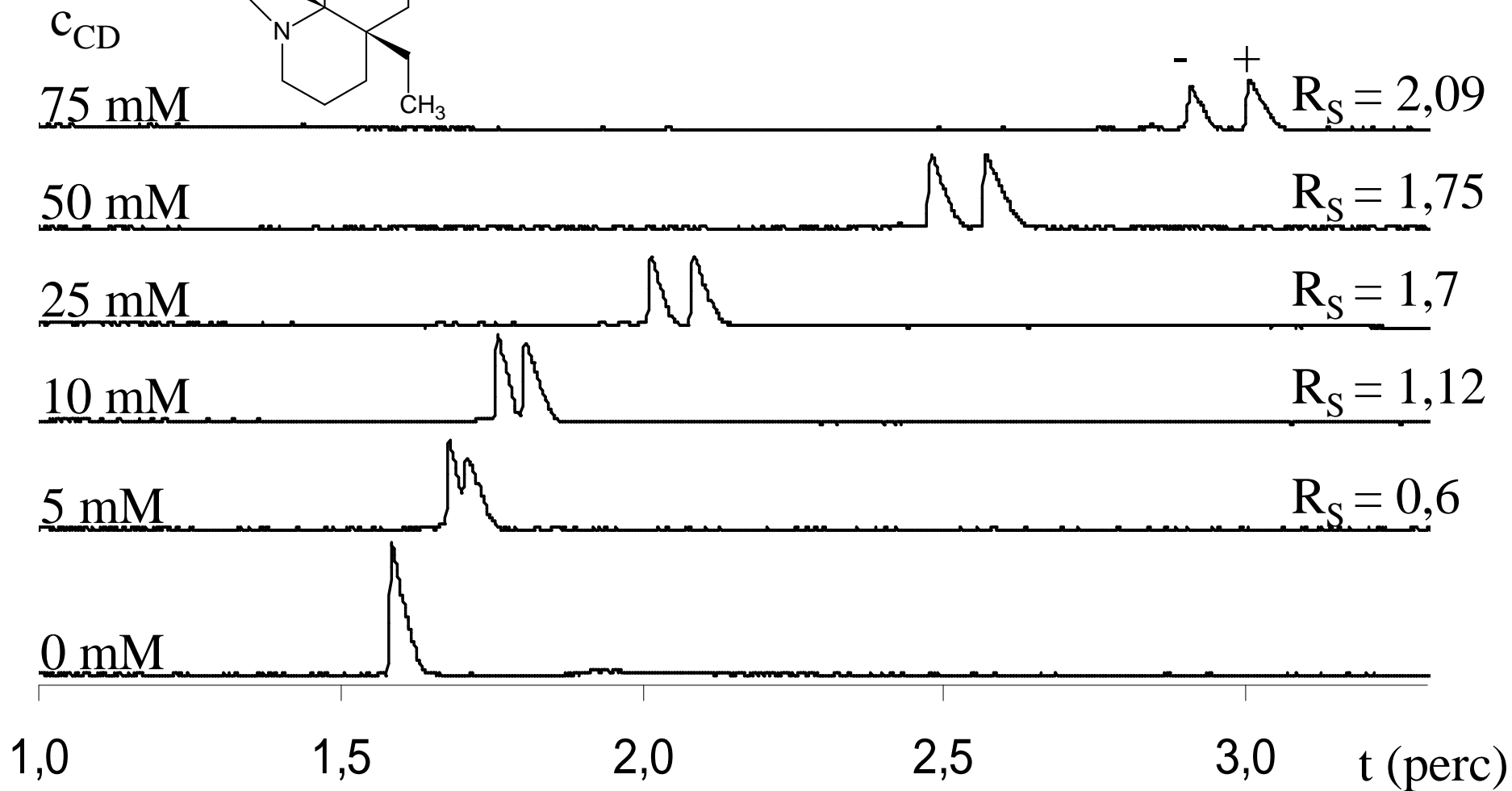
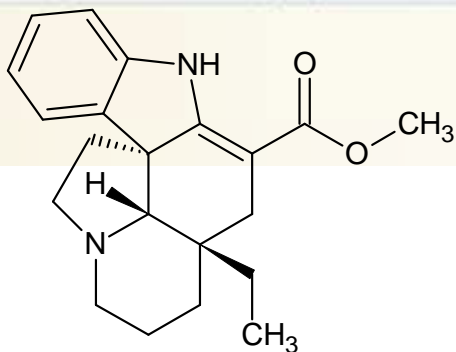




The Cyclodextrin Company

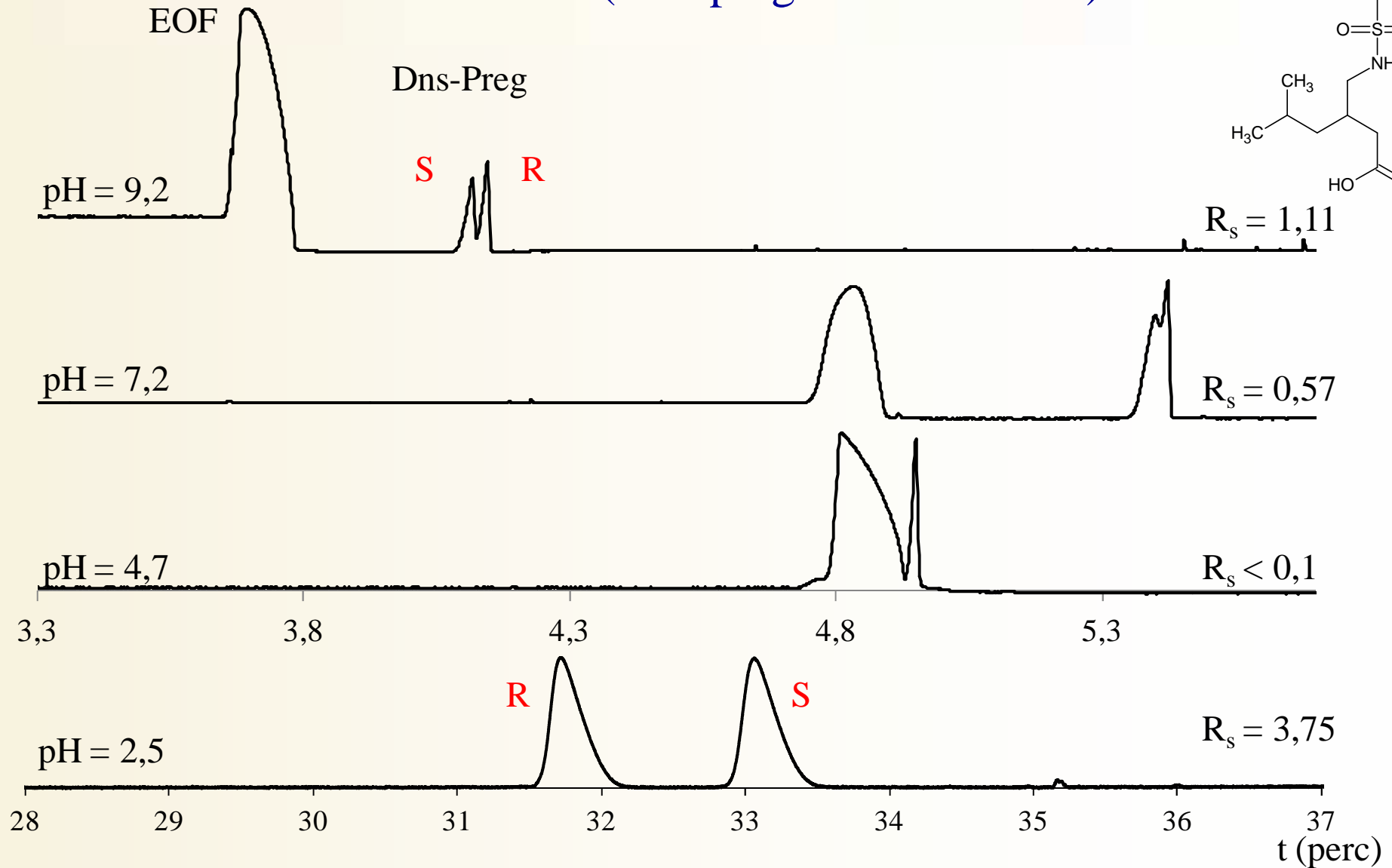
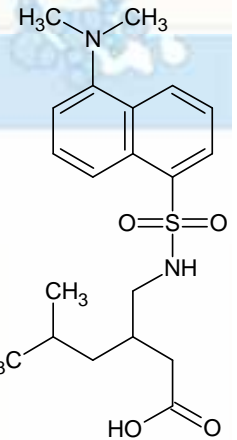
Az elválasztás CD koncentráció függése

(Vinkadiformin + RAMEB-CD)





Az elválasztás pH-függése (Dns-preg + DIMEB-CD)

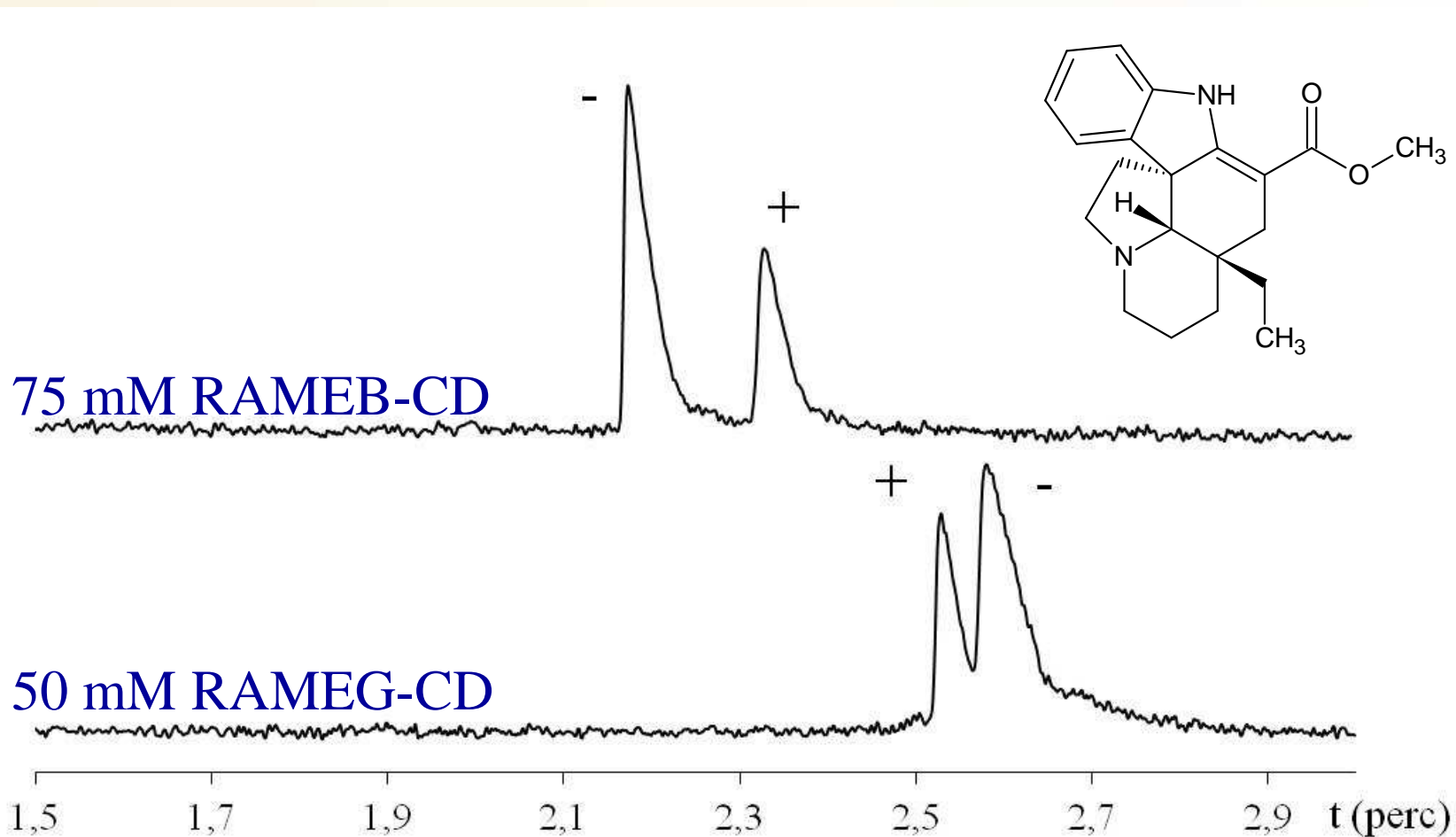




The Cyclodextrin Company

Enantiomer sorrend megfordulás

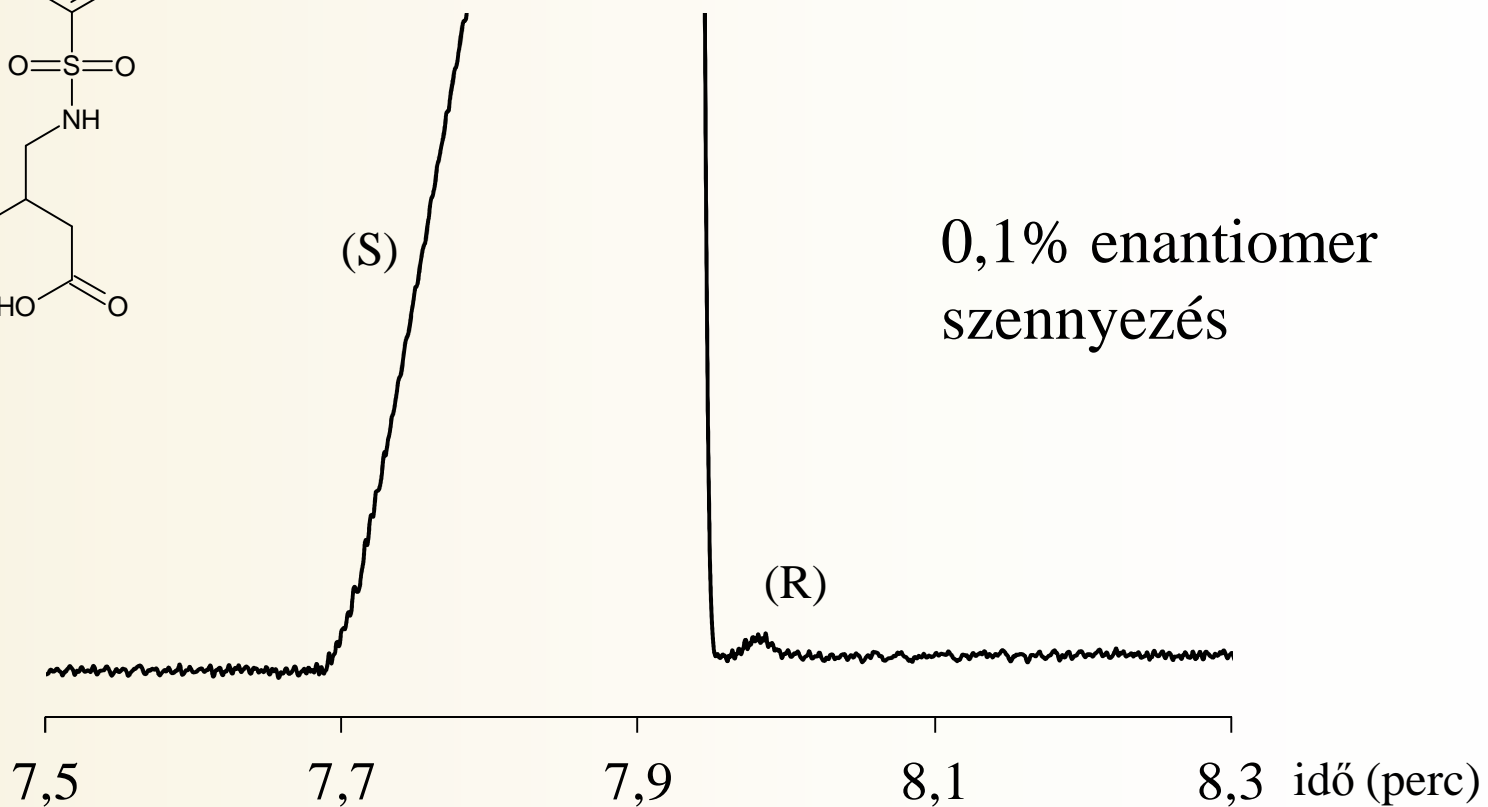
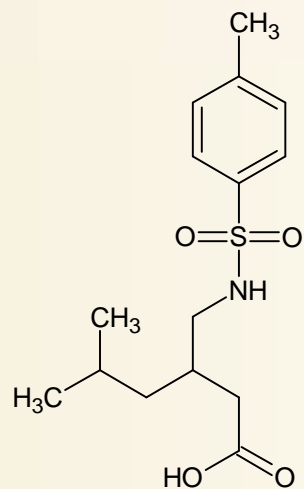
(Vinkadiformin + RAMEB/RAMEG-CD)





Szennyezésvizsgálat

(Tos-preg + PA- β -CD)





- Ionos + semleges/ionos CD
- Cél: minél szélesebb „elválasztási ablak” és optimális CD arány elérése
- Ionos CD: mozgékony (és szelektív) biztosítása
- Semleges CD: szelektív (és mozgékony) biztosítása
- Alkalmazott koncentrációk:
 - függenek a stabilitási állandóktól
 - ionos CD koncentráció maximálása
 - semleges CD koncentráció beállítása



The Cyclodextrin Company

Imperanene „screening”



CD	Stabilitás, elválasztás
α -CD	$K < 5$
β -CD	$K < 5$
γ -CD	$K < 5$
HP- α -CD DS~3*	$K_S = 36$ (2) $K_R = 32$ (3) $R_S = 0,53$
HP- β -CD DS~3	$K_S = 34$ (5) $K_R = 13$ (4) $R_S = 0,61$
HP- β -CD DS~4.6	$K = 190$ (30)
HP- β -CD DS~6.3	$K_S = 36$ (4) $K_R = 4$ (1) $R_S = 0,57$
HP- γ -CD DS~3	$K = 39$ (4)
TRIMEA-CD	$K = 27$ (4)
TRIMEB-CD	$K = 32$ (3)
DIMEB-CD DS~14	$K = 23$ (4)
RAMEB-CD DS~12	$K = 6$ (2)
Ac- β -CD DS~7	$K = 46$ (5)

CD	Stabilitás, elválasztás
MA- β -CD	$K = 26$ (4)
PA- β -CD	$K = 49$ (1)
Suc- β -CD DS~6	$K < 5$
CM- β -CD DS~3	$K = 14$ (2)
CM- γ -CD DS~3	$K = 7$ (1)
CE- β -CD DS~3	$K < 5$
SP- α -CD DS~2	$K = 85$ (4)
SP- β -CD DS~4	$K_S = 1600$ (2) $K_R = 1990$ (3) $R_S = 0,62$
SP- γ -CD DS~2	$K = 168$ (1)
SHP- β -CD DS~3	$K = 710$ (50)
SHP- γ -CD DS~3	$K = 91$ (1)
SB- α -CD DS~4	$K_S = 113$ (2) $K_R = 107$ (2) $R_S = 0,57$
SB- β -CD DS~4	$K = 2500$ (5)
SB- γ -CD DS~4	$K_S = 290$ (2) $K_R = 330$ (4) $R_S = 1,26$



The Cyclodextrin Company

Duál CD rendszerek - Ipn



CD – 1	CD – 2	Felbontási érték (R_s)
SB- γ -CD (5 mM)	HP- α -CD (30 mM)	1,45
SB- γ -CD (5 mM)	HP- β -CD DS~3 (50 mM)	0,69
SB- γ -CD (7,5 mM)	HP- β -CD DS~4,6 (30 mM)	1,73
SB- γ -CD (5 mM)	HP- β -CD DS~6,3 (50 mM)	2,22
SB- γ-CD (12,5 mM)	PA- β-CD (10 mM)	4,47
SB- γ -CD (10 mM)	SB- α -CD (5 mM)	1,72
SB- γ -CD (7,5 mM)	SB- β -CD (5 mM)	0,88
SB- γ -CD (12,5 mM)	SHP- β -CD (10 mM)	1,04



Köszönöm a figyelmet