

ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE BENZOTHIAZOLOVÝCH DERIVÁTŮ AMINOKYSELIN V POKRYTÉ KAPILÁŘE

Zuzana Nováková¹, Petr Česla¹, Jan Fischer¹ a Vladimír Pejchal²

¹*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,
Studentská 573, 532 10 Pardubice*

²*Ústav organické chemie a technologie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita
Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice*

Abstract

The aim of this work was to optimize the electrophoretic separation of chiral benzothiazole derivatives of amino acids in a coated capillary. Separation was performed by capillary zone electrophoresis using cyclodextrins as chiral selector in the background electrolyte. The effect of the electrolyte pH value on separation of derivatives of amino acids was studied. Further, the separation efficiency in a coated and non-coated capillary was compared.

Souhrn

Cílem této práce bylo optimalizovat elektroforetickou separaci benzothiazolových derivátů aminokyselin v pokryté kapiláře polydimethylakrylamidem. Separace byla provedena pomocí kapilární zónové elektroforézy za použití cyklodextrinů jako chirálního selektoru v základním elektrolytu. Byl studován vliv pH na separaci benzothiazolových derivátů a vliv přídavku dvou různých cyklodextrinů do základního elektrolytu na separaci derivátů. Dále byla ověřena separační účinnost v pokryté a neošetřené kapiláře.

1. Úvod

Benzothiazolové deriváty jsou aromatické heterocyklické sloučeniny, od kterých existuje veliký počet derivátů. U některých derivátů byly prokázány příznivé biologické a protirakovinové účinky [1]. Benzothiazolové deriváty aminokyselin vykazují optickou aktivitu a jejich enantiomery nelze rozdělit za běžných podmínek, a proto je zapotřebí do systému vložit médium, které změní povahu chirálních látek. V poslední době je veliký zájem o separaci chirálních látek v mnoha odvětvích, a to především ve farmaceutickém průmyslu. Je známo, že enantiomery vykazují odlišné farmakologické, toxikologické a biologické vlastnosti [2]. Často používané separační techniky pro separaci chirálních látek jsou kapilární elektroforéza (CE) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). CE je separační technika, která poskytuje rychlé analýzy s vysokou účinností a rozlišením, v důsledku použití elektrického

pole o vysoké intenzitě [3]. Kapilární elektroforéza obecně a především kapilární zónová elektroforéza (CZE) je metoda vhodná pro separaci enantiomerů, jestliže do základního elektrolytu je přidán chirální selektor. Přidaný chirální selektor do základního elektrolytu (BGE) vytvoří s enantiomerem reverzibilní rovnovážný stav, který způsobí, že část doby enantiomery migrují volně v BGE a část doby se pohybují jako enantiomer-selektorový komplex. Pro uskutečnění separace musí být splněno několik požadavků. Zejména musí mít selektor nebo enantiomer náboj. Dále enantiomery jako chirální molekuly musí mít různou afinitu k chirálnímu selektoru anebo musí mít enantiomer-selektorový komplex odlišnou pohyblivost [4]. Nejběžnějšími chirálními selektory (CHS) jsou cykloextriny, cyklofruktanty, lineární, oligo- a polysacharidy, větvené polysacharidy, povrchově aktivní látky, polymery, antibiotika, crown-ethery [5]. Dalším postupem pro zlepšení rozlišení enantiomerů v CE je upravení vnitřního povrchu kapiláry, a to buď s použitím dynamické modifikace, nebo kovalentně vázaným povlakem [6,7]. Vnitřní povrch neošetřené kapiláry obsahuje velké množství silanolových skupin, které jsou velmi reaktivní a umožňují měnit charakter povrchu a jeho stabilitu v různých oblastech pH. Modifikace povrchu se provádí z důvodu potlačení interakcí roztoku elektrolytu s povrchem kapiláry, které přispívají k rozšiřování a chvostování zón pomalou adsorpcí a desorpcí, ale také ke kontrole velikosti a směru elektroosmotického toku [8].

V této práci jsme se zabývali chirální separací benzothiazolových derivátů aminokyselin (AMK), konkrétně derivátů leucinu a fenylalaninu. Nejdříve bylo zapotřebí optimalizovat podmínky, při kterých se dané separace budou provádět. Byl studován vliv pH na migraci vybraných benzothiazolových derivátů uvedených aminokyselin. Poté byl zkoumán vliv pokrytí kapiláry neutrálním polymerem na separaci derivátů a porovnána účinnosti separace. Nakonec byl ověřován vliv elektrolytu s přísadkou dvou různých cykloextrinů (CD) s různou koncentrací na separaci derivátů.

2. Experimentální část

2.1. Chemikálie

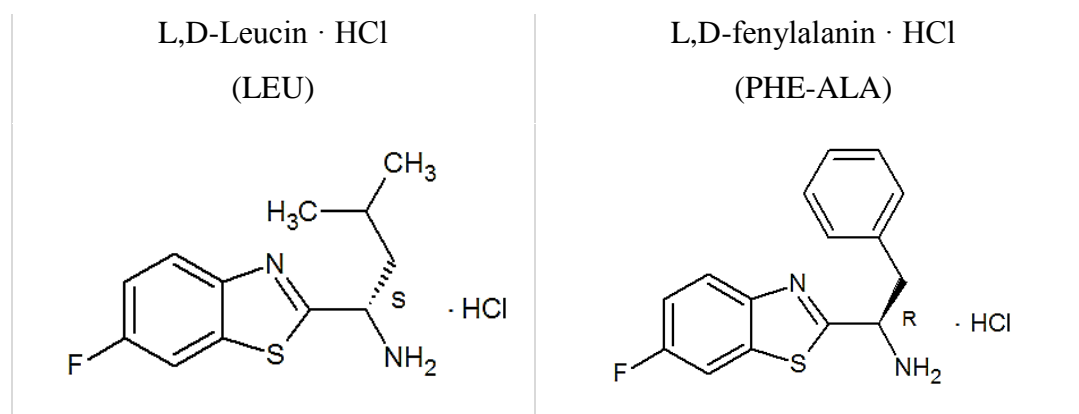
Pro přípravu základního elektrolytu byly použity dihydrogenfosforečnan sodný a draselný, které byly dodány od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Kyselina fosforečná byla dodána od firmy Lachema (Neratovice, ČR). Chirální selektory (β -cykloextrin, β -CD a 2-hydroxypropyl- γ -cykloextrin, 2-HP- γ -CD) byly od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hydroxid sodný byl získán od firmy J.T. Baker (Deventer, Holandsko). Deionizovaná ultračistá voda byla upravena pomocí přístroje Mili-Q Reference

system (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Aceton a peroxidisíran draselný byly od PENTA (Praha, ČR), γ -methakryloxypropyltrimetoxysilan (MPT) a N,N,N',N'- trimetyl-etylendiamin (TEMED) byly obstarány od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko), N,N-dimetyl-akrylamid (DMA) (99%) byl získán od firmy Aldrich, propan-2-ol, kyselina octová (99%) a kyselina chlorovodíková byly od firmy LachNer (Neratovice, ČR).

2.2. Přístroje a zařízení

Analýzy byly provedeny pomocí kapilární elektroforézy Capel 105M (Lumex, St. Petersburg, Rusko). Přístroj je vybaven autosamplerem, zdrojem napětí, kapilárou chlazenou vodou a UV detektorem a je řízen programem Elforun. Další část separací byla prováděna na kapilární elektroforéze Agilent ^{3D}CE (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), kdy při analýzách bylo snímáno celé spektrum vlnových délek v rozsahu 200-400 nm. Pro účely vyhodnocení byla použita vlnová délka 220 nm.

2.3. Analyzované deriváty sloučenin



Obrázek 1: Benzothiazolové deriváty aminokyselin

Z analyzovaných benzothiazolových derivátů aminokyselin (obr. 1) byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 1 g/l, které byly rozpuštěny v deionizované vodě. Do nádobek o objemu 1,5 ml bylo odpipetováno 50 μ l zásobního roztoku analyzovaných sloučenin, které byly naředěny 950 μ l deionizované vody.

2.4. Materiály

K analýzám byla použita křemenná kapilára od firmy Agilent (Palo Alto, CA, USA) potažená ochrannou vrstvou polyimidu s vnitřním průměrem 50 μ m. Pro měření byla použita 60 cm kapilára (52 cm délka k detektoru).

2.5. Metody analýzy

Separace byly prováděny ve 100 mM fosfátovém pufru o pH 3,5. Pro separace byl použit základní elektrolyt s přidavkem cyklodextrinu v koncentračním rozsahu 10 – 100 mM. Analýzy probíhaly při teplotách 17, 20, 25 °C. Nová kapilára byla stabilizována promytím 0,1 M roztokem NaOH a redestilovanou vodou po dobu 5 minut tlakem 1 Bar. Před každým měřením byla nepokrytá kapilára promyta 0,1 M hydroxidem sodným po dobu 2 minut, deionizovanou vodou po 2 min a základním elektrolytem po 2 min. Pokrytá kapilára byla promyta pouze deionizovanou vodou a základním elektrolytem po dobu 2 minut. Vzorky analyzovaných sloučenin byly dávkovány tlakem 50 mBar po dobu 10 s. Vkládané napětí 20 a 25 kV (kladná polarita na vstupní elektrodě) bylo použito pro oba typy kapilár. Detekce byla uskutečněna při 220 nm.

2.6. Proces pokrývání kapiláry

2.6.1. Iniclace vnitřního povrchu kapiláry

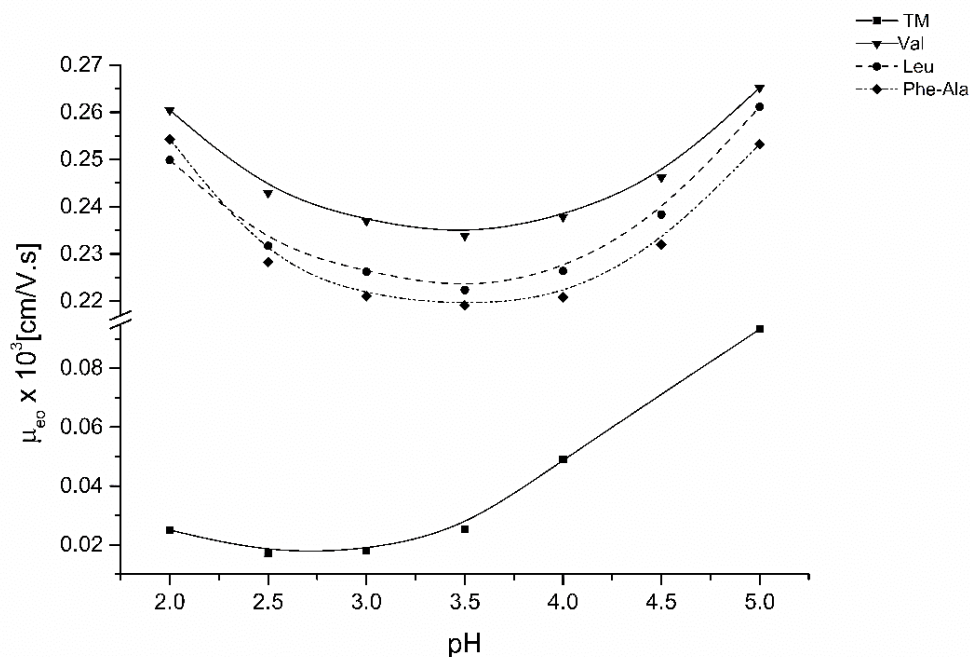
Nová kapilára byla nejprve promyta acetonem po dobu 10 minut, poté byla vypláchnuta 1 M NaOH po dobu 30 minut a zneutralizována 0.1 M HCl po dobu 10 minut. Pak byla kapilára naplněna roztokem 10% (v/v) MPT v kyselině octové a acetonu (100 µl MPT + 450 µl kyselina octová + 450 µl aceton). Oba konce kapiláry byly uzavřeny gumovými septy a nechány minimálně 20 hodin při laboratorní teplotě. Potom byla kapilára promyta acetonem.

2.6.2. Proces pokrývání

Nejprve byl přichystán roztok DMA, který byl připraven smícháním s deionizovanou vodou a odvzdušněn pod vakuem ve vodní lázni při 45 °C po dobu 20 min. Z tohoto roztoku byl připraven 1% roztok DMA (35 µl propanol-2-ol + 5 µl 10% (v/v) TEMED + 5 µl 10% (v/v) APS), se kterým byla naplněna kapilára. Poté byly oba konce kapiláry uzavřeny septy a kapilára byla nechána v sušárně při 50 °C po dobu 3 hodin. Pak byla kapilára zchlazena, profouknuta dusíkem a nezreagovaný monomer byl vypláchnut deionizovanou vodou po dobu 10 min.

3. Výsledky a diskuze

Cílem této práce bylo připravit pokrytou kapiláru polyakrylamidem, uskutečnění separace benzothiazolových derivátů aminokyselin a porovnání separací v nemodifikované kapiláře a v pokryté kapiláře. Dalším cílem práce bylo optimalizovat separace enantiomerů derivátů AMK v elektrolytu s přidavkem dvou různých typů cyklodextrinů v základním elektrolytu.

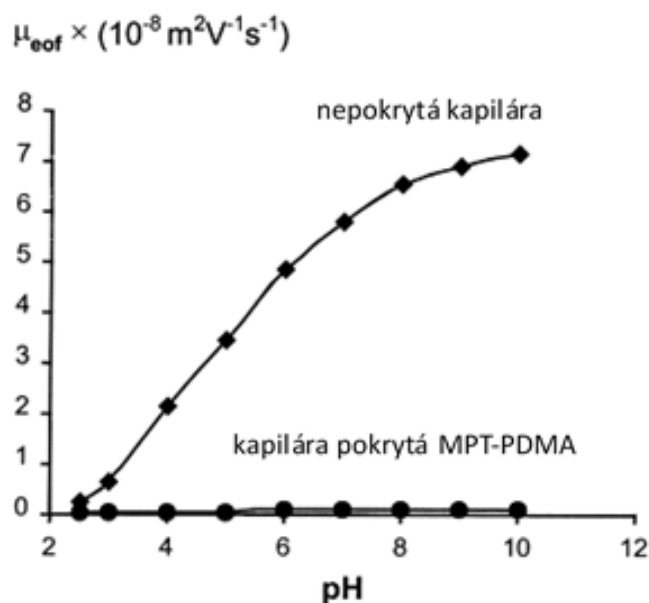


Obrázek 2: Závislost zdánlivé pohyblivosti derivátu AMK na pH základního elektrolytu.

Nejprve jsme se zabývali ověřením vlivu pH na pohyblivosti derivátu AMK (obr. 2). Analýzy probíhaly v nemodifikované kapiláře o rozměrech $50 \mu\text{m} \times 60 \text{cm}$, ve 100 mM fosfátovém pufru jako BGE při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a napětí 20 kV. Z grafu vyplývá, že v oblasti pH od 3.5 do 5.0 dochází ke zvyšování zdánlivé pohyblivosti derivátů, což je pravděpodobně způsobeno vlivem vzrůstající elektroosmózy v kapiláře. V oblasti pH od 2.0 do 3.5 dochází také k růstu migrační rychlostiderivátů, což je vyvoláno disociací aminoskupiny v aminokyselině. Pro naše účely jsme hledali takovou oblast pH, kde bude pohyblivost iontů nejnižší, aby mohlo dojít k dostatečně dlouhé interakci mezi analytem a chirálním selektorem (cyklodextrinem) při chirální separaci enantiomerů derivatizovaných AMK. Proto byla zvolena jako nejvhodnější oblast pH 3.50, která je zároveň vhodná i pro β -CD vzhledem jeho rozpustnosti.

Obrázek 3 ukazuje EOF jako funkci pH pro pokrytou a nepokrytou kapiláru, na kterém je vidět, že nejnižší EOF byl získán u kapiláry polymerizované dimethylakrylamidem. Analýzy proběhly ve 40 cm kapiláře (32 cm k detekčnímu okénku) $\times 50 \mu\text{m}$ i. d., v pufru 20 mM Tris-fosfát (pH 2.5 – 10). Detekce byla uskutečněna při 204 nm [9].

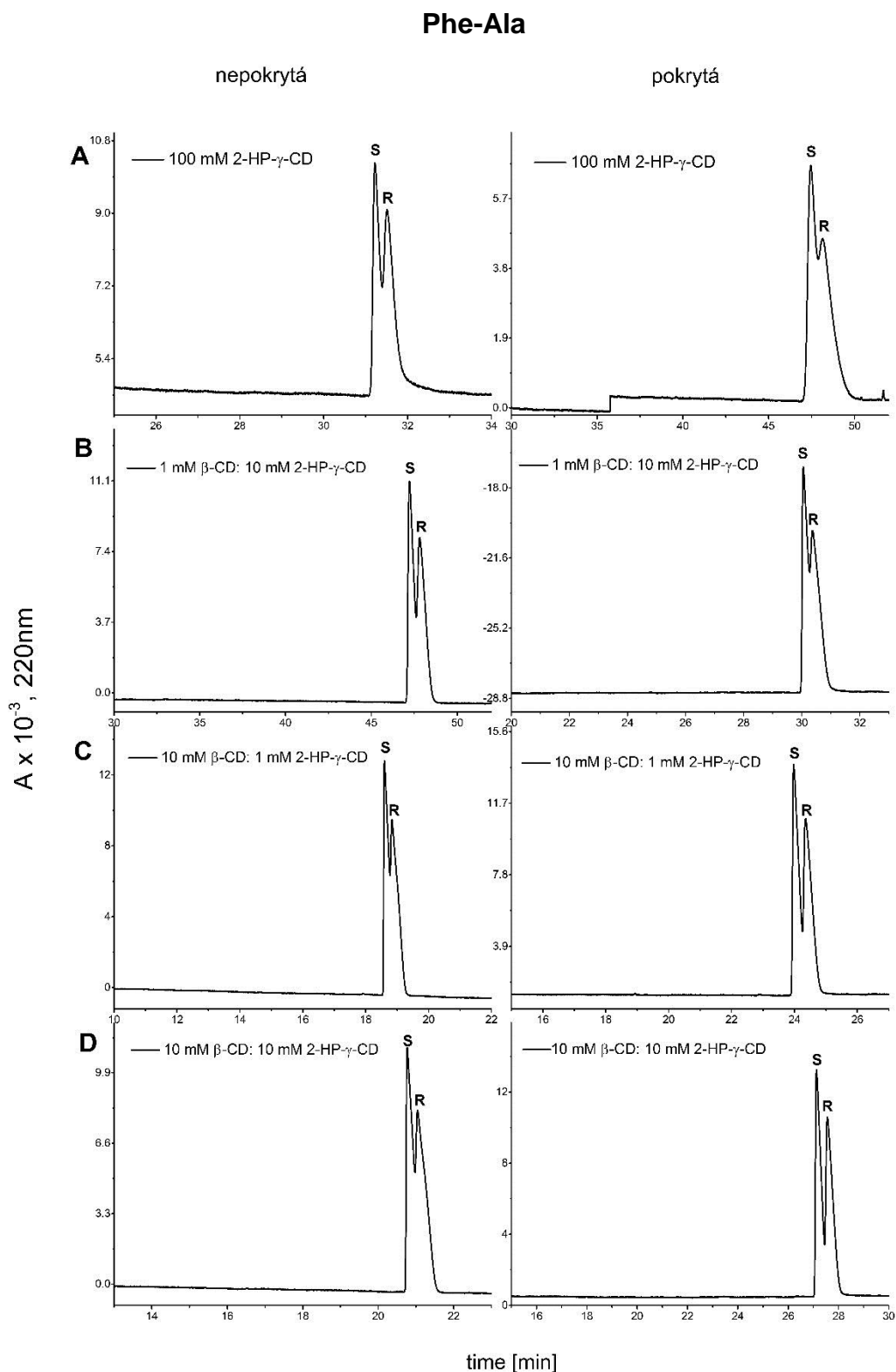
Na obrázku 4 je zobrazena separace směsi derivátu L,D-Phe-Ala, na základě které je možné porovnat vliv úpravy vnitřního povrchu kapiláry polymerizací dimethylakrylamidem a vliv různého zastoupení obou typů použitých cyklodextrinů v základním elektrolytu. Pro analýzy byly zvoleny čtyři typy elektrolytů, a to elektrolyt s přidavkem 100 mM 2-HP- γ -CD



Obrázek 3: Závislost EOF na pH v pokryté a neošetřené kapiláře [9].

(A), elektrolyt s přidavkem 1 mM β -CD s 10 mM 2-HP- γ -CD (B), s přidavkem 10 mM β -CD s 1 mM 2-HP- γ -CD (C) a s přidavkem 10 mM β -CD s 10 mM 2-HP- γ -CD (D). V nepokryté kapiláře došlo k nejlepšímu rozdělení dvojce enantiomerů v elektrolytu s přidavkem 100 mM 2-HP- γ -CD (obr.4A), ale naopak v pokryté kapiláře byla účinnost separace nízká. K nejlepšímu rozdělení enantiomerů v pokryté kapiláře došlo v elektrolytu s přidavkem 10 mM β -CD s 10 mM 2-HP- γ -CD, které je zobrazeno na obrázku 4D.

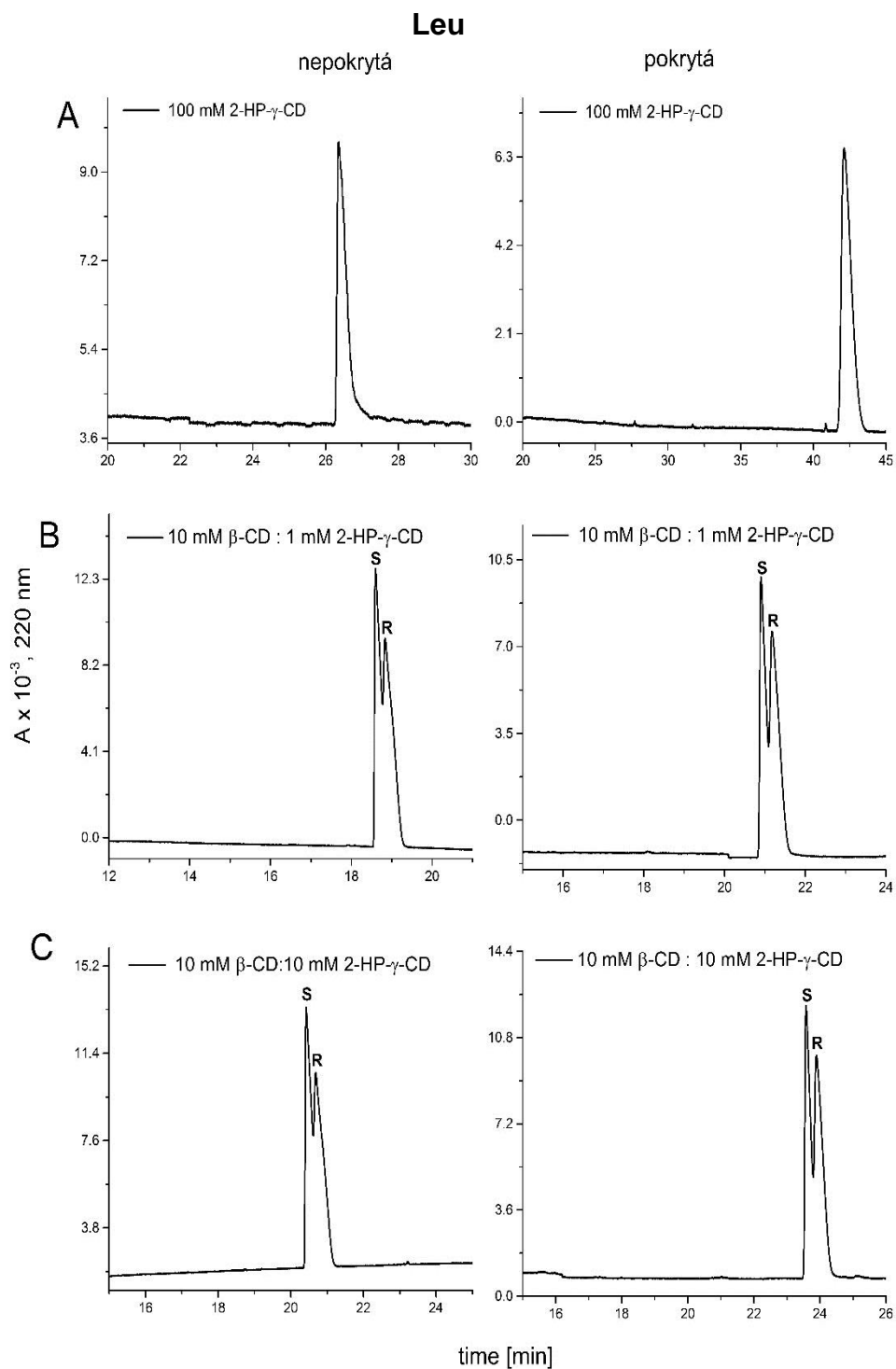
Na obrázku 5 je zobrazen záznam separace směsi derivátu L,D-Leu v pokryté a nemodifikované kapiláře, na kterých bylo možné porovnat vliv úpravy vnitřního povrchu kapiláry polymerizací dimethylakrylamidem a vliv různého zastoupení dvou typů cyklodextrinů v základním elektrolytu. Analýzy byly provedeny ve třech typech elektrolytů, a to v elektrolytu s přidavkem 100 mM 2-HP- γ -CD (A), elektrolyt s přidavkem 10 mM β -CD s 1 mM 2-HP- γ -CD (B) a s přidavkem 10 mM β -CD s 10 mM 2-HP- γ -CD (C). V elektrolytu s přidavkem 100 mM 2-HP- γ -CD nedošlo k rozdělení dvojce enantiomeru L-D-Leu jak v nepokryté kapiláře, tak ani v kapiláře pokryté polydimethylakrylamidem (obr. 5A). Nejvyššího rozlišení bylo dosaženo v pokryté kapiláře v elektrolytu s přidavkem 10 mM β -CD a 10 mM 2-HP- γ -CD (obr. 5C).



Obrázek 4: Porovnání separace benzothiazolového derivátu fenylalaninu v nepokryté kapiláře a v kapiláře pokryté dimethylakrylamidem.

Separční podmínky: 60 cm × 50 μm (i. d.), 25 °C, 20 kV.

(A) separace ve 100 mM 2-HP-γ-CD, (B) separace ve směsném elektrolytu s 1 mM β-CD + 10 mM 2-HP-γ-CD, (C) separace ve směsném elektrolytu s 10 mM β-CD + 1 mM 2-HP-γ-CD, (D) separace ve směsi elektrolytu s 10 mM β-CD + 10 mM 2-HP-γ-CD.



Obrázek 5: Porovnání separace benzothiazolového derivátu leucinu v nepokryté kapiláře a v kapiláře pokryté dimethylakrylamidem. Separací podmínky: 60 cm \times 50 μ m (i. d.), 25 $^{\circ}$ C, 20 kV. (A) separace ve 100 mM 2-HP- γ -CD, (B) separace ve směsném elektrolytu s 10 mM β -CD + 1 mM 2-HP- γ -CD, (C) separace ve směsném elektrolytu s 10 mM β -CD + 10 mM 2-HP- γ -CD.

Závěr

V této práci jsme se zaměřili na optimalizaci elektroforetické separace benzothiazolových derivátů aminokyselin v pokryté kapiláře polydimethylakrylamidem. Práce byla zaměřena na zjištění vlivu elektroosmotického toku na separaci benzothiazolových derivátů aminokyselin a na možnost rozdělit enantiomery obou derivátů aminokyselin přidávkem chirálního selektoru do základního elektrolytu. Z výsledků vyplývá, že pH elektrolytu a tím pádem i velikost elektroosmotického toku hrají značnou roli na separaci analyzovaných látek. Tento vliv elektroosmózy lze potlačit úpravou stěn kapiláry pokrytím vhodným polymerem, v našem případě polydimethylakrylamidem. Při chirálních separacích v pokryté kapiláře bylo dosaženo nejlepších výsledků v elektrolytu s přidávkem 10 mM β -CD a 10 mM 2-HP- γ -CD u obou typů benzothiazolových derivátů (Leu i Phe-Ala). V nepokryté kapiláře bylo dosaženo nejlepších výsledků pouze v elektrolytu s přidávkem 100 mM 2-HP- γ -CD u derivátu Phe-Ala.

Poděkování

Tato práce vznikla s podporou projektu SGSFChT_2016001 Univerzity Pardubice.

Literatura

- [1] De Wever H., Verachtert H.: *Water Res.* **11** (1997) 2673-2684.
- [2] Stavrou I.J., Mavroudi M.C., Kapnissi-Christodoulou C.P.: *Electrophoresis* **36** (2015) 101-123.
- [3] Vodrák D., Vulterin J.: *Analytická chemie*. SNTL, Praha, 1985, 262 s.
- [4] Wren S.A.C.: *J. Chromatogr. A* **636** (1993) 57-62.
- [5] Snopek J., Jelinek I., Smolkova-Keulemansova E., *J. Chromatogr.* **609** (1992) 1-17.
- [6] Souverain S., Geiser L., Rudaz S., Veuthey J.L.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40** (2006) 235-241.
- [7] Phinney K.W., Sander L.C.: *Chirality* **17** (2005) S65-S69.
- [8] Grossman P.D., Colburn J.C., Eds.: *Capillary Electrophoresis – Theory and Practice*. Academic Press, London, 1992, 352 s.
- [9] Wan H., Öhman M., Blomberg L.G.: *J. Chromatogr. A* **924** (2001) 59-70.

