

JAK SE NEOKRÁST O ÚSPĚŠNOU CHIRÁLNÍ SEPARACI KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU

JAN PETR^a, VÍTĚZSLAV MAIER^a, JANA
HORÁKOVÁ^a, EVA TESAŘOVÁ^b a JURAJ
ŠEVČÍK^a

^aKatedra analytické chemie, Univerzita Palackého, Třída
Svobody 8, 771 46 Olomouc, ^bKatedra fyzikální
a makromolekulární chemie, Univerzita Karlova, Albertov
2030, 128 40 Praha
petrjan@centrum.cz; maierv@email.cz;
jana.horakova@post.cz; tesarove@natur.cuni.cz;
sevcik@prfw.upol.cz

Došlo 25.6.04, přepracováno 7.12.04, přijato 2.1.05.

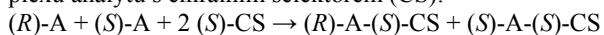
Klíčová slova: chirální separace, kapilární elektroforéza,
tamsulosin, diskontinuální systémy, rozlišení, sulfatovaný
 β -cyklodextrin, pseudoefedrin.

Úvod

Chirální separace kapilární elektroforézou

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je moderní analytická separační metoda vyznačující se vysokou účinností. Aplikace kapilární elektroforézy sahají do oblasti separací biomakromolekul jako proteinů, sacharidů, oligonukleotidů, restrikčních fragmentů DNA, resp. analýzy obsahu buněk¹. Díky své jednoduchosti, variabilitě a účinnosti dosahuje kapilární elektroforéza výrazných úspěchů i v oblasti separace chirálních látek^{2,3}.

Analýza optických isomerů látky A kapilární elektroforézou je založena na tvorbě diastereoisomerních komplexů analytu s chirálním selektorem (CS):



Existují dva přístupy k analýze chirálních látek označované jako metody přímé a nepřímé. Nepřímé metody analýzy chirálních látek se vyznačují tvorbou diastereoisomerních komplexů jejich derivatizací před vlastní separací v achirálním prostředí. Tyto metody mají oproti metodám přímým výhodu v dosahování nízkých detekčních limitů, naproti tomu mají řadu nevýhod, jako problematickou validaci derivatizace, možnost tvorby vedlejších produktů, resp. racemizace aj., které způsobují jejich omezené použití^{3,4}.

Přímé metody jsou založené na dynamické tvorbě přechodných komplexů v průběhu vlastního separačního procesu. K tvorbě diastereoisomerních komplexů přispívají intermolekulární interakce selektoru a analytu, jako jsou coulombické repulze a atrakce, tvorba vodíkových vazeb, hydrofobní interakce, interakce π - π , interakce dipól-dipól apod. Vlastní rozlišení enantiomerů je založeno na představené „třibodové“ interakce analytů a chirálního selektoru^{4,5}.

Jako chirální selektory se nejčastěji používají cyklo-dextriny a jejich ionizovatelné deriváty⁶, crown ethery⁷, proteiny⁸ a makrocyclická antibiotika⁹. Mezi další používané selektory patří lineární oligosacharidy a polysacharidy, chirální micely, kalixareny aj.^{3,5}. Cyklodextriny se nejčastěji používají především z důvodů jejich snadné rozpustnosti ve vodných prostředích a jejich nízké absorpce v UV oblasti. Důležitou roli hraje i možnost použít derivatizované cyklodextriny, které podléhají ionizaci a tak mohou lépe interagovat s analyty⁶. Naopak použití makromolekulárních selektorů s sebou přináší problémy s adsorpcí selektoru na stěny kapiláry a problémy s interferencí s analytem díky jejich absorpci záření v UV oblasti¹⁰. První problém lze řešit dynamickou modifikací povrchu kapiláry, resp. pokrytím povrchu kapiláry derivatizací. Druhý problém je řešen použitím nepřímé UV detekce analytů nebo použitím techniky částečného plnění kapiláry (partial filling)^{3,10}.

Techniky částečného plnění kapiláry

Principem technik částečného plnění (partial filling technique – PFT) je naplnění částí kapiláry elektrolytu s různým složením. Při separacích chirálních látek je část kapiláry k detekční cele naplněna základním elektrolytem obsahujícím chirální selektor, zbylý prostor kapiláry je vyplněn základním elektrolytem bez chirálního selektoru. Kapilára je rovněž ponořena do roztoku základního elektrolytu bez chirálního selektoru. Podle podmínek probíhá separace třemi způsoby: (i) zóna selektoru migruje od detektoru, (ii) zóna selektoru se během analýzy nepohybuje, (iii) zóna selektoru migruje stejným směrem jako analyty. Tyto systémy umožňují přímou detekci analytů bez interferencí s chirálním selektorem¹¹.

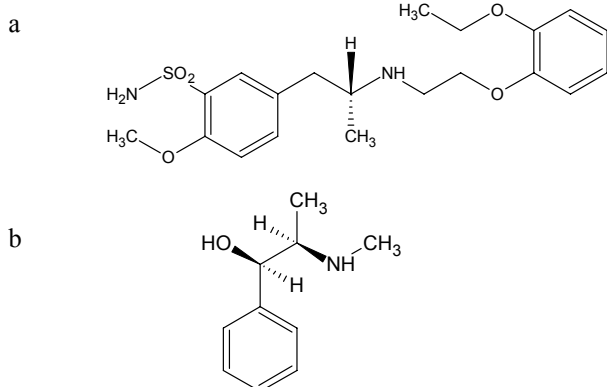
Technika částečného plnění se nevyužívá pouze u chirálních separací, ale také např. při spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií, kde eliminuje možná znečištění iontového zdroje¹⁰ nebo při afinitní kapilární elektroforéze, kde umožňuje např. studovat nekvalitní interakce mezi receptory a ligandy¹². Částečného plnění kapiláry v CZE se také využívá při zakoncentrování analytů^{13,14}.

Jan Petr získal 3. místo v soutěži o cenu firmy Merck 2004 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

Tamsulosin, efedrin

Tamsulosin, 5-(2-{{2-(*o*-ethoxyphenoxy)ethyl}amino}propyl)-2-methoxybenzen-1-sulfonamid je ve formě *R* isomeru (viz obr. 1) účinnou látkou při léčbě benigní hyperplazie prostaty. Tamsulosin působí jako selektivní antagonist α_{1A} -adrenoreceptorů, čímž reguluje kontrakci hladkého svalstva prostaty¹⁵. V literatuře byla popsána metoda separace enantiomerů tamsulosinu metodou HPLC¹⁶. Chirální separaci metodou kapilární elektroforézy se věnuje nedávná práce z našeho pracoviště¹⁷.

Efedrin, 1-fenyl-2-(methylamino)propan-1-ol (viz obr. 1) má dvě centra chiralidy, enantiomery se shodnou absolutní konfigurací na obou centrech (*S,S* nebo *R,R*) někdy nazýváme (\pm)-pseudefedrin a enantiomery s rozdílnou absolutní konfigurací (*S,R* nebo *R,S*) nazýváme (\pm)-efedrin. Efedrin patří např. spolu s amfetaminem, adrenalinem aj. do skupiny sympatomimetik, tj. látek ovlivňujících centrální nervovou soustavu. Jeho farmakologický význam spočívá ve vazokonstrikčních, dekongesčních a bronchodilatačních účincích^{18,19}. Ševčík a spol. popsal separaci enantiomerů efedrinu kapilární elektroforézou s použitím β -CD (cit.²⁰).



Obr. 1. Vzorec (a) *(R)*-tamsulosinu a vzorec (b) *(-)*-pseudefedrinu

Tato práce popisuje studium využití techniky částečného plnění kapiláry k separaci enantiomerů tamsulosinu a efedrinu s použitím sulfatovaného β -cyklodextrinu.

Experimentální část

Chemikálie

Standardy *(R)*- a *(S)*-tamsulosinu byly získány od firmy Farmak, a.s. (Olomouc, Česká republika). Komponenty základních elektrolytů (kyselina fosforečná, hydroxid sodný a tris(hydroxymethyl)aminomethan (tris)), stejně jako chirální selektor sulfatovaný- β -cyklodextrin (*s*- β -CD) byly získány od firmy Sigma (St. Louis, USA). Jako markery elektroosmotického toku (EOF) byly použity mesityloxid, ethanol a isopropylalkohol od firmy Sigma (St. Louis, USA). Všechny použité látky byly čistoty p.a.

Pro přípravu všech roztoků byla použita deionizovaná voda $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ (Elga, Bucks, Anglie).

Aparatura a experimentální podmínky

Měření bylo prováděno na přístroji HP^{3D} CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) s detektorem s diodovým polem snímajícím při 210 nm. Pro měření byla použita nepokrytá křemenná kapilára (CACO-Sila Tubing and Optical Fibers, Slovenská republika) s vnitřním průměrem 50 μm o celkové délce 33 cm (efektivní délka 24,5 cm). Kapilára byla termostátována na 25 °C. Aplikované separační napětí bylo 20 kV.

Měření bylo rovněž prováděno na přístroji zkonstruovaném v naší laboratoři s použitím UV detektoru Jasco snímajícím při 210 nm. Pro měření byla použita nepokrytá křemenná kapilára (CACO-Sila Tubing and Optical Fibers, Slovenská republika) s vnitřním průměrem 50 μm o celkové délce 39 cm (efektivní délka 26 cm). Byl použit stabilizovaný zdroj vysokého napětí Spellman CZE1000R (Spellman, New York, USA), bylo aplikováno napětí 15 kV. Analýzy byly prováděny při laboratorní teplotě (25 °C \pm 1 °C).

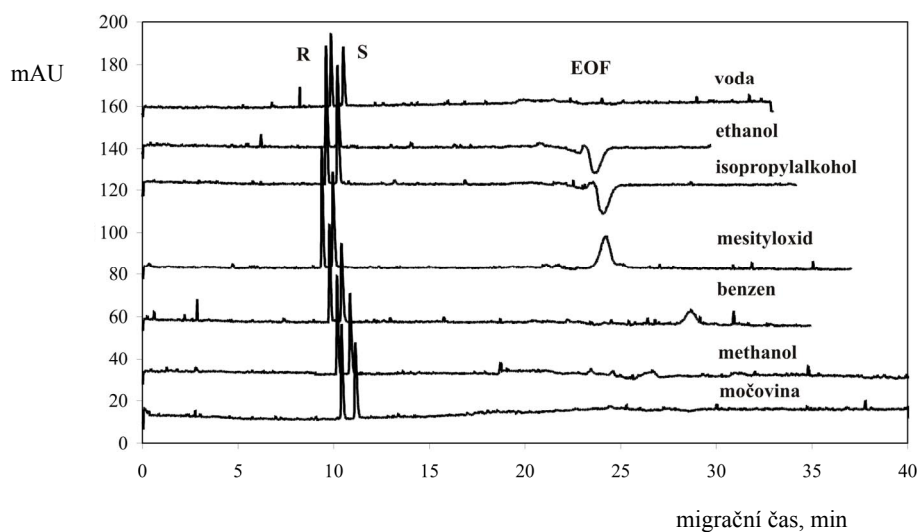
Základní elektrolyty o koncentraci 100 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním kyseliny fosforečné v deionizované vodě, pH bylo upraveno hydroxidem sodným, resp. tris na hodnotu 2,5. Základní roztoky s přísadkou *s*- β -CD byly připraveny rozpuštěním daného množství *s*- β -CD v příslušném základním elektrolytu. Standardní roztoky o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ *(R)*- a *(S)*-tamsulosinu byly připraveny rozpuštěním *(R)*- a *(S)*-tamsulosinu v příslušném základním elektrolytu. Elektroosmotický tok (EOF) byl měřen s použitím mesityloxidu a isopropylalkoholu. Markery EOF byly přidány ke standardnímu roztoku *(R)*- a *(S)*-tamsulosinu.

Každý den byla kapilára kondicionována promytím 0,1 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH (5 min), vodou (5 min), 0,1 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HCl (5 min), vodou (5 min) a základním elektrolytem (15 min). Mezi každým měřením byla kapilára promývána základním elektrolytem 5 min.

Výsledky a diskuse

Kvůli experimentálním obtížím při měření elektroosmotického toku mesityloxidem jsme hledali jiné markery EOF pro tato měření. Ke studiu jsme použili vodu, methanol, ethanol, isopropylalkohol, mesityloxid, močovinu a benzen. Benzen byl použit jako srovnávací marker, protože interaguje se *s*- β -CD (cit.²¹). Porovnání markerů je uvedeno na obr. 2, resp. v tabulce I. Vypočtené mobility markerů EOF mimo benzen jsou podle *t*-testu na hladině významnosti 0,05 shodné. Bylo pozorováno, že použití isopropylalkoholu pro měření EOF v těchto systémech je nejvýhodnější.

Využití techniky částečného plnění kapiláry k separaci enantiomerů tamsulosinu bylo možné z důvodu



Obr. 2. Elektroforeogramy s použitím různých markerů elektroosmotického toku; Základní elektrolyt 0,1 M fosfát/Na, pH 2,5, s 3 g.l⁻¹ s-β-CD; kapilára 50 μm i.d., 39 cm / 26 cm, napětí 15 kV

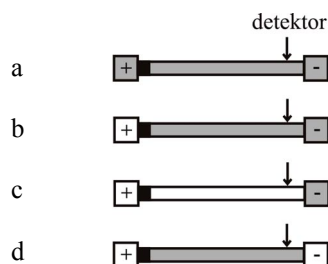
Tabulka I
Porovnání měření elektroosmotického toku (EOF) s různými markery ($n = 5$)

Marker EOF	Mobilita EOF [10 ⁻⁹ m ² .Vs ⁻¹]	Směrodatná odchylka [10 ⁻⁹ m ² .Vs ⁻¹]
Voda	neměřitelná	–
Methanol	neměřitelná	–
Ethanol	4,72	0,08
Isopropylalkohol	4,67	0,10
Mesityloxid	4,64	0,09
Močovina	neměřitelná	–
Benzen	3,90	0,11

použití sulfátovaného β-cyklodextrinu jako chirálního selektoru. Sulfátovaný β-cyklodextrin nese v prostředí fosfátového pufru (pH 2,5) opačný náboj než analyt tamsulosin. Oproti klasickému uspořádání kapilární elektroforezy, kdy je chirální selektor umístěn v celém systému: nádobka ze strany dávkování („inlet“)-kapilára - nádobka ze strany detektoru („outlet“) (systém (a)), lze získat další tři možné separační systémy (viz obr. 3), kdy je chirální selektor umístěn v kapiláře a „outletu“ (systém (b)), chirální selektor umístěn pouze v „outletu“ (systém (c)) a chirální selektor umístěn pouze v kapiláře (systém (d)). Příklad separace enantiomerů tamsulosinu v těchto systémech je na obr. 4.

Provedli jsme srovnání rozlišení enantiomerů v jednotlivých systémech, viz tabulka II. Z dat je patrné, že hodnota rozlišení silně závisí na použitém systému. Tyto systémy se liší především dobou interakce chirálního selektoru s analytem. Na rozhraní různě vodivých zón základního elektrolytu se selektorem a základního elektrolytu bez selektoru může také docházet k fokusačním jevům^{13,14}. Ve shodě s tímto tvrzením dosáhneme nejvyššího rozlišení při použití systému, kdy je chirální selektor umístěn v kapiláře a „outletu“ (uspořádání (b)). V tomto systému je doba interakce selektoru s analytem nejdelší a zároveň může docházet k fokusačním jevům. Naproti tomu použití systémů (b) a (c) výrazně šetří chirální selektor. Spotřeba selektoru v systému (d) je minimální a zároveň je dosažené rozlišení pro praxi dostačující, což umožňuje pracovat i s drahými popř. málo stabilními selektory.

Popsaný způsob jsme dále testovali na separaci enantiomerů pseudoefedrinu. Modifikovali jsme postup popsa-

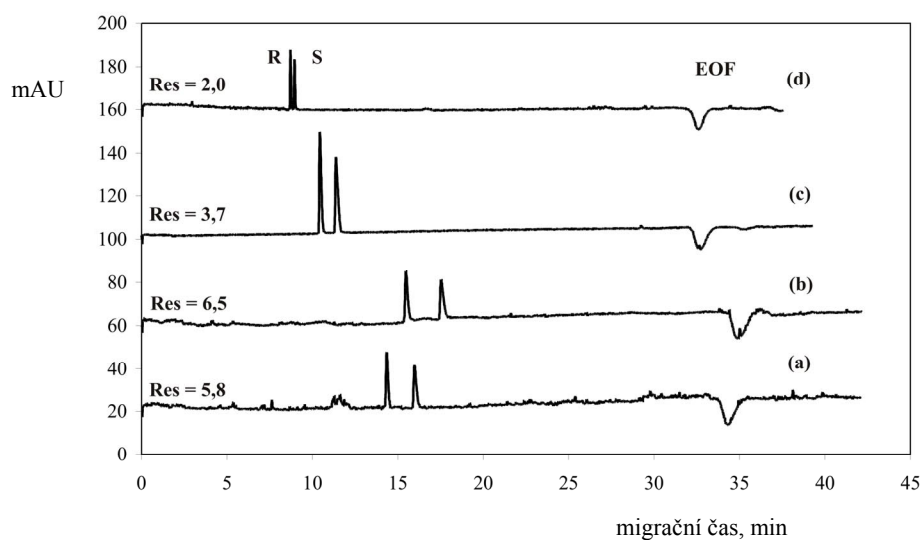


Obr. 3. Experimentální uspořádání; (a) chirální selektor je umístěn v celém systému („inlet“-kapilára-„outlet“), (b) chirální selektor je umístěn v kapiláře a „outletu“, (c) chirální selektor je pouze v „outletu“, resp. (d) chirální selektor je pouze v kapiláře; □ základní elektrolyt, ▣ základní elektrolyt s přidavkem s-β-CD, ■ zóna vzorku

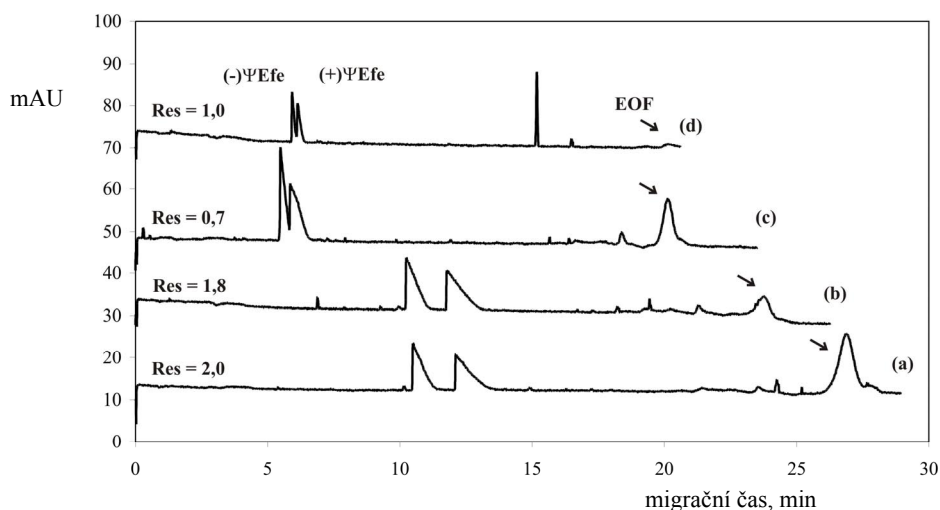
Tabulka II

Porovnání hodnot rozlišení enantiomerů tamsulosinu v jednotlivých separačních systémech (viz obr. 3)

Koncentrace s- β -CD [g.l ⁻¹]	Rozlišení v systému (a)		Rozlišení v systému (b)		Rozlišení v systému (c)		Rozlišení v systému (d)	
	fosfát/Na	fosfát/tris	fosfát/Na	fosfát/tris	fosfát/Na	fosfát/tris	fosfát/Na	fosfát/tris
1	0,88	2,15	0,94	1,81	0,58	0,96	0,53	0,93
3	2,60	5,80	3,10	6,46	1,50	3,68	1,00	2,02
5	4,60	9,16	5,20	10,55	2,50	8,46	0,90	1,82



Obr. 4. Příklad separace enantiomerů tamsulosinu v diskontinuálních systémech; Systémy: (a) chirální selektor je umístěn v celém systému („inlet“-kapilára-„outlet“), (b) chirální selektor je umístěn v kapiláře a „outletu“, (c) chirální selektor je pouze v „outletu“, resp. (d) chirální selektor je pouze v kapiláře; Základní elektrolyt 0,1 M fosfát/tris, pH 2,5, s 3 g.l⁻¹ s- β -CD, kapilára 50 μ m i.d., 39 cm / 26 cm, napětí 15 kV



Obr. 5. Příklad separace enantiomerů pseudoefedrinu v diskontinuálních systémech; Systémy: (a) chirální selektor je umístěn v celém systému („inlet“-kapilára-„outlet“), (b) chirální selektor je umístěn v kapiláře a „outletu“, (c) chirální selektor je pouze v „outletu“, resp. (d) chirální selektor je pouze v kapiláře; Základní elektrolyt: 0,1 M fosfát/Na, pH 2,5, s 3 g.l⁻¹ s- β -CD, kapilára 50 μ m i.d., 39 cm / 26 cm, napětí 15 kV

ný Ševčíkem a spol.²⁰ použitím fosfátového pufru (pH 2,5) a s- β -CD jako chirálního selektoru a porovnali jsme rozlišení enantiomerů pseudoefedrinu v diskontinuálních systémech. Příklad separace je na obr. 5. Hodnoty rozlišení opět silně závisí na použitém systému. Nejlepšího rozlišení jsme shodně dosáhli v systému (a) s chirálním selektorem v celém systému a v systému (b) se selektorem v kapiláře a „outletu“.

Je zřejmé, že použití diskontinuálních systémů tedy výrazně ovlivňuje chirální separaci a rozlišení enantiomerů. Nejvyššího rozlišení při separaci enantiomerů tamsulosinu jsme dosáhli v uspořádání, kde byl chirální selektor umístěn v kapiláře a „outletu“. Nejvyššího rozlišení při separaci enantiomerů pseudoefedrinu jsme dosáhli v uspořádání, kde byl chirální selektor umístěn v kapiláře a „outletu“, resp. v celém systému („inlet“-kapilára-„outlet“).

Závěr

V naší práci jsme ukázali, že při separaci v daném prostředí opačně nabitého analytu (tamsulosin, efedrin) než je chirální selektor (s- β -CD) je možno použít různá separační uspořádání lišící se dobou interakce selektoru s analytem.

Jak se neokrást o úspěšnou chirální separaci kapilární elektroforézou? Byl ukázán často opomíjený fakt, že pro chirální separace není nejvýhodnější používat systém s chirálním selektorem v „inletu“, kapiláře a „outletu“. Lze tvrdit, že při použití diskontinuálních systémů a snaze dosáhnout nejvyššího rozlišení je výhodné provádět chirální separaci v uspořádání s umístěním chirálního selektoru v kapiláře a „outletu“. Nezanedbatelnou roli zde hraje i ekonomická stránka separace, neboť toto uspořádání výrazně šetří chirální selektor. Nesmíme ovšem opomenout fakt, že se rozlišení zlepšuje pouze v případě, že chirální selektor nese náboj a může tedy migrovat v kapiláře svou vlastní rychlostí.

Autoři děkují Grantové agentuře České republiky (číslo grantu 203/03/0161) za finanční podporu práce.

LITERATURA

- Landers J. P. (Eds.): *Handbook of Capillary Electrophoresis*. CRC Press, Boca Raton 1994.
- Baker D. R.: *Capillary Electrophoresis*. John Wiley & Sons, New York 1995.
- Rizzi A.: *Electrophoresis* 22, 3079 (2001).
- Vespalec R., Boček P.: *Chem. Rev.* 100, 3715 (2000).
- Ševčík J., Tesařová E., Stránský Z.: *Chem. Listy* 95, 139 (2001).
- Fanali S.: *J. Chromatogr., A* 875, 89 (2000).
- Kuhn R.: *Electrophoresis* 20, 2605 (1999).
- Haginaka J.: *J. Chromatogr., A* 875, 235 (2000).
- Ward T. J., Farris A. B.: *J. Chromatogr., A* 906, 73 (2001).
- Amini A.: *Electrophoresis* 22, 3107 (2001).
- Amini A., Paulsen-Sörman U., Westerlund D.: *Chromatographia* 50, 497 (1999).
- Villareal V., Kaddis J., Azad M., Zurita C., Silva I., Hernandez L., Rudolph M., Moran J., Gomez F. A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 822 (2003).
- Urbánek M., Křivánková L., Boček P.: *Electrophoresis* 24, 466 (2003).
- Beckers J. L., Boček P.: *Electrophoresis* 21, 2747 (2000).
- Šafařík L., Povýšil C., v knize: *Urologie* (Dvořáček J., ed.), díl III., kap. 46. ISV nakladatelství, Praha 1998.
- Zhang Z.F., Yang G.L., Liang G.J., Liu H.Y., Chen Y.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34, 689 (2004).
- Maier V., Tesařová E., Coufal P., Gavenda A., Barták P., Bednář P., Ševčík J.: *27th Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Nice, 15 – 19 June 2003*, Book of Abstracts (Sioffi A. M., ed.), str. 95. Nice 2003.
- Suchopár J. (Eds.): *Remedia Compendium*. Panax, Praha 1999.
- Jirovský D., Lemr K., Ševčík J., Smysl B., Stránský Z.: *Forensic. Sci. Int.* 96, 61 (1998).
- Ševčík J., Lemr K., Smysl B., Jirovský D., Hradil P.: *J. Liq. Chromatogr.* 21, 2473 (1998).
- Chankvetadze B.: *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*. John Wiley, Chichester 1997.

J. Petr^a, V. Maier^a, J. Horáková^a, E. Tesařová^b, and J. Ševčík^a (^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic, ^bDepartment of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Natural Science, Charles University, Prague, Czech Republic): **How To Achieve Successful Chiral Separation by Capillary Electrophoresis**

This work is devoted to enhancing the potential of capillary electrophoresis as a separation technique. Improvement of chiral resolution of organic bases in an acid electrolyte using sulfated β -cyclodextrin as an anionic chiral selector is demonstrated on an example of chiral separation of tamsulosin and ephedrine. Better resolution of enantiomers of the bases can be achieved by changing the concentration of a chiral selector in compartments of the separation system (inlet – capillary – outlet). Migration of the chiral selector in the direction opposite to that of the cationic analytes was utilized and thus the resolution could be improved. The best resolution was obtained if the chiral selector was in the working electrolyte in the capillary and outlet vial while the inlet vial contained only the background electrolyte. In contrast, if the chiral selector is either only in the capillary or in the whole electrophoresis system, a lower resolution was obtained though both the systems are most frequently employed in practice.