

การแยกอิแนนทิโอเมอร์ในอะพิลลารีอิลีกโทรฟอริซิส
โดยใช้ไซโคลเดกซ์ทรินสองชนิด

นางสาวฉัตรวดี ศาสตร์วาทา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี

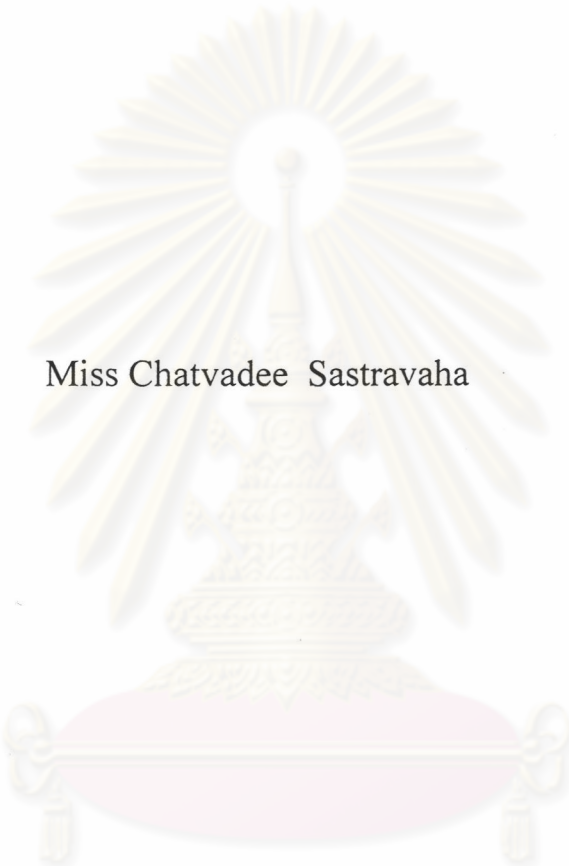
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4948-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ENANTIOMERIC SEPARATION IN CAPILLARY
ELECTROPHORESIS USING DUAL CYCLODEXTRINS



Miss Chatvadee Sastravaha

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the requirements
for the Degree of Master of Science in Chemistry

Department of Chemistry

Faculty of Science


Chulalongkorn University

Academic Year 2003

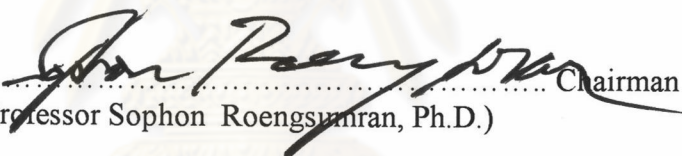
ISBN 974-17-4948-1

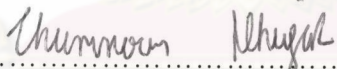
Thesis Title Enantiomeric Separation in Capillary Electrophoresis Using
Dual Cyclodextrins
By Miss Chatvadee Sastrvaha
Field of Study Chemistry
Thesis Advisor Thumnoon Nhujak, Ph.D.
Thesis Co-advisor Chanida Palanuvej


Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree



..... Dean of Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

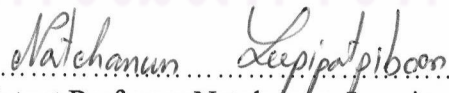
THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Professor Sophon Roengsunran, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Thumnoon Nhujak, Ph.D.)


..... Thesis Co-advisor
(Chanida Palanuvej)


..... Member
(Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.)


..... Member
(Assistant Professor Natchanun Leepipatpiboon, Dr.rer.nat)

นัตรวดี ศาสตราวหา: การแยกอิแนนทิโอเมอร์ในกะพิลลารีอิลีกโทรฟอริซิสโดยใช้ไซโคลเดกซ์ทรินสองชนิด. (ENANTIOMERIC SEPARATION IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS USING DUAL CYCLODEXTRINS) อาจารย์ที่ปรึกษา: ดร. ธรรมบุญ หนูจักร, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ชนิกา พลาภูเวช 103 หน้า. ISBN 974-17-4948-1

ในช่วงแรกของงานวิจัย ได้แยกอิแนนทิโอเมอร์ด้วยเทคนิคกะพิลลารีอิลีกโทรฟอริซิสโดยใช้ตัวเลือกโครรัลเป็นไซโคลเดกซ์ทริน (CD) หนึ่งชนิด คือ เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินหรือโดเมทิลเบต้าไซโคลเดกซ์ทริน ในบัฟเฟอร์ที่เป็นไทเรทานอลาแอมโมเนียม-ฟอสเฟตที่ pH 3.0 และสารทดสอบเป็นอิแนนทิโอเมอร์ของยาในกลุ่มแอมเฟตามีน เช่น แอมเฟตามีน เมทแอมเฟตามีน เอฟีดิน ซูโดเอฟีดิน และนอร์เอฟีดิน เป็นต้น ค่าคงที่ของการจับกัน (K) ระหว่างแต่ละไอโซเมอร์กับไซโคลเดกซ์ทรินหาได้จากความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถของการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร (μ) เป็นฟังก์ชันกับความเข้มข้นของไซโคลเดกซ์ทริน (C)

ได้พัฒนาสมการอย่างง่ายและแบบจำลองทางทฤษฎีของความแตกต่างของ μ ($\Delta\mu$) ซึ่งขึ้นกับค่าความจำเพาะอิแนนทิโอเมอร์ (α) และผลคูณของ $\bar{K}C$ สำหรับการทำนายและอธิบายการเปลี่ยนแปลง $\Delta\mu$ ของอิแนนทิโอเมอร์ในช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ ของไซโคลเดกซ์ทรินสองชนิด โดยที่ α คือ อัตราส่วนของค่า K สำหรับอิแนนทิโอเมอร์และ \bar{K} คือ ค่าเฉลี่ยของ K สำหรับอิแนนทิโอเมอร์ จากการทดลองใช้ระบบไซโคลเดกซ์ทรินสองชนิด พบว่าการเพิ่มหรือลดของ $\Delta\mu$ จากการทดลองให้ผลสอดคล้องอย่างดีกับการทำนายตามแบบจำลองของ $\Delta\mu$ ยกตัวอย่างเช่น เมื่อเปรียบเทียบกับ CD1 ชนิดเดียวแล้ว พบว่าไซโคลเดกซ์ทรินสองชนิดสามารถเพิ่ม $\Delta\mu$ ได้ เมื่ออิแนนทิโอเมอร์มีค่า α สำหรับ CD2 มากกว่า CD1

ทั้งระบบที่ใช้เป็นไซโคลเดกซ์ทรินหนึ่งหรือสองชนิดในช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ ของไซโคลเดกซ์ทริน พบว่าค่า $\Delta\mu$ จากการทดลองและการทำนายมีความสอดคล้องกันเป็นอย่างดี ในขณะที่ค่าการแยก อิแนนทิโอเมอร์จากการทดลองน้อยกว่าการทำนายเล็กน้อย เมื่อสองปัจจัยหลัก คือ การกระจายและอิลีกโทรไมเกรชันดิสเพอชัน ใช้ในการทำนายแวลูรีนส์และประสิทธิภาพของพีค เมื่อเปรียบเทียบกับไซโคลเดกซ์ทรินหนึ่งชนิดแล้ว พบว่าไซโคลเดกซ์ทรินสองชนิดช่วยปรับปรุงการแยกของ อิแนนทิโอเมอร์บางชนิดและได้ค่าการแยกที่สมบูรณ์ของสารทดสอบทุกชนิด

ภาควิชา.....เคมี..... ลายมือชื่อนิติศ.....
 สาขาวิชา.....เคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ปีการศึกษา.....2546..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

447 22435 23: MAJOR CHEMISTRY

KEY WORDS: CAPILLARY ELECTROPHORESIS/ ENANTIOMERIC SEPARATION/ CYCLODEXTRIN/ AMPHETAMINE DRUG

CHATVADEE SASSTRAVAHA: ENANTIOMERIC SEPARATION IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS USING DUAL CYCLODEXTRINS
 THESIS ADVISOR: THUMNOON NHUJAK, Ph.D., THESIS COADVISOR: CHANIDA PALANUVEJ, 103 pp. ISBN 974-17-4948-1

In initial work, enantiomeric separation in capillary electrophoresis (CE) was carried out using a chiral selector as single cyclodextrin (CD), β - or DM- β -CD, in a pH 3.0 triethanolammonium-phosphate buffer and test analytes as enantiomers of amphetamine drugs such as amphetamine, methamphetamine, ephedrine, pseudoephedrine and norephedrine. The binding constant (K) for each isomer to CD was determined, by fitting electrophoretic mobility (μ) of the analyte as a function of CD concentration (C).

Simple equations and theoretical models of $\Delta\mu$, based on enantioselectivity (α) and $\bar{K}C$, have been developed for prediction and explanation of a change in $\Delta\mu$ of enantiomers in a wide range of dual CDs concentrations, where α is the ratio of K for enantiomers, and \bar{K} the average K for enantiomers. In dual CDs system, an increase or a decrease in observed $\Delta\mu$ was found to be in good agreement with prediction according to the theoretical models of $\Delta\mu$. For example, in comparison with single CD1, dual CDs can enhance $\Delta\mu$ when enantiomers have α for CD2 greater than that for CD1.

In either single or dual CDs system, over a wide range of CD concentrations, good agreement was found for observed and predicted values of $\Delta\mu$, while the observed slightly less than predicted values of resolution were obtained when two major contributions, diffusion and electromigration dispersion, were taken into account for prediction of peak variance and efficiency. In comparison with single CD, dual CDs was found to improve resolution of some enantiomers and to obtain achieved baseline resolution of all test analytes.

Department.....Chemistry..... Student's signature.....*Chatvadee Sasstravaha*
 Field of study.....Chemistry..... Advisor's signature.....*Thumnoon Nhuja*
 Academic year.....2003..... Co-advisor's signature.....*Chanida Palanuvej*

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I wish to express my deepest gratitude to my advisor, Dr Thumnoon Nhujak, for his professionalism, discerning suggestion, forbearance, encouragement, and critical reading. I also greatest thank to my co-advisor, Chanida Palanuvej, for her helpfulness, generous guidance and encouragement throughout this research. Special thanks are extended to the thesis committee for their valuable comments and suggestion.

This research was financially supported by the Grants for Development of New Faculty Staff to Dr Thumnoon Nhujak, Department of Chemistry and the Graduate School, Chulalongkorn University. Research facilities, especially CE instrument, provided by the Institute of Health Research Science are appreciatively and thankfully acknowledge.

Furthermore, I specially thank to all members of Separation and Chromatography Research Group for their valuable suggestions. Also, I am thankful to all members of CE group for their helpfulness and encouragement. Moral supports and cheerful willingness of my friends are truly appreciated. Thanks are also extended to everyone who has contributed suggestions and supports throughout this research.

Finally, I am eternally grateful to my beloved parents and the rest of family members for their enormously ever-willing support. If without their support, I would never had such good experience in my life.

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (IN THAI).....	iv
ABSTRACT (IN ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS.....	xiii
CHAPTER I: INTRODUCTION.....	1
1.1 Introduction and Modes of CE	1
1.2 Fundamental of CE and CZE	3
1.2.1 Electrophoretic Mobility	3
1.2.2 Electroosmotic Flow.....	4
1.2.3 Peak Efficiency and Resolution	7
1.2.4 Sources of Peak Broadening.....	8
1.3 The Basic Instrument in CE	12
1.3.1 Sample Injection.....	13
1.3.2 Detector	14
1.4 Introduction to Chiral Separation	15
1.4.1 Chirality and Enantiomers.....	15
1.4.2 Importance of Chiral Separation	16
1.4.3 Mechanism of Chiral Separations	17
1.5 Chiral Separation in CE Using Cyclodextrin as Chiral Selector.....	18
1.5.1 Cyclodextrins (CDs).....	19
1.5.2 Inclusion Complexation of Cyclodextrin and Enantiomers	21
1.5.3 Previous work on Chiral Separation Using CD as Chiral Selector	22
1.6 Aim, Scope and Advantages	26

	PAGE
CHAPTER II: EXPERIMENTAL	28
2.1 Chemicals	28
2.2 CE Conditions	28
2.3 Enantiomeric Separation Using Single Cyclodextrin.....	29
2.4 Enantiomeric Separation Using Dual Cyclodextrins.....	30
 CHAPTER III: RESULTS AND DISCUSSION	 32
3.1 Enantiomeric Separation Using Single Cyclodextrin.....	32
3.1.1 BGE Conditions	32
3.1.2 Binding Constant and Enantioselectivity	33
3.1.3 CD Concentrations at Maximum Electrophoretic Mobility Difference and Maximum Resolution	41
3.1.4 Observed and Predicted Peak Variance and Peak Efficiency	45
3.1.5 Observed and Predicted Enantiomeric Resolution.....	55
3.1.6 Observed and Predicted Simultaneous Separation of Several Pairs of Enantiomers	58
3.2 Enantiomeric Separation Using Dual Cyclodextrin	60
3.2.1 Principle of CE Chiral Separation Using Dual Cyclodextrins	60
3.2.2 Theoretical Models of Mobility Difference	61
3.2.3 Prediction of $\Delta\mu$ Models for Enantiomers Amphetamine Drugs	69
3.2.4 Experimental and Predicted Values of $\Delta\mu$ for Enantiomers in Dual CDs	73
3.2.5 Peak Variance and Resolution in Dual CDs System.....	81
3.2.6 Suitable Concentration of Dual CDs for Simultaneous Separation of Several Pairs of Enantiomeric	94
 CHAPTER IV: CONCLUSION AND FUTHER WORK.....	 97
 REFERENCES	 100
 VITA.....	 103

LIST OF TABLES

	PAGE
Table 1.1 Properties of Native CDs.....	20
Table 3.1 Binding constants, electrophoretic mobilities and enantioselectivity for AP, MA, PE, EP and NE	40
Table 3.2 Observed and calculated CD concentration at maximum $\Delta\mu$ and maximum R_s using β -CD and DM- β -CD as a chiral selector	43
Table 3.3 Electrophoretic mobilities at zero and experimental ionic strength	46
Table 3.4 Observed and predicted values of maximum resolution.	57
Table 3.5 The assumed values of α and \bar{K} used in theoretical models for $\Delta\mu$	62
Table 3.6 The values of \bar{K} and α used in prediction of theoretical models for $\Delta\mu$ of test enantiomers	70



 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

	PAGE
Figure 1.1 Separation mechanism in (a) CZE, (b) MEKC and (c) CEC	2
Figure 1.2 Electroosmotic flow (EOF).....	4
Figure 1.3 Flow profiles in CE and HPLC	5
Figure 1.4 Migration behavior of analytes.	6
Figure 1.5 Gaussian peak.	8
Figure 1.6 Concentration distribution of EMD in the distance domain.	11
Figure 1.7 Schematic diagram illustrating concentration distribution in the presence of EMD and diffusion. Evaluation (i) tailing and (ii) fronting peaks in the distance domain as a function of time (min).	11
Figure 1.8 Schematic diagram of a basic CE instrument.	13
Figure 1.9 Structure of <i>S</i> - and <i>R</i> -methamphetamine	16
Figure 1.10 The three point interaction between a chiral selector and two enantiomers.	18
Figure 1.11 Structure of cyclodextrins (CDs), when $n = 1, 2, 3$ for α -, β - and γ -CD, respectively, and X, Y and Z = H or CH ₃ for native or methyl ether derivatives.	20
Figure 1.12 Inclusion complexation of cyclodextrin and methamphetamine	22
Figure 1.13 Structures of amphetamine drugs: amphetamine, methamphetamine, pseudoephedrine, ephedrine and norephedrine.	25
Figure 3.1 Electropherograms of enantiomeric separation of AP, MA, PE, EP and NE using β -CD as chiral selector.	34
Figure 3.2 Electropherograms of enantiomeric separation of AP, MA, PE, EP and NE using DM- β -CD as chiral selector.....	36
Figure 3.3 Binding curves for AP, MA, PE, EP and NE enantiomers to (a) β -CD and (b) DM- β -CD.....	39
Figure 3.4 Electrophoretic mobility difference ($\Delta\mu$) for each pair of AP, MA, PE, EP and NE enantiomers using (a) β -CD and (b) DM- β -CD.....	42

Figure 3.5 Predicted peak variance for AP, MA, PE, EP and NE enantiomers using (a) β -CD and (b) DM- β -CD.	48
Figure 3.6 Observed (symbols) and predicted (solid lines) total peak variance (σ_{tot}^2) for AP, MA, PE, EP and NE enantiomers using (a) β -CD and (b) DM- β -CD.	50
Figure 3.7 Observed (symbols) and predicted (solid lines) peak efficiency (N) for each pair of AP, MA, PE, EP and NE enantiomers using (a) β -CD and (b) DM- β -CD.	53
Figure 3.8 Observed (symbols) and predicted (solid lines) resolution (R_s) for each pair of AP, MA, PE, EP and NE enantiomers using (a) β -CD and (b) DM- β -CD.	56
Figure 3.9 Theoretical models of $\Delta\mu$ of enantiomers in dual CDs system.	63
Figure 3.10 Theoretical models of $\Delta\mu$ of AP, MA, PE, EP and NE enantiomers in dual CDs system over a wide range of $C_{D\beta}$ at fixed C_β	71
Figure 3.11 Theoretical models of $\Delta\mu$ of AP, MA, PE, EP and NE enantiomers in dual CDs system over a wide range of C_β at fixed $C_{D\beta}$	72
Figure 3.12 Electropherograms of enantiomeric separation of AP, MA, PE, EP and NE using dual CDs as chiral selectors at fixed (a) 8.0 and (b) 10.0 mM C_β and various $C_{D\beta}$	74
Figure 3.13 Electropherograms of enantiomeric separation of AP, MA, PE, EP and NE using dual CDs as chiral selectors at fixed (a) 6.0 and (b) 10.0 mM $C_{D\beta}$ and various C_β	76
Figure 3.14 Observed (symbols) and predicted (solid lines) values of $\Delta\mu$ of enantiomers in dual CDs system over a wide range of $C_{D\beta}$ at fixed C_β of 8.0 and 10.0 mM.	78
Figure 3.15 Observed (symbols) and predicted (solid lines) values of $\Delta\mu$ of enantiomers in dual CDs system over a wide range of C_β at fixed $C_{D\beta}$ of 6.0 and 10.0 mM.	79
Figure 3.16 Predicted peak variance for AP, MA, PE, EP and NE enantiomers in dual cyclodextrins.	82
Figure 3.17 Observed (symbols) and predicted (solid lines) values of total peak variance (σ_{tot}^2) for AP, MA, PE, EP and NE enantiomers using dual cyclodextrins at fixed (a) 8.0 and (b) 10.0 mM C_β with a wide range of $C_{D\beta}$	84

PAGE

- Figure 3.18 Observed (symbols) and predicted (solid lines) values of total peak variance (σ_{tot}^2) for AP, MA, PE, EP and NE enantiomers using dual cyclodextrins at fixed (a) 6.0 and (b) 10.0 mM $C_{D\beta}$ with a wide range of C_{β} 86
- Figure 3.19 Observed (symbols) and predicted (solid lines) peak efficiency (N) for each pair of AP, MA, PE, EP and NE enantiomers using dual cyclodextrins at fixed (a) 8.0 and (b) 10.0 mM C_{β} with a wide range of $C_{D\beta}$ 89
- Figure 3.20 Observed (symbols) and predicted (solid lines) peak efficiency (N) for each pair of AP, MA, PE, EP and NE enantiomers using dual cyclodextrins at fixed (a) 6.0 and (b) 10.0 mM $C_{D\beta}$ with a wide range of C_{β} 91
- Figure 3.21 Observed (symbols) and predicted (solid lines) resolution (R_s) for each pair of AP, MA, PE, EP and NE enantiomers using dual cyclodextrins. 93
- Figure 3.22 Predicted electrophoretic mobility of each enantiomer at fixed C_{β} over a wide range of $C_{D\beta}$ 96
- Figure 3.23 Predicted electrophoretic mobility of each enantiomer at fixed $C_{D\beta}$ over a wide range of C_{β} 96

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATION AND SYMBOLS

AP	amphetamine
β -CD	β -cyclodextrin
BGE	background electrolyte
CD	cyclodextrin
CD1	cyclodextrin at fixed concentration
CD2	cyclodextrin at vary concentration
CE	capillary electrophoresis
CZE	capillary zone electrophoresis
DM- β -CD	dimethyl- β -cyclodextrin
EMD	electromigration dispersion
EOF	electroosmotic flow
EP	ephedrine
MA	methamphetamine
NE	norephedrine
PE	pseudoephedrine
α	enantioselectivity
α_{α}	enantioselectivity ratio
ΔK	difference in binding constants for enantiomers to a selector ($\Delta K = K_2 - K_1$)
$\Delta\mu$	difference in electrophoretic mobility of enantiomers ($\Delta\mu = \mu_2 - \mu_1$)
η	viscosity
μ	electrophoretic mobility
μ^0	absorlute mobility, the electrophoretic mobility at zero ionic strength
μ_0	electrophoretic mobility of free analyte
μ_{∞}	electrophoretic mobility of CD:analyte complex
μ_A	electrophoretic mobility of analyte
μ_B	electrophoretic mobility of counter-ion
μ_C	electrophoretic mobility of BGE co-ion
σ^2	peak variance
σ_{EMD}^2	peak variance due to electromigration dispersion
σ_{diff}^2	peak variance due to longitudinal diffusion

σ_{tot}^2	total peak variance
τ	standard deviation of peak in time unit
C	free cyclodextrin concentration
$C_{\Delta\mu, \text{max}}$	concentration of cyclodextrin at give maximum mobility difference
$C_{R_s, \text{max}}$	concentration of cyclodextrin at give maximum resolution
$C_{2, \Delta\mu, \text{max}}$	concentration of CD2 at give maximum mobility difference
D	diffusion coefficient
E	electric field strength
I	ionic strength
K	binding constant
\bar{K}	average binding constant
L	total capillary length
l	the length of capillary to detector
l_{inj}	length of analyte injected
N	the number of theoretical plate, or peak efficiency
\bar{N}	average the number of theoretical plate, or peak efficiency
q	charge on a ion
ΔP	pressure difference across the capillary
r_h	hydrodynamic radius
R_s	resolution
t_m	migration time of an analyte
t_{inj}	injection time
V	applied voltage
w_b	peak width at base
w_h	peak width at half height
z	charge of an ion