

شناسایی سیکلودکسترین و مشتقات آن با الکتروفورز موئین با تشخیص غیرمستقیم

رسانایی و UV

چکیده

یک روش سریع و ساده الکتروفورز موئین برای شناسایی سیکلودکسترین α ، β ، γ ، مشتقات *tert-butyl* که به شکلی تصادفی جایگزین شده (میانگین درجه جایگزینی 3.8-4.4)، *heptakis (2,6-di-O-methyl)-* cyclodextrin *heptakis (2,3,6-tri-O-methyl)- β -* cyclodextrin بیان شد. *(NSA-2) Naphthyl-2-sulfonic acid*، 3-iodobenzoic acid (3-IBA) و *(1S)-1-phenylethylamine (PHEA)* (1S)-1-phenyl به عنوان مواد افزودنی الکتروولیت زمینه جاذب UV و تشکیل دهنده کمپکس گزینش پذیر آزمایش شدند. ترکیب الکتروولیت زمینه بهینه سازی شده برای جداسازی سیکلودکسترین بدون بار و مشتقات آن به این صورت بود: 3-15 mM *iodobenzoic acid* که با *tris[hydroxymethyl]aminomethane* تا pH 8.0، 5 درصد حجمی/حجمی *acetonitrile* تیترا شده است. تفکیک کامل ایزومرهای ناحیه ای *mono-2-O*، *mono-3-O* و *mono-6-O* در سیستم الکتروولیت زمینه بهینه سازی شده به دست آمد: 40 mM *O-carboxymethyl- β -cyclodextrin* با *PHEA* 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid تا pH 5.6 تیترا شد. علاوه بر تشخیص غیرمستقیم UV یک آشکارساز هدایت سنجی بدون تماس با موفقیت مورد استفاده قرار گرفت.

1. مقدمه

سیکلودکسترین (CDs)، الیگوساکارید حلقه ای هستند که از واحدهای *D(+)*glucopyranose با شکل یک چنبره تشکیل شده است. به خاطر توانایی منحصر به فرد آنها در تشکیل کمپلکس ها با ترکیبات متعدد، CDs به طور مکرر در زمینه های مختلف شیمی مورد استفاده قرار می گیرد. علاوه بر سیکلودکسترین طبیعی، تعداد فزاینده ای از مشتقات نیمه سنتزی و کوپلیمرها تهیه شده است و در حال حاضر به شکل تجاری موجود است. بسیاری از آنها، به عنوان انتخاب گرهای ساختاری و استخلافی با خواص جدید بسته به نوع و تعداد جایگزینی ها، در شیمی تجزیه

کاربرد دارند. علاوه بر CDS و مشتقات آنها، CD که در فازهای ساکن و شبه فاز اصلاح شده‌اند، به شکلی موفق در کروماتوگرافی و الکتروفورز کاربرد دارند. توجه فزاینده به شیمی سیکلودکسترین، موجب توسعه روش‌های تحلیلی قابل اطمینان، گزینش پذیر و حساس مناسب برای شناسایی آنها می‌شود.

شناسایی CDها مشکل است زیرا بدون بار هستند و هیچ خواص طیفی و الکتروشیمیایی خاصی ندارند. به علاوه واکنش پذیری این ترکیبات مشخص نیست و منجر به مشکل در خواص برچسب‌گذاری می‌گردد. روش‌هایی که قبلاً برای شناسایی CDS در مخلوط‌ها مورد استفاده می‌گرفت، شامل کروماتوگرافی کاغذی، کروماتوگرافی لایه نازک، کروماتوگرافی مایع و کروماتوگرافی گازی می‌گردد. در کل، حساسیت و گزینش‌پذیری پایین و زمان بالای آنالیز، مشخصه این آزمایش‌های کروماتوگرافی است.

چندین کار برای استفاده از الکتروفورز موئین (CE) برای شناسایی CDS صورت گرفته است. Nardi و همکاران جداسازی α ، β و γ -CD در مخلوط را با استفاده از بنزوات به عنوان یک کمپلکس گزینش پذیر و ماده جاذب UV الکترولیت زمینه (BGE) بررسی کردند. به طور مشابه، Penn و همکاران مشتقات متیل α ، β ، γ -CD و β -CD با درجات مختلف از جایگزینی را با استفاده از sulfonic acid-2-آمینوناftالن-6- به عنوان کمپلکس و ماده افزودنی فلوئورسنت بررسی کردند. Fang و همکاران α ، β ، γ -CD و mono-2-O-hy droxypyl- β -CD و β -CD در شکل یونیزه را با استفاده از بافر قلیایی قوی تفکیک کردند. استفاده از CE، یک جایگزین مناسب برای روش‌های کروماتوگرافی محسوب می‌شود و آزمایشات بیان‌شده از حالت بهینه نقطه سهولت، حساسیت و گزینش‌پذیری فاصله دارد.

هدف این کار، توسعه یک جایگزین برای آزمایش CD بر اساس CE با حساسیت و گزینش‌پذیری بالا به α ، β ، γ -CD، مشتقات متیل و tert.butyl بدون بار آنها است و در پی روشی نوین برای مشتقات mono-O-carboxymethyl جهت گزینه β -CD است. افزودنی‌های الکترولیت زمینه جاذب UV و تشکیل دهنده کمپلکس دیگر که موجب حصول اطمینان از تفکیک و حساسیت بهتر می‌شود، تست شده است. هر دو تکنیک تشخیص هدایت سنجی و فوتومتریک استفاده و مقایسه شده است.

2. آزمایش

2.1 مواد

α -CD, β -CD, γ -CD, heptakis (2,6-di-*O*-methyl)-

مواد

β -CD (DM- β -CD), heptakis (2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD (TM- β -CD), 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid (MES), tris[hydroxymethyl]aminomethane (TRIS), benzoic acid (BA), 3-iodobenzoic acid (3-IBA) and (1S)-1-phenylethylamine (1S-FEA)

از لحاظ تجاری بالاترین درجه دسترسی را دارند و از Sigma-Aldrich به دست آمده‌اند. سیکلودکستترین که به شکل تصادفی با *tert*-butyl جایگزین شده‌اند، *tert*-butyl- α -CD (TB- α -CD) درجه جایگزینی 3.8، *tert*-butyl- β -CD (TB- β -CD) درجه جایگزینی 4.5، *tert*-butyl- γ -CD (TB- γ -CD) درجه جایگزینی 4.4 و mono-2-*O*-carboxymethyl- β -CD (2-*O*-CM- β -CD) جهت گزین، mono-3-*O*-carboxymethyl- β -CD (3-*O*-CM- β -CD) و mono-6-*O*-carboxymethyl- β -CD (6-*O*-CM- β -CD) تهیه و به وسیله NMR در دپارتمان شیمی آلی، دانشگاه چارلز، پراگ، جمهوری چک شناسایی شد. آب یون زدوده از سیستم تصفیه آب Milli-Q به دست آمد.

2.2 ابزار دقیق و شرایط آزمایشگاهی

الکتروفورز موئین روی یک سیستم Crystal CE با یک آزمایشگاه و یک آشکارساز هدایت سنجی فوتومتریک بدون تماس برای الکتروفورز موئین در لوله موئین سیلیس ذوب شده با قطر داخلی $63.0 \text{ cm} \times 75 \text{ }\mu\text{m}$ راه اندازی شد. فاصله تا دتکتور 50.0 cm بود. محلول‌های نمونه در فشار 500 Pa و به مدت 12 ثانیه تزریق شد. ولتاژ تفکیک از 12 kV تا 30 kV تغییر داده می‌شد و یک جریان موئین حدود $9.2\text{--}66.4 \text{ }\mu\text{A}$ تولید می‌کند. تمام اندازه گیری‌ها در دمای 30°C انجام می‌شد. ترکیب دقیق الکتروولیت زمینه در متن زیر مشخص می‌شود.

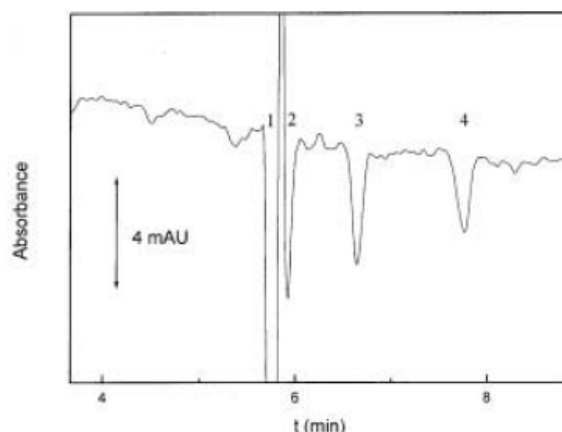
3. نتایج و بحث

3.1 تفکیک CD بدون بار و مشتقات آنها

روش اساسی برای تفکیک سیکلودکسترین بدون بار و مشتقات آن با استفاده از ماده افزودنی بافر تشکیل دهنده کمپلکس، انتخاب شده است. عوامل تشکیل دهنده کمپلکس و جاذب UV ، naphthalene-2-sulfonic acid (2-NSA) و 3-iodobenzoic acid (3-IBA) بر اساس دانش مقدماتی ثابت‌های تثبیت با سیکلودکسترین، تست شد.

3.1.1 تأثیر 2-NSA

استفاده از 2-NSA به عنوان ماده افزودنی الکترولیت زمینه، تشکیل کمپلکس γ -CD را موثرتر از benzoic acid می‌کند و پیک آن را از ناحیه پیک تزریق منتقل می‌کند مرتبه قابلیت تحرک موثر (μ_{CDB}^-) در کمپلکس‌های α -، β - و γ -CD همیشه در BGE حاوی 2-NSA که با TRIS تا pH 7.8 تیترا می‌شود، بود. افزایش شدید جابه‌جایی الکتروفوریتیک با افزایش غلظت 2-NSA بیانگر تشکیل کمپلکس‌های β - و γ -CD است درحالی که تحرک کمپلکس α -CD بسیار ضعیف تقریباً بدون تغییر باقی می‌ماند. مسئله تحرک بسیار پایین α -CD به علت تشکیل کمپلکس ضعیف با افزودن بنزویک اسید به عنوان ماده افزودنی دوم با میل ترکیبی بالاتر به α -CD حل شده است. تشکیل کمپلکس‌های پایدارتر و دارای انحلال پذیری کمتر β - و γ -CD با 2-NSA منجر به کاهش قابل توجه در پیک‌های مشاهده‌شده می‌شود. افزودن acetonitrile به الکترولیت زمینه برای حل این مسئله، بررسی شد و غلظت آن از دیدگاه تقارن پیک و حداکثر تفکیک کمپلکس‌های منتقل‌شونده بهینه سازی شد. بر اساس روش بهینه سازی طراحی فاکتوریل، شرایط تفکیک زیر بهینه شد: 2-NSA 15 mM، BA 5 mM با TRIS تا pH 7.8، با ACN (v/v) 10% تیترا شد. الکتروفروگرام مخلوط α -، β - و γ -CD در BGE بهیسنه در شکل 1 نشان داده می‌شود.



شکل 1. جداسازی مخلوط مدل α -, β - و γ -CD ($3.3 \times 10^{-3} \text{ M}$) در BGE حاوی 15 mM 2-NSA، 5 mM BA

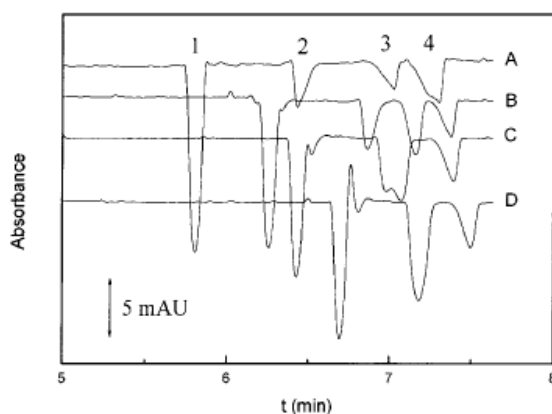
و 10% ACN. ولتاژ تفکیک 30 kV، $I = 66.4 \mu\text{A}$. تشخیص فوتومتریک 254 nm؛ 1 پیک حلال؛

2 α -CD, 3 γ -CD, 4 β -CD

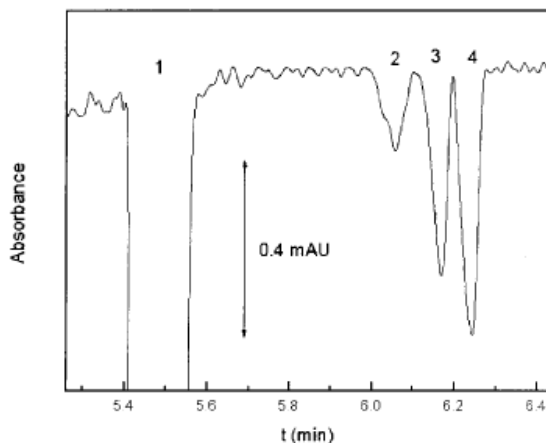
3.1.2. تأثیر 3-IBA

3-IBA به عنوان یک ماده افزودنی الکتروولیت زمینه جاذب UV و تشکیل دهنده کمپلکس انتخاب شد که تشکیل کمپلکس موثر و گزینش پذیر α -, β - و γ -CD را تضمین می‌کند. میزان تحرک موثر (μ_{CDB}^-) کمپلکس‌های α -, β - و γ -CD در BGE حاوی 3-IBA که با TRIS تا pH 8.0 تیترا شد، $|\mu_{\alpha\text{-CDB}}| > |\mu_{\beta\text{-CDB}}| > |\mu_{\gamma\text{-CDB}}|$ بود. افزایش قابل توجه تحرک الکتروفوریتیک با افزایش غلظت 3-IBA بیانگر تشکیل کمپلکس‌های α -, β - و γ -CD پایدار است. با توجه به آزمایش‌های بالا، غلظت 3-IBA 15 mM به عنوان غلظت بهینه که تفکیک کافی و حساسیت بالای تشخیص غیرمستقیم UV را تضمین می‌کند، برآورد شد. کاهش نامطلوب پیک به علت انحلال پذیری کمتر کمپلکس‌های تشکیل شده با افزودن ACN بیهیجه الکتروولیت زمینه برطرف شد. الکتروفروگرام در BGE بدون ACN (ماده A) و با ACN اضافه شده در غلظت 5 – 15% (حجمی/حجمی) (ماده B و C) در شکل 2 نشان داده می‌شود. با افزایش غلظت ACN، پیک‌های مشاهده شده تقارن خود را از دست دادند. غلظت 5 درصد ACN به عنوان مقدار بهینه در نظر گرفته شد. غلظت‌های بالاتر به خاطر کاهش پیوندها و به خاطر رقابت در تشکیل کمپلکس ACN/3-IBA با CDs، موجب افت تفکیک بین کمپلکس‌های β - و γ -CD می‌شود.

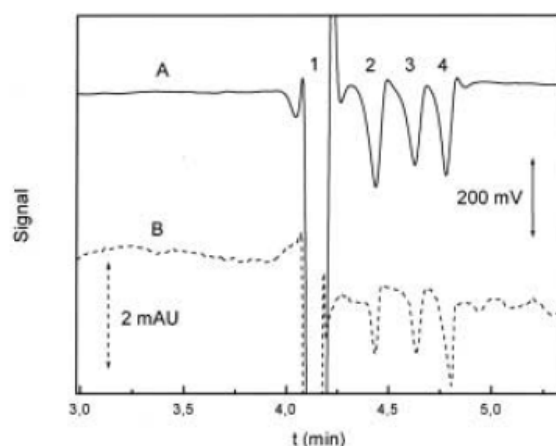
BGE بهینه که از 15 mM 3-IBA که با TRIS تا pH 8.0 تیتر شده است و 5% (v/v) ACN به آن اضافه شده است، برای شناسایی سایر مشتقا بدون بار CD مورد استفاده قرار گرفت. تفکیک کامل α -CD، β -CD و γ -CD (شکل 3) و β -CD، DM- β -CD و TM- β -CD (شکل 4) حاصل شد.



شکل 2. جداسازی مخلوط مدل α -، β - و γ -CD (3.3×10^{-3} M) در BGE حاوی 15 mM 3-IBA و 0% ACN (ماده A)، 5 درصد ACN (ماده B)، 10 درصد ACN (ماده C) و 15 درصد ACN (ماده D). ولتاژ تفکیک 15 kV، $I = 9.2 \mu A$. تشخیص فوتومتریک 254 nm؛ پیک 1 حلال؛ 2α -CD، 3 γ -CD، 4 β -CD

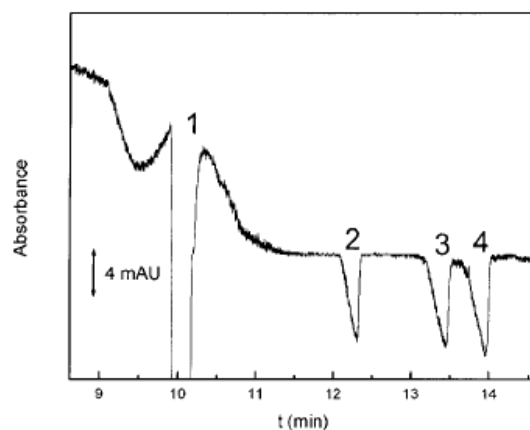


شکل 3. جداسازی مخلوط مدل α -، β - و γ -CD (3.3×10^{-3} M) در BGE حاوی 15 mM 3-IBA و 5 درصد ACN. ولتاژ تفکیک 15 kV، $I = 9.2 \mu A$. تشخیص فوتومتریک 254 nm؛ پیک 1 حلال؛ 2α -CD، 3 γ -CD، 4 β -CD



شکل 4. جداسازی مخلوط مدل β -CD و $\text{TM-}\beta\text{-CD}$ و $\text{DM-}\beta\text{-CD}$ در BGE حاوی 3-15 mM $(1.0 \times 10^{-3} \text{ M})$ و $I = 9.2 \mu\text{A}$. تشخیص فوتومتریک 254 nm؛ فرکانس دیکتور 5 درصد ACN. ولتاژ تفکیک 15 kV. تشخیص رسانایی 200 kHz. ماده A- تشخیص رسانایی. ماده B- تشخیص UV-Vis؛ 1 پیک حلال؛

2 $\text{TM-}\beta\text{-CD}$; 3 $\text{DM-}\beta\text{-CD}$; 4 $\beta\text{-CD}$



شکل 5. جداسازی مخلوط مدل $\text{6-O-CM-}\beta\text{-CD}$ و $\text{2-O-CM-}\beta\text{-CD}$ ، $\text{3-O-CM-}\beta\text{-CD}$ در BGE حاوی 40 mM PHEA و 5 درصد ACN. ولتاژ تفکیک 15 kV، $I = 51.3 \mu\text{A}$. تشخیص فوتومتریک 210 nm؛

1 پیک حلال؛ 2 $\text{3-O-CM-}\beta\text{-CD}$ 3 $\text{2-O-CM-}\beta\text{-CD}$ ، 4 $\text{6-O-CM-}\beta\text{-CD}$

3.2 تفکیک مشتقات CD باردار

2-O-CM-β-CD, 3-O-CM-β-CD و 6-O-CM-β-CD شناسایی شده، اختلافات کمی در مقدار pK بنابراین،

تفکیک الکتروفورتیک آنها بدون استفاده از عامل کمپلکس ساز گزینش پذیر، غیرممکن است. به منظور دستیابی به حداکثر اختلاف در تحرک بین مشتقات آنیونی CD و عامل کمپلکس ساز، PHEA کاتیونی به عنوان ماده افزودنی بافری انتخاب شد. مرتبه تحرک موثر (μ_{CDA}) کمپلکس های گنجایشی 2-O-CM-β-CD، 3-O-CM-β-CD و

6-O-CM-β-CD در BGE حاوی PHEA که با MES تا pH 5.6 تیتر شد، همیشه $|\mu_{6-O-CM-\beta-CDA}| > |\mu_{2-O-CM-\beta-CDA}|$

بود. بین تفکیک حاصله و حساسیت تشخیص UV مستقیم، غلظت 40 Mm PHEA به عنوان غلظت

بهینه انتخاب شد. الکتروفروگرام مربوطه که تفکیک کامل هر سه ایزومر در BGE بهینه را نشان می دهد (PHEA

40 Mm با MES تا pH 5.6 تیتر شد) در شکل 5 نشان داده می شود.

مقدار حدود تشخیص برای CD های شناسایی شده و مشتقات آنها در سیستم های الکترولیت ززمینه، در جدول 1

خلاصه شده است. این داده ها برای هر دو تکنیک تشخیص (تشخیص غیرمستقیم UV و تشخیص رسانایی بدون

تماس) محاسبه می گردد. با توجه به اطلاعات کالیبراسیون، می توان نتیجه گرفت که تشخیص رسانایی بدون تماس،

به مراتب حساس تر از تشخیص غیرمستقیم UV است. مثلاً، شیب شناسایی α -CD در 3-IBA، برای تشخیص

فوتومتریک $(1.9 \times 10^3 \text{ mAU s mol}^{-1} \text{ L})$ و برای تشخیص رسانایی بدون تماس در محدوده غلظت

$(2-10) \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ، $(3.05 \times 10^5 \text{ mV s mol}^{-1} \text{ L})$ بود. محدوده تشخیص برای α ، β - و γ -CD کمتر از

حد انتظار و مشابه مقادیر حاصل از تشخیص فلورسانس بود ولی از مقادیر بدست آمده با تشخیص آمپرسنجی بیشتر

بود. (رجوع کنید به جدول 1)

جدول 1. حدود تشخیص CD های مطالعه شده و مشتقات آنها در سیستم های بهینه

Substance	I ^a		II ^b		III ^c		IV ^d	
	UV-Vis detection	Conductivity detection	UV-Vis detection	Conductivity detection	UV-Vis detection	Conductivity detection	Fluorescence detection	Amperometric detection
α -CD	1.5×10^{-3}	4.8×10^{-4}	2.6×10^{-5}	4.6×10^{-5}	—	—	6.2×10^{-5}	2.0×10^{-6}
β -CD	1.1×10^{-3}	4.3×10^{-4}	3.1×10^{-5}	5.2×10^{-5}	—	—	2.4×10^{-6}	1.6×10^{-6}
γ -CD	1.2×10^{-3}	6.8×10^{-4}	8.3×10^{-5}	3.6×10^{-5}	—	—	2.4×10^{-5}	1.0×10^{-6}
TB- α -CD	1.3×10^{-3}	2.3×10^{-3}	2.4×10^{-4}	4.6×10^{-4}	—	—	—	—
TB- β -CD	1.8×10^{-3}	2.8×10^{-3}	2.4×10^{-4}	5.3×10^{-4}	—	—	—	—
TB- γ -CD	2.3×10^{-3}	3.6×10^{-3}	5.2×10^{-4}	2.8×10^{-4}	—	—	—	—
TM- β -CD	4.1×10^{-4}	4.8×10^{-5}	2.2×10^{-4}	2.1×10^{-5}	—	—	—	—
DM- β -CD	2.6×10^{-4}	3.4×10^{-5}	1.4×10^{-4}	6.3×10^{-5}	—	—	—	—
2-CM- β -CD	—	—	—	—	2.3×10^{-4}	2.0×10^{-4}	—	—
3-CM- β -CD	—	—	—	—	1.8×10^{-4}	1.6×10^{-4}	—	—
6-CM- β -CD	—	—	—	—	2.8×10^{-4}	2.6×10^{-4}	—	—

BGE a حاوی 15 mM 2-NSA، 5 mM BA و 10% ACN است. ولتاژ تفکیک 30 kV، $I = 66.4 \mu A$

BGE b حاوی 15 mM 3-IBA و 5% ACN است. ولتاژ تفکیک 15 kV، $I = 9.2 \mu A$

BGE c حاوی 40 mM PHEA است. ولتاژ تفکیک 15 kV، $I = 51.3 \mu A$

4. نتیجه گیری

الکتروفورز موئین، روشی کارآمد و سریع برای شناسایی CDهاست و مشتقات بدون بار و باردار آنهاست. انتخاب ماده افزودنی کمپلکس ساز مناسب، تأثیر مطلوبی بر تفکیک و حساسیتی که با تشخیص غیرمستقیم UV قابل دستیابی است، خواهد داشت. علاوه بر 2-NSA، 3-IBA نیز یک عامل کمپلکس ساز خوب و جاذب UV است و تفکیک کامل α ، β - و γ -CD، مشتقات متیل و tert-butyl آنها را فراهم می کند. PHEA کاتیونی به عنوان یک عامل گزینش پذیر کمپلکس ساز و جاذب UV مناسب برای تفکیک 2-O-CM- β -CD، 3-O-CM- β -CD و 6-O-CM- β -CD مورد استفاده قرار گرفت.

به شکل آزمایشگاهی اثبات شده است که دکتور رسانایی بدون تماس، یک روش جایگزین برای تشخیص غیرمستقیم UV ارائه می دهد. امکان دستیابی به اندازه گیری های حساسیت مشابه و حتی بالاتر و حدود تشخیص پایین تر برای CD های باردار و بدون بار و مشتقات آنها را فراهم می کند.