Influence of Cyclodextrins to Isotachophoretic Separation of Selected Ions
(Vliv cyklodextrinů na izotachoforetickou separaci vybraných iontů)

Michaela Kovářová, Martin Bartoš, and Jana Vladyková
University of Pardubice, Faculty of Chemistry and Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentská 95, 532 10 Pardubice, Czech Republic,
E-mail: st34660@student.upce.cz

Abstract
This article is focused on isotachophoretic measurments using α- and β-cyclodextrins for separation similar structured molecules. Separation of enantiomers of glutamic acid were tested. The main aim of this work was to separate hydroxyl acids came from amino acids leucine and isoleucine. Three leading electrolyte, with pH 6, 3.6 and 3.4, were tested. The best leading electrolyte for separation was that one with pH 3.4 consisting of 10 mM HCl and 15 mM β-alanine with addition of 20 mM α-cyclodextrin. 20 mM acetic acid was used as a terminating electrolyte. The others electrolyte systems, i.e. with pH 6 and 3.6, failed.

Key words: Isotachophoresis, Amino acids, Leucine, Isoleucine, Cyclodextrins.

Úvod
Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy skládající se z α-1,4 spojených D-glukopyranosových jednotek. Vznikají enzymatickou degradací škrobu pomocí cyklodextringlykosyltransferasy bakteriálního původu (Bacilus macerans) [1]. Tato biochemická transformace poskytuje směs cyklických a lineárních oligosacharidů, které obsahují šest až více než sto glukosových jednotek. Nejvíce jsou zastoupeny makrocykly se šesti, sedmi a osmi jednotkami, které jsou označovány jako α-, β- a γ-cyklodextriny. Makrocyklus α-, β- a γ-cyklodextrinů připomíná dutou kavitu, na jejímž vnějším (širším) okraji se nachází sekundární hydroxylové skupiny a užší okraj je obklopen primárními hydroxyly. Z tohoto důvodu je vnějšek kavity hydrofilní, zatímco vnitřek má lipofilní charakter [1]. Cyklodextriny jsou schopné tvořit inkluzní sloučeniny, tj. jsou schopné do své kavity pojmout jinou organickou i anorganickou molekulu. Tento jev probíhá nejčastěji ve vodě nebo ve směsi vody a jiného polárního rozpouštědla.

Už na počátku 80. let se Tazaki a kol. zabýval použitím cyklodextrinů k lepší separovatelnosti anorganických iontů [2], polohových izomerů sulfonových kyselin [3] a iontových povrchově aktivních látek zahrnujících o-, m- a p-izomery benzenového kruhu [4]. Zaugg a kol. se zajímal o využití hydroxypropyl γ-cyklodextrinu při separaci barbiturátů a jejich metabolitů [5]. On-line spojení dvou izotachoforetických jednotek bylo využito k separaci organických a anorganických kyselin v doplňcích stravy [6].

Experimentální část
K přípravě standardních roztoků i roztoků elektrolytů byly použity chemikálie čistoty p.a. zakoupené od firem Lachema (Brno, ČR), Serva (Heidelberg, Německo), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Fluka a Reanal (Budapešť, Maďarsko).

Příprava aminokyselin k analýze
Bylo naváženo 0,13 g L-leucinu, obsah byl převeden do 50 ml odměrné baňky, bylo přidáno 5 ml 1 M kyseliny octové a 5 ml 1 M dusitanu sodného. Odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku a vložena do vroucí lázně, kde byla za současného míchání magnetickým míchadlem ponechána 10 minut. Po uplynutí této doby byla baňka ochlazena

pod proudem studené vody. U isoleucinu i valinu bylo postupováno stejně, včetně stejné navážky.

Přístroje a zařízení
K analýzám byl použit elektroforetický analyzátor EA 102 (Villa Labeco, Spišská Nová Ves, Slovensko). Tento přístroj je určen pro analytickou a mikropreparativní izotachoforetickou analýzu. Jedná se o dvoukolonový přístroj, do kterého je vzorek vnášen dávkovacím kohoutem o objemu 30 ul. Délka a průměr předseparační kapilární kolony je 160 x 0,8 mm, délka a průměr analytické kapilární kolony je 160 x 0,3 mm. Detekce je vodivostní s integrálním i derivačním výstupem. Pracovní proud je nastavitelný nezávisle pro oba elektrické okruhy. K měření pH elektrolytů byl použit laboratorní pH-metr inoLab pH 720 (WTW, Německo). K vážení pevných látek byly použity předvážky KERN 440-47 (KERN&Sohn Gmbh., Německo) a analytické váhy KERN 770 (KERN&Sohn Gmbh., Německo). K míchání a zahřívání připravených roztoků aminokyselin byl použit elektrický vařič a míchadlo (Fisher Scientific, USA).

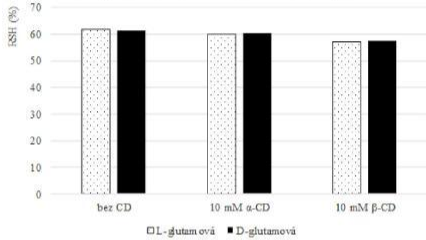
Použité elektrolytové systémy
I) L: 10 mM histidin + 10 mM histidin hydrochlorid (pH 6,0) T: 10 mM MES
II) L: 10 mM HCl + β-alanin (pH 3,6) T: 10 mM kyselina octová
III) L: 10 mM HCl + β-alanin (pH 3,4) T: 20 mM kyselina octová

Podmínky ITP separace
Separace probíhala v aniontovém módu ve dvou kolonách. V předseparační koloně byl hnací proud po celou dobu separace nastaven na 200 μA, v koloně analytické na 30 μA a během detekce byl snížen na 20 μA.

Výsledky a diskuze
Cílem této práce bylo zkoumání vlivu cyklodextrinů na separaci homologických řad vybraných skupin látek a izomerů. Byl zkoušen vliv cyklodextrinů na opticky aktivní látky, konkrétně enantiomery kyseliny glutamové. Hlavním cílem byla separace aminokyselin leucinu, isoleucinu a valinu po konverzi na příslušné α-hydroxykyseliny v návaznosti na izotachoforetické stanovení aminokyselin vycházející z van Slykeovy metody stanovení aminoskupin [7]. Jako první bylo zkoušeno odlišení optických izomerů kyseliny glutamové. Nejprve byly proměřeny standardy kyseliny L-glutamové a D-glutamové v elektrolytovém systému I (pH 6) bez přídavku cyklodextrinu. Následně byl do vedoucího elektrolytu přidán α-cyklodextrin o koncentraci 10 mmol/l a byly opět proměřeny tytéž standardy. Měření bylo opakováno také s přídavkem β-cyklodextrinu o koncentraci 10 mmol/l do vedoucího elektrolytu. Ve všech případech byla vypočtena relativní výška signálu (RSH) standardů. Bylo zjištěno, že α- i β-cyklodextrin zvyšují mobilitu kyseliny glutamové. Bohužel mají při této koncentraci oba cyklodextriny stejný vliv na mobility obou opticky aktivních izomerů, takže nedojde k jejich separaci (viz Obr. 1).

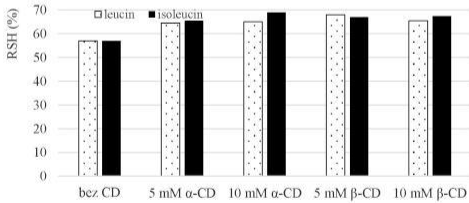
Následně byla zkoušena separace aminokyselin leucinu, isoleucinu a valinu. Tyto aminokyseliny jsou při pH používaných při izotachoforetické separaci téměř neutrální aminokyseliny. Aby bylo možné je izotachoforeticky analyzovat, je nutné je převést na ionty. Jednou z možností je konverze na α-hydroxykyseliny, vycházející z van Slykeovy metody stanovení aminoskupin. Metoda je založena na reakci aminokyseliny s přebytkem kyseliny dusité, při níž vzniká diazoniová sůl, která se následně rozkládá na příslušnou hydroxykyselinu a elementární dusík. Aminokyselina tím přechází na látku aniontového charakteru. Aminokyseliny leucin, isoleucin a valin po konverzi na příslušné hydroxyyseliny

byly proměřovány ve třech elektrolytových systémech – tj. při pH 6, pH 3,6 a pH 3,4.Při pH 6 byla v elektrolytovém systému bez přídavku cyklodextrinu mobilita hydroxykyselin vzniklých z leucinu i isoleucinu stejná a nedocházelo k jejich separaci. Při přídavku α-cyklodextrinu o koncentraci 5 mmol/l došlo ke zpomalení obou hydroxykyselin, kdy hydroxykyselina z leucinu byla o něco málo pomalejší než ta z leucinu. Při zvýšení koncentrace α-cyklodextrinu ve vedoucím elektrolytu na 10 mmol/l se tento rozdíl ještě prohloubil. Rozdíly v RSH obou hydroxykyselin ovšem pro dobrou separaci nejsou dostačující. Přídavek β-cyklodextrinu o koncentraci 5 mmol/l měl opět zpomalující vliv na oba anionty, ovšem v tomto případě byl o něco málo pomalejší aniont pocházející z leucinu. Při zvýšení koncentrace β-cyklodextrinu na 10 mmol/l došlo ke změně pořadí zón a zóna pocházející z leucinu předcházela zóně aniontu pocházejícího z isoleucinu. Rozdíl mezi mobilitami obou iontů byl ovšem velmi malý, a tudíž nelze tento systém použít pro separaci těchto hydroxykyselin. Na obr. 2 je uvedena závislost RSH hydroxykyselin pocházejících z leucinu a isoleucinu na koncentraci cyklodextrinů ve vedoucím elektrolytu.



v

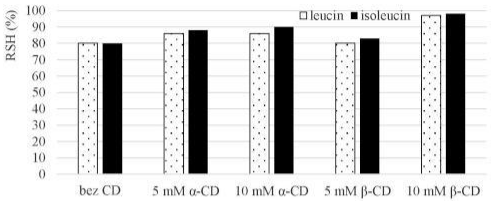
Obr. 1. Vliv α- a β-cyklodextrinu o koncentraci 1 mmol/l na RSH kyseliny L- a D-glutamové v elektrolytovém systému I (pH 6).



Obr. 2. Vliv α- a β-cyklodextrinu na RSH hydroxykyselin pocházejících z leucinu a isoleucinu v elektrolytovém systému I (pH 6).

Při pH 3,6 probíhalo měření stejně jako při pH 6. Přídavek α-cyklodextrinu se projevil stejně jako při pH 6 - došlo ke zpomalení obou aniontů, i rozdíly v RSH byly téměř totožné jako v předchozím případě. Po přídavku β-cyklodextrinu o koncentraci 5 mmol/l došlo ke snížení

mobility aniontu z isoleucinu, zatímco anion pocházející z leucinu měl mobilitu stejnou jako v případě měření bez přídavku cyklodextrinu. Při zvýšení koncentrace β-cyklodextrinu na 10 mmol/l došlo ke značnému snížení mobility obou aniontů a hrozilo splynutí obou zón se zónou koncového elektrolytu. Tyto systémy nebyly vhodné k dobré separaci obou aniontů. Na obr. 3 lze zhlédnout závislost RSH hydroxykyselin pocházejících z leucinu a isoleucinu na koncentraci cyklodextrinů ve vedoucím elektrolytu.

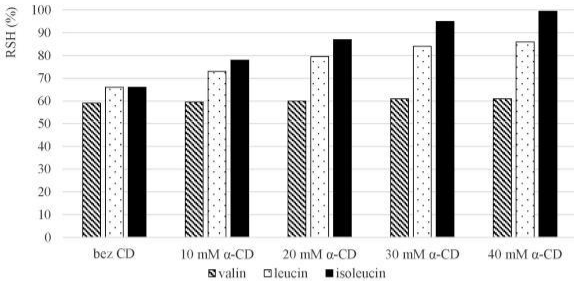


Obr. 3. Vliv α- a β-cyklodextrinu na RSH hydroxykyselin pocházejících z leucinu a isoleucinu v elektrolytovém systému II (pH 3,6).

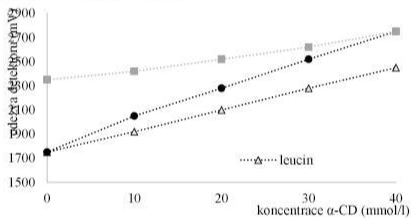
V posledním elektrolytovém systému o pH 3,4 probíhalo měření kromě hydroxykyselin pocházejících z leucinu a isoleucinu také s hydroxykyselinou pocházející z valinu. V tomto případě byl k vedoucímu elektrolytu přidáván pouze α-cyklodextrin, protože z předchozích měření se ukázalo, že je pro účely této separace účinnější. Bez přídavku α-cyklodextrinu se oddělila jen hydroxykyselina vzniklá z valinu, kdežto zbylé dvě hydroxykyseliny vytvořily směsnou zónu. Již při přidání α-cyklodextrinu o koncentraci 10 mmol/l se směsná zóna začala separovat. S rostoucí koncentrací α-cyklodextrinu ve vedoucím elektrolytu se separační poměry zlepšovaly. Při koncentraci α-cyklodextrinu 40 mmol/l se mobilita hydroxykyseliny z isoleucinu stala srovnatelnou s mobilitou koncového elektrolytu. Na obr. 4 je uvedena závislost RSH hydroxykyselin pocházejících z leucinu, isoleucinu a valinu na koncentraci cyklodextrinů ve vedoucím elektrolytu. Jak je možné vidět na obr. 5, nejlepší koncentrací α-cyklodextrinu pro separaci hydroxykyselin z leucinu a isoleucinu je 20 mmol/l. Při této koncentraci má signál hydroxykyseliny z isoleucinu maximální odstup jak od signálu koncového elektrolytu (kyseliny octové), tak od signálu hydroxykyseliny pocházející z leucinu.

Závěr

Bylo zkoumáno izotachoforetické využití α- a β-cyklodextrinů na separaci enantiomerů kyseliny glutamové a separaci hydroxykyselin vzniklých přeměnou aminokyselin leucinu a isoleucinu. K tomuto účelu byly použity tři elektrolytové systémy o pH 6, 3,6 a 3,4. Separace enantiomerů kyseliny glutamové byla zkoušena pouze v elektrolytovém systému o pH 6, ale přídavek cyklodextrinů nezlepšil separaci. Při separaci hydroxykyselin pocházejících z leucinu a isoleucinu byly použity postupně všechny tři elektrolytové systémy jak bez přídavku, tak s přídavkem α- a β-cyklodextrinu o různých koncentracích. Pro separaci se jako nejvhodnější ukázal elektrolyt o pH 3,4 s přídavkem 20 mM α-cyklodextrinu k vedoucímu elektrolytu. V tomto případě měl signál, který poskytoval isoleucin, dobrý odstup od signálu leucinu tak od koncového elektrolytu.



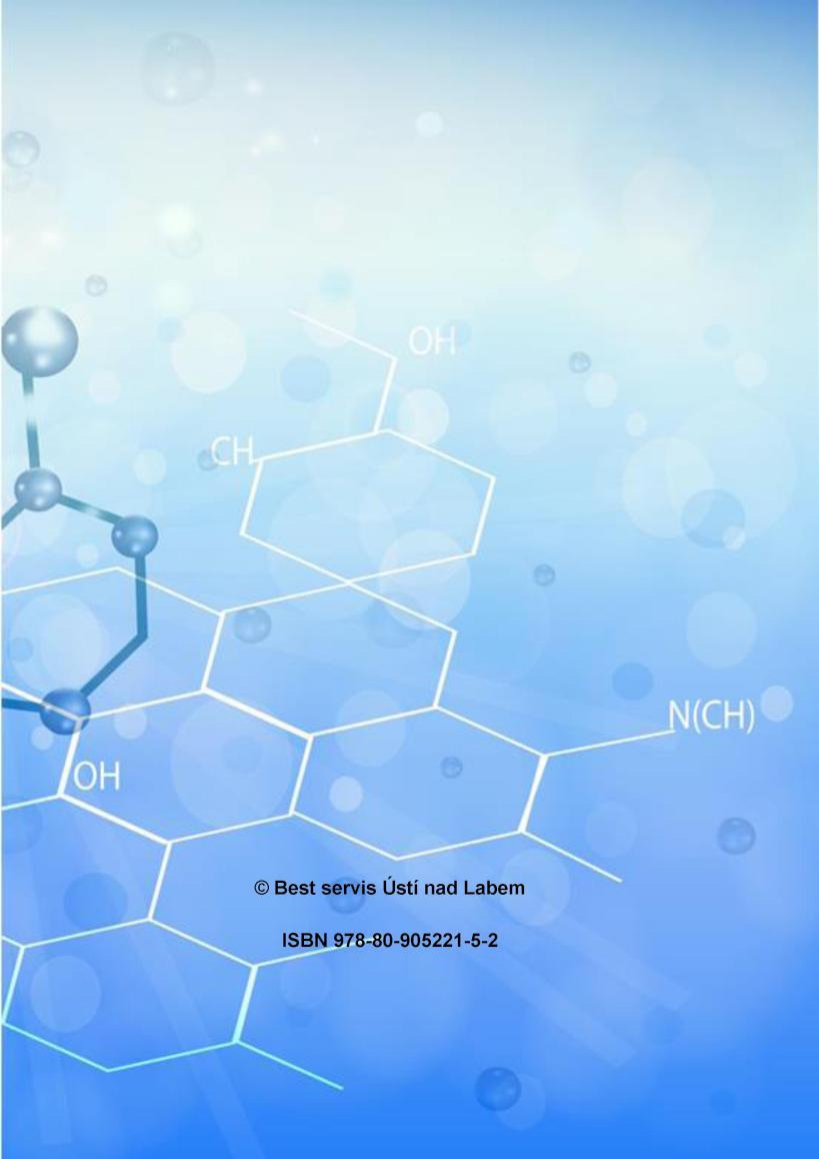
Obr. 4. Vliv α-cyklodextrinu na RSH hydroxykyselin pocházejících z leucinu, isoleucinu a valinu v elektrolytovém systému III (pH 3,4).



Obr. 5. Vliv koncentrace α-cyklodextrinu na separaci hydroxykyselin pocházejících z leucinu a isoleucinu v elektrolytovém systému III (pH 3,4).

References

1. Biwer A., Antranikian G., Heinzle E.: Appl. Microbiol. Biotechnol. *59*, 609 (2002).
2. Tazaki M., Takagi M.: Chem. Lett. *5*, 639 (1982).
3. Kuramoto N.: Chem. Express. *1*, 343 (1986).
4. Tazaki M., Hayashita T., Fujino Y., Takagi M.: Bull. Chem. Soc. Jpn. *59*, 3459 (1986).
5. Zaugg S., Caslavska J., Theurillant R., Thorman W.: J. Chromatogr. A. *838*, 237 (1999).
6. Blatný P., Kvasnička F., Kendler E.: J. Chromatogr. A. *737*, 255 (1996).
7. Bartoš M., Hloušková D., Hyhliková B.: *Izotachoforetické stanovení biogenních aminokyselin*, In: Sborník přednášek mezinárodní odborné konference XXIX. Moderní elektrochemické metody, 25. - 29. 5. 2009 Jetřichovice.



© Best servis Ústí nad Labem

ISBN 978-80-905221-5-2