

Ciklodextrinek korszerű analitikája: ciklodextrinre szabott kromatográfias állófázisok fejlesztése

SZEMÁN Julianna,* CSABAI Katalin és SOHAJDA Tamás

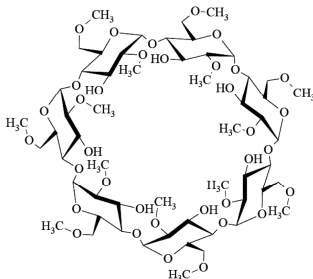
CycloLab Ciklodextrin Kutató-Fejlesztő Laboratórium Kft, Illatos út 7, 1097 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A ciklodextrinek (CD-k), főleg a ciklodextrin-származékok analitikája sok szempontból különbözik a gyógyszer-molekulák vagy az egyéb szénhidrátok vizsgálatától. Az alap ciklodextrinek (α -, β - és γ -CD) viszonylag egyszerűen vizsgálhatók folyadékkromatográfiával, de CD-származékok analízise már bonyolultabb feladat.

Az alap CD-k, főleg a β -CD vízoldhatósága alacsony, kémiai módosításával, pl. hidroxipropil-, szulfobutil- vagy metil-csoportok beépítésével viszont az oldhatóság jelentősen növelhető. A legerjedtebb hidroxipropil- és szulfobutil-származékokat elsősorban gyógyszeripari formulázásra, a hatóanyag oldhatóságának és stabilitásának növelésére, biológiai hasznosulás javítására használják. A CD-származékok egyéb ipari és analitikai felhasználása is jelentős, például királis adalékként enantiomerek elválasztására is alkalmasak.

A CD-származékok a gyártási eljárástól függően igen különböző átlagos szubsztitúciós fokúak és komponens-eloszlásúak lehetnek, hiszen a β -ciklodextrin gyűrű 21 hidroxil-csoportja cserélhető ki a kívánt-oldalláncra. Az 1. ábra egy egykomponensű, ún. "single isomer" CD-származék, a heptakis(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin (DIMEB) szerkezeti képletét mutatja, ahol minden egyes glükopiranoz egység a 2-es és 6-os helyzetben metilezett, míg a 3-as helyzetben érintetlen.



1. Ábra A DIMEB szerkezeti képlete.

A véletlenszerűen szubsztituált CD-származékok számos komponenset tartalmaznak, melyek a szubsztituensek számában és helyzetében különböznek. Az elméletileg lehetséges összetevők száma igen nagy (2^{21}), ezért valamennyi komponens elválasztása még a legkorszerűbb analitikai módszerekkel sem valósítható meg, és általában

nem is cél. Ennek ellenére elengedhetetlenül fontos a termékek komponens-eloszlásának jellemzése, a "batch to batch" reprodukálhatóság ellenőrzése. A véletlenszerűen szubsztituált CD-származékok széleskörűen használt, gyógyszerkönyvben is jegyzett képviselői a (2-hidroxipropil)- β -CD (HPBCD) és a szulfobutiléter- β -CD (SBECD).

A CD-származékok jellemzésére a szubsztitúciós fokot és egyes esetekben a szubsztitúciós mintázatot szokás használni. A szubsztitúciós fok, (angol neve Average Degree of Substitution, DS), megadja a szubsztituensek átlagos számát egy ciklodextrin gyűrűn, melyet általában NMR-rel lehet meghatározni. Használják még pl. a gyógyszerkönyvben, a moláris szubsztitúciós fokot is (Molar Substitution, MS), amely a szubsztituensek átlagos száma a CD gyűrű egy glükóz egységén.

A szubsztitúciós mintázat a szubsztituensek elhelyezkedésére utal a CD gyűrűn, melyről elválasztástechnikai módszerekkel kaphatunk információt.

A ciklodextrinek és származékaik mennyiségi meghatározására eleinte nem elválasztástechnikai módszereket, hanem pl. spektrofotometriát, spektrofluorimetriát használtak. Ezek a módszerek a ciklodextrinek komplexképző képességén alapulnak. Ilyen pl. a fenolftalein vagy a metilnarancs színváltozásának követése,^{1,2} a naftol fluoreszcenciájának erősödése³ a ciklodextrin koncentráció függvényében. Ezekkel a módszerekkel nem kapunk elég ismeretet a véletlenszerűen helyettesített CD-származék komponens-összetételéről.

Az elválasztástechnikai módszerek (HPLC, CE, TLC, GC) viszont használhatók a minta komponens-eloszlásának jellemzésére, továbbá biológiai mintákban és készítményekben mennyiségi meghatározásra is. A vékonyréteg-kromatográfia (TLC) bevált azonosításra (gyors, olcsó egyszerű) és reakciók követésére. Az ionos származékok jellemzésére jól alkalmazható a kapilláris elektroforézis (CE), bár a CD-származékoknak általában nincs UV elnyelése, ezért megfelelő fúttató pufferek használata szükséges, melyek segítségével a komplexképzés eredményeként létrejövő UV jel csökkenése mérhető (indirekt detektálás).

HPLC-vel mind az ionos és a nem ionos jellegű CD-származékok is jól vizsgálhatók. Az UV elnyelés hiánya miatt eleinte törésmutató (RI) detektort használtak, amely az alap CD-k esetében ma is megfelelő választás. A véletlenszerűen helyettesített CD-származékok esetében a komponensek tulajdonságai viszont jelentősen eltérnek,

* Tel.: +36-1-347-6074; fax: +36-1-347-6068; e-mail: szeman.j@cyclolab.hu.

a DS változhat, pl. 1–10 között. Könnyen belátható, hogy azonos oldószertartalommal – izokratikusan – ezen vegyületek többsége nem vizsgálható megfelelően, az RI detektor viszont nem használható gradiens elúcióval. A fényszóródásos detektor (Evaporative Light Scattering detector, ELS) elterjedésével a CD-származékok vizsgálata jelentős fejlődésnek indult, mivel ez a detektor gradiens elúció esetén is alkalmazható. Hátránya, hogy a koncentráció – csúcsterület összefüggés nem lineáris, ezért a mennyiségi kiértékelés nem mindig egyszerű, mindenképpen mennyiségi referencia anyagot igényel. Használható még korona kislüléses (CAD), vezetőképességi, amperometriás és tömegspektrometriás detektor is, utóbbinak a komponensek azonosításánál van nagy jelentősége. Indirekt UV illetve fluorimetriás detektálás is alkalmazható a CE-höz hasonlóan megfelelő segédvegyületek alkalmazásával.^{4,5}

Az állófázis kiválasztásakor mérlegelni kell a vizsgálat célját, vagyis azt, hogy a komponenseloszlás jellemzésére vagy mennyiségi meghatározásra törekszünk-e. A CD-származékok vizsgálatára a szubsztituensek minőségétől és az analízis céljától függően főként fordított fázisú mérőmódszerek használatosak. A fordított fázisú módszerek esetében az apoláris kölcsönhatások mellett általában a zárványkomplex-képzés is jelentős szerepet játszik az elválasztásban.

Számos CD-származék vizsgálatára kielégítő elválasztást adnak a kereskedelmi forgalomban kapható C18, C8 és fenil-csoporttal származékolt oszlopok.^{6,7} A sokkomponensű, véletlenszerűen szubsztituált CD-származékok komponenseloszlását ujjlenyomat kromatogramokkal jellemezzük. Hasonló kromatográfiai módszerek használhatók az egykomponensű származékok esetén is a főkomponens melletti szennyező komponensek meghatározására.

Az alap szilikagélre amino-, diol- vagy más alkalmas csoportot köve és nagy acetonitril-tartalmú mozgófázist alkalmazva, újabb, más szelektivitású elválasztási módszereket is lehet használni a CD-k kromatográfiai vizsgálatára (HILIC módszer).^{8,9,10}

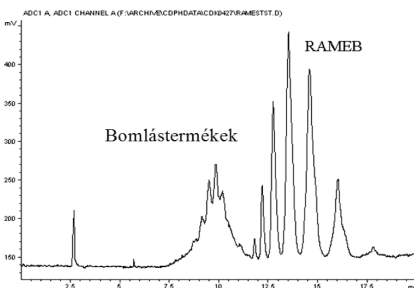
A vizsgálandó minták CD-származék-tartalmát méretkizárásos kromatográfiával határozzuk meg, mivel itt egy alkalmas oszlopon – a célnak megfelelően – a mérendő CD-származék komponensei egyetlen csúcsként jelennek meg, ami lehetővé teszi a mennyiségi értékelést.¹¹

Az ionos CD-származékok elválasztása egy újabb kihívást jelentett az analitikusok számára. A sokkomponensű SBECD jellemzésére fordított fázisú ion-pár kromatográfiát illetve anioncserés kromatográfiát alkalmaztak sikeresen.^{12,13} A célnak megfelelő HPLC oszlop kiválasztása a kereskedelemben kapható oszlopok nagy választéka miatt azonban nem egyszerű, illetve bizonyos feladatokra nehéz a megfelelő állófázist megtalálni, ezért szükségessé vált különleges állófázisok fejlesztése a ciklodextrinek vizsgálatára. Ez a munka 2004-ben kezdődött meg a CycloLab és a BST/ChiroQuest Kft. szoros együttműködésével.

2. Ciklodextrinre szabott kromatográfiai állófázisok fejlesztése

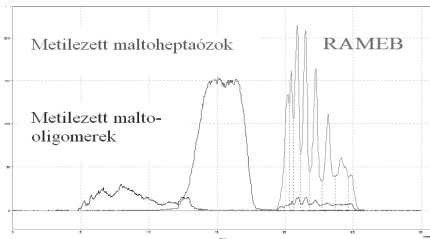
2.1. CD-Screen® kromatográfiai állófázis

Számítógépes modellezést is felhasználva olyan állófázisokat terveztünk, melyeknél a fő kölcsönhatás a szilikagélre felvitt funkció csoport és a CD közötti zárványkomplex-képzés volt. A szelektivitást növelő másodlagos kölcsönhatásokat a funkció csoport szilikagélhez való kötésére használt összekötő csoport biztosította. Számos potenciális jelölt közül a karbamid-csoporton keresztül kötött 4-nitrofenil-csoporttal készült állófázis adta a legjobb eredményeket. A nitro-csoport elektron-szívó hatása miatt erős komplexképzés jött létre, míg a karbamid-csoport hidrogén donor/akceptor funkciója a kapott állófázis szelektivitását növelte.¹⁴ Az így készült oszlopon nem csak a CD származékokról kaptunk jellemző kromatogramokat, hanem a bomlásukkor keletkezett lineáris maltooligomerek csoportja is jól elválasztható volt a főkomponensektől (2. ábra). Tömegspektrometriás detektálással a bomlástermékeket sikerült azonosítani (3. ábra).



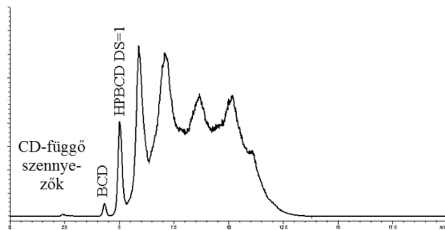
2. Ábra. Véletlenszerűen metilézett β -CD (RAMEB) jellemzése és bomlástermékeinek elválasztása CD-Screen oszlopon (Eluens: víz – acetonitril gradiens elúció, ELS detektálás).

A felhasznált alap szilikagél kiválasztása és az optimális borítottság vizsgálata után ez az állófázis került kereskedelmi forgalomba és kapta a CD-Screen® márkanevet. A CD-Screen® oszlop sikeres terméknek bizonyult, az európai gyógyszerkönyv Hydroxypropylbetadex (HPBCD) monográfiaiban (száma 1804) 2012-től a CD-Screen oszlop használatán alapuló,



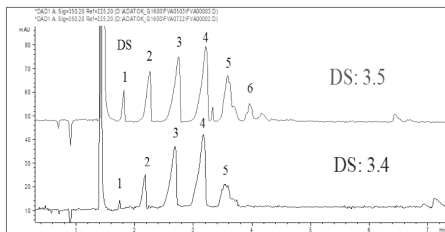
3. Ábra. A RAMEB és bomlástermékeinek azonosítása HPLC-MS mérésel.

a CycloLab-ban kidolgozott módszert írja elő a maradék β -CD és egyéb CD-től függő szennyezések vizsgálatára (4. ábra).¹⁵



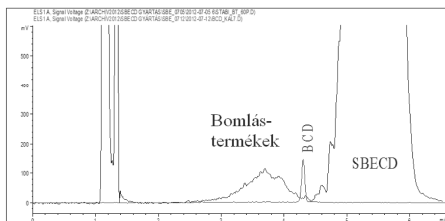
4. Ábra. HPBCD kromatogramja az európai gyógyszer-könyvben leírt módszerrel vizsgálva.

A CD-Screen® oszlopon ionos vegyületeket is sikerrel vizsgáltunk (5. és 6. ábra).

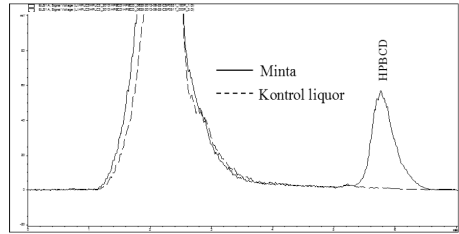


5. Ábra. Karboximetilezett 6-mono-deoxi, 6-mono-amino- β -CD szarusok összehasonlító vizsgálata CD-Screen® oszlopon.

A CD-Screen® oszlopon megfelelő oldószer-gradiens programot használva a sokkomponensű CD-származékok mennyiségi meghatározása is megoldható ún. „one-peak” módszerrel. Klinikai vizsgálatok folytak a HPBCD hatásosságának bizonyítására Niemann-Pick betegségben szenvedő gyermekek kezelésében, melynek során szükségessé vált a HPBCD mérése a gerincvelői folyadékban (liquor). Kidolgoztunk egy olyan módszert, amellyel a HPBCD mennyiségét meg tudtuk határozni igen alacsony koncentráció-szinteken ezekben a biológiai mintákban¹⁶ (7. ábra). Az ELS detektor alkalmazása miatt azonban fontos megjegyezni, hogy csak abban az esetben kapunk pontos eredményt, ha a kalibrációhoz ugyanazt a HPBCD-t használjuk, amivel a kezelést történt.

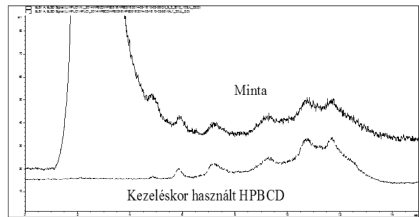


6. Ábra. SBECD lehetséges szennyező komponenseinek vizsgálata CD-Screen® oszlopon.



7. Ábra. HPBCD meghatározása gerincvelői folyadékokban „one-peak” módszer használatával.

A gradiens változtatásával bizonyítottuk, hogy a detektált anyag ugyanolyan komponenseloszlású, mint amit a kezeléshez használtak (8. ábra).



8. Ábra. HPBCD komponenseloszlásának összehasonlítása a gerincvelői folyadékban mérve és a kezeléskor használt anyagban.

Az analitikai célra használható 3 és 5 μm szemcseméretű kromatográfias állófázison kívül preparatív töltetet is előállítottunk, mely alkalmas különböző szubsztitúciós fokú frakciók elválasztására pl. HPBCD-ből vagy RAMEB-ből, illetve izomer/homológ szennyező komponensek elválasztására az egykomponensű CD-származékok esetében.

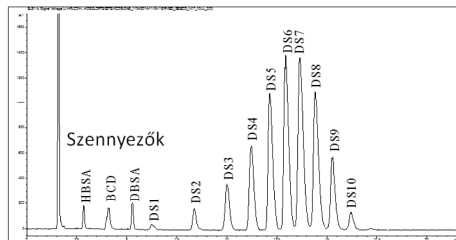
2.2. CD-Screen®-IEC kromatográfias állófázis

Bár a fenti példák mutatják, hogy a CD-Screen® oszloppal bizonyos feladatok megoldhatók, elkezdődött egy újabb állófázis fejlesztése, mely a komplexképző és az ioncserés kölcsönhatást használja az ionos CD-származékok vizsgálatára. Az első ilyen állófázist Varga Gábor[†] (ChiroQuest Kft) állította elő 2012-ben. A szilikagélre kötött dimetilamino-fenil-csoport (CD-Screen-DAP) lehetővé tette a szulfobutiléter- β -ciklodextrin (SBECD) komponenseinek szubsztitúciós fok szerinti elválasztását. Emellett a maradék β -CD, illetve a szintézis során keletkező szennyezések (hidroxibutánszulfonsav-HBSA és ennek dimerje - DBSA) mennyisége is meghatározható volt. (Az SBECD USP monográfia két különböző módszerrel vizsgálhatja ezeket a jellemzőket.) Az állófázis előállításakor használt reagens azonban rendkívül mérgező, ezért kísérletek kezdődtek egyéb reagens alkalmazásával hasonló szelektivitású állófázisok készítésére. Az új funkciós csoportok kiválasztásának szempontjai a következők voltak:

- a funkciós csoport pK értéke;
- aromás gyűrűt tartalmazó funkciós csoport jelenléte a ciklodextrinnel való zárványkomplex-képzéshez;

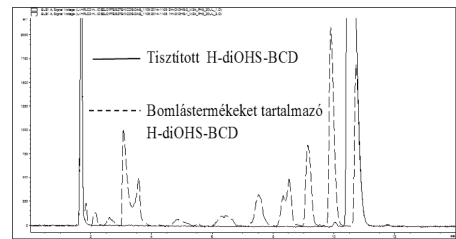
- kevésbé veszélyes, könnyen beszerezhető reagensek használata.

A megvizsgált funkciócsoportok közül a ((4-dimetilamino) aril)alkil-vegyülettel készült oszlopban kaptuk a legjobb elválasztást (CD-Screen®-IEC), sikerült az eredeti, CD-Screen-DAP oszlop szelektivitását elérni¹⁷ (9. ábra).



9. Ábra. SBECD komponenseinek elválasztása DS szerint és a szintézisből eredő szennyezőinek vizsgálata CD-Screen®-IEC oszlopban.

A kapillaris elektroforézisben királis elválasztásra az ionos – főleg az izomertizta (single isomer) – CD-származékok a leggyakrabban használt adalékanyagok. Ennek megfelelően rendkívül fontos ezek szintézisének követése, a végtermék tisztaságának meghatározása és stabilitásuk vizsgálata. Vigh Gyula és munkatársai kifejlesztettek egy vegyületsaladót, melynek tagjai a CD gyűrű összes 6-os helyzetű OH-csoportja helyett szulfát-csoportot tartalmaznak.^{18,19,20} A CD-Screen®-IEC oszlop jól alkalmazható ezen vegyületek vizsgálatára is. A 10. ábrán látható, hogy a nem megfelelő körülmények között tárolt heptakis(2,3-dihidroxi-6-szulfát)- β -ciklodextrin (H-diOHS-BCD) bomlástermékei jól elválaszthatók a főkomponenstől.



10. Ábra. Tisztított és bomlástermékeket tartalmazó H-diOHS-BCD minták vizsgálata.

3. Összefoglalás

Nagyfokú változékonyságuknak és szerkezeti sajátágaiknak köszönhetően a ciklodextrinek helyes analitikája még napjainkban is kihívást jelent a szakemberek számára. Származéktól és céltől függően szinte bármely műszeres analitikai technika alkalmas lehet a ciklodextrinek vizsgálatára bizonyos nézőpontból, teljes jellemzésük azonban csak ezek kombinációjával érhető el. A CycloLab és a ChiroQuest Kft. kifejlesztett két folyadék-kromatográfias állófázist a ciklodextrinek elemzésére. A cikkben bemutatott példák bizonyítják a CD-Screen® márkanevű termékek

használhatóságát, amit az is alátámaszt, hogy az európai gyógyszerkönyv 1804-es számú monográfiája a CD-Screen® oszlopot adja meg a HPBCD szennyezőinek vizsgálatára. A CD-Screen® termékeket jelenleg (a feltaláló, Varga Gábor sajátalattos korai halála miatt) a Bio-Sol-Dex Kft. állítja elő és forgalmazza (www.cd-screen.com).

Hivatkozások

- Buvári, A.; Barcza L.; Kajtár, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1988**, 9, 1687.
- Mohamed, M. H.; Wilson, L. D.; Headley, J. V. *Carbohydrate Polymers* **2010**, 80, 186-196.
- Gáge, R.; Venn, R. F.; Bayliss, M. A. J.; Edgington, A. M.; Roffey, S. J.; Sorrell, B. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, 22, 773-780.
- Frijlink, H.W.; Visser, J.; Drenth, B.F.H. *J. Chromatogr.* **1987**, 415, 325-333.
- Szemán, J.; Gerlőczy, A.; Csabai, K.; Szejtli, J.; Kiss, G.L.; Su, P.; Chau, R.Y.; Jacober, A. *J. Chromatogr. B* **2002**, 774, 157-164.
- Caron, I.; Elfakir, C.; Dreux, M. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1998**, 21, 554-560.
- Caron, I.; Elfakir, C.; Dreux, M. *Chromatographia* **1998**, 47, 383-390.
- Liu, G.; Goodall, D.M.; Loran, J.S. *Chirality* **1993**, 5, 220-223.
- Jaramillo, M.; Kirschner, D.L.; Dai, Z.; Green, T.K. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1316, 92-96.
- Estrada, R.; Vigh, G. *J. Chromatogr. A* **2012**, 1226, 24-30.
- Szathmari, S. Cs. *J. Chromatogr.* **1989**, 487, 99-105.
- Grard, S.; Elfakir, C.; Dreux, M. *Chromatographia* **1999**, 50, 695-700.
- Grard, S.; Elfakir, C.; Dreux, M. *J. Chromatogr. A* **2000**, 897, 185-193.
- Szemán, J.; Csabai, K.; Kékesi, K.; Szente, L.; Varga, G. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1116, 76-82.
- PHARMEUROPA 23.4, October **2011**, 667.
- Szemán, J.; Ludányi, K.; Dalmadi-Kiss, B.; Klebovich, I.; Szente, L. 17th International Cyclodextrin Symposium, Saarbrücken, **2014**, <https://www.researchgate.net/publication/295920205>
- Szemán, J.; Iványi, R.; Ludányi, K.; Dalmadi-Kiss, B.; Szente, L.; Vigh, Gy.; Varga, G. 26th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Tbilisi, Georgia, **2015**, http://cd-screen.com/wp-content/uploads/2015/07/Szeman_poszter_PBA_A4.pdf
- Vincent, J. B.; Sokolowski, A. D.; Nguyen, T. V.; Vigh, Gy. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4226.
- Vincent, J. B.; Kirby, D. M.; Nguyen, T. V.; Vigh, Gy. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4419.
- Cai, H.; Nguyen, T. V.; Vigh, Gy. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 580-589.

A cikkben szereplő anyagok rövidítései:

CD	Ciklodextrin
BCD	β -ciklodextrin
DIMEB	heptakis(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin
DBSA	hidroxibutánszulfonsav dimer
HBSA	hidroxibutánszulfonsav
H-diOHS-BCD	heptakis(2,3-dihidroxi-6-szulfát)- β -ciklodextrin
HPBCD	(2-hidroxipropil)- β -ciklodextrin
RAMEB	Véletlenszerűen metilzett β -ciklodextrin
SBECD	sulfobutületer- β -ciklodextrin

State of art analysis of cyclodextrins: development of tailor-made stationary phases specifically designed for cyclodextrin analysis

The analytical investigation of cyclodextrins (CDs) has a long and prosperous history. Several challenges arise during the investigation of this carbohydrate family including the lack of characteristic UV absorbance (in the majority of cases), potential interactions with matrix and background components (eluent, buffers), and interference with analytical reagents and interaction with column surface. Since most of the CD derivatives are not single isomers, but rather statistically substituted substances which consist of large number of isomers/homologues, sophisticated methods are necessary to be developed for the characterization of these multicomponent CD derivatives and for their quantitative determination in biological fluids.

Over the last 50 years, several analytical methods have been developed, each focusing on different aspects of the CD analysis. The traditional analysis of CDs was carried out by iodometry and TLC methods, supported by non-chromatographic methods using the specificity differences in color modification of certain dyes. TLC methods have been applied for identification and purity analysis for several years for both parent and derivatized CDs, and are still considered cost-effective tools to follow reactions. Average degree of substitution (DS) and identification is frequently studied by nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS). Capillary electrophoresis (CE) provides valuable information on the DS and peak distribution pattern of charged CD derivatives.

Considering all options, HPLC is still the most useful tool to characterize CDs. Of course, HPLC methods are evolving as well, and different approaches are suitable for different aspects of the analysis. Refractive index (RI) detectors and common columns (RP18 and RP8, HILIC and phenol and amino bonded phases) are well suited for investigating parent CDs and several other derivatives, while their use is discouraged for the analysis of multicomponent CD mixtures due to the limitation to use isocratic elution. The introduction of evaporative light scattering detector (ELSD), a universal detection system compatible with gradient elution, a new era in the analysis of CD derivatives, resulting in remarkable improvement in the HPLC analysis of CD derivatives. Since the use of gradient elution is necessary for good separation of the components (or component groups) in case of statistically substituted CD derivatives, the routine RI detection could be omitted making ELSD the dominating and highly recommended detection method of CD analysis ever since. The main drawback is that the detection has non-linear characteristics. Besides ELSD, Corona Charged Aerosol detector (CAD) as well as NQAD Aerosol detector (with Water-based Condensation Particle Counter technology) are well suited for HPLC analysis of CDs and CD derivatives.

When selecting the proper stationary phase, the aim of the analysis - characterization of component distribution, quantity of the CD or CD derivative, determination of the impurity profile - should be considered. Mainly reversed phase columns are used, such as C18, C8 or phenyl columns perform well because in addition to the apolar interactions also the inclusion complex formation plays a role in the mechanism of the separation. Further stationary phases obtained by bonding amino-, diol- or other suitable functional groups to the silica were also successfully applied in the chromatographic study of CDs (HILIC method).

The analysis of the ionic CD derivatives is challenging. For the characterization of the multicomponent SBECD reversed phase anion exchange chromatography was used.

The issues and uncertainties with the column selection for the analysis of CD derivatives drew the need for the development of tailor-made, novel stationary phases. Several aromatic groups as potential guests for CDs were covalently bonded on the silica gel matrix and the separation properties of the prepared columns were evaluated with various CDs. Inclusion complex formation between the selector groups of the stationary phase and CDs plays dominant role in the retention mechanism. The N-(4-nitrophenyl)-carbamide bonded silica gel stationary phase (CD-Screen®) was selected as the most effective column for the analysis of CD derivatives resulting in a special selectivity. The usefulness of the new stationary phase was demonstrated via the characterization of various statistically substituted CD derivatives and batch-to-batch analysis (Figures 4, 5, 8). This column is applied in the EP monograph for the analysis of related substances (practically the residual β -CD and any CD related impurity) in (2-hydroxypropyl)- β -CD (Figure 4). Besides enabling characterization of CD derivatives, the most remarkable property of CD-Screen® stationary phases is the suitability to follow the degradation of CDs (Figures 2, 6). The columns are also efficient to develop CD assay methods in biological samples (Figure 7).

Recently, a prototype of a novel CD-Screen® stationary phases, CD-Screen-DAP (dimethylamino phenyl bonded silica) was designed based on the combination of ion-exchange and inclusion phenomenon for the analysis of anionic CD derivatives enabling baseline separation of sulfobutyl ether- β -CD (SBECD) components. After optimizing the column chemistry, the CD-Screen®-IEC column with (4-dimethylamino)aryl)alkyl functions was commercialized. Besides SBECD fractions, the starting material BCD and several by-products of the synthesis (HBSA, DBSA) were separated as well in a single run (Figure 9). The column was also found suitable for the determination of impurity profile of single isomer CD derivatives (Figure 10).