

Samenvatting

Verhoging van de selectiviteit in capillaire electrokinetische scheidingen op basis van chirale en moleculaire herkenning

Toepassing in de bioanalyse en de farmaceutische analyse

Wanneer we de lotgevallen van een geneesmiddel in het lichaam willen volgen of de zuiverheid van een geneesmiddel willen bepalen moeten we het scheiden van andere (vaak storende) moleculen. Om dit te kunnen bewerkstelligen zijn er verschillende scheidingstechnieken ontwikkeld. Een relatief nieuwe scheidingmethode is Capillaire Electroforese (CE), die in de begin jaren tachtig is ontwikkeld. Een CE-apparaat bestaat uit een zeer dun glazen capillair die gevuld is met een buffer oplossing en waarover, door middel van een stroombron, een spanning tussen de 10.000 en 30.000 volt geplaatst kan worden. De in het capillair aanwezige geladen analieten (ionen) bewegen dan naar één van de beide polen al naar gelang hun lading. Met andere woorden, het principe van CE is het scheiden van ionen door het verschil in snelheid dat deze ionen krijgen in een elektrisch veld. De snelheid van zo'n ion is sterk afhankelijk van de hoeveelheid lading van het ion, van de grootte van het ion en van de viscositeit van het oplosmiddel, waarin het ion zich bevindt. Meestal is dit oplosmiddel een waterige oplossing die op een bepaalde stabiele pH is gebracht. Niet in alle gevallen volstaat het bovenstaande principe om een goede scheiding te krijgen. Voorbeelden van analieten die niet op deze wijze met CE van elkaar gescheiden kunnen worden zijn neutrale (niet geladen) analieten of, zoals dit proefschrift onder meer beschrijft, enantiomeren (analieten met dezelfde fysische en chemische eigenschappen). In die gevallen die niet met een eenvoudige buffer oplossing zijn te scheiden zijn we aangewezen op doelbewuste toevoegingen (additieven) aan het oplosmiddel. Het doel van dit proefschrift is om additieven te onderzoeken die geheel of gedeeltelijk gebaseerd zijn op moleculaire herkenning en die daarmee de selectiviteit in electrokinetische scheidingen beïnvloeden. Zonder een

goede selectiviteit is het onmogelijk om een adequate kwalitatieve en/of kwantitatieve analyse uit te voeren en om de hoge efficiëntie die CE biedt uit te buiten.

Het eerste hoofdstuk van dit proefschrift geeft een introductie in CE en beschrijft onder meer de herkomst en ontwikkeling van de techniek. Verder beschrijft het de principes van chirale en moleculaire herkenning.

In hoofdstuk 2 wordt uitgebreid ingegaan op het begrip selectiviteit in CE. Er wordt benadrukt dat een goede selectiviteit noodzakelijk is om tot een goede scheiding te komen en op welke wijzen een adequate selectiviteit verkregen kan worden. Er wordt geconcludeerd dat scheidingssystemen waar moleculaire herkenning een rol speelt een extra mogelijkheid voor optimaliseren van de selectiviteit biedt.

Hoofdstuk 3 geeft een overzicht van het proefschrift.

Het eerste experimentele gedeelte van dit proefschrift (de hoofdstukken 4, 5 en 6) beschrijft het gebruik van neutrale chemisch gemodificeerde cyclodextrines die al dan niet toegevoegd worden aan een vloeibare polyethyleen glycol gel voor de scheiding van een aantal chirale maar ook niet-chirale farmaceutisch interessante verbindingen.

Hoofdstuk 4 beschrijft de ontwikkeling van een methode om de enantiomere zuiverheid te bepalen van (-) terbutaline, een geneesmiddel dat gebruikt wordt voor de behandeling van o.a. astma. Dit geneesmiddel wordt veelal als racemaat, dat wil zeggen gelijke hoeveelheid van de (+) enantiomeer en de (-) enantiomeer, toegediend. Onderzoek heeft echter uitgewezen dat alleen de (-) enantiomeer het juiste therapeutische effect heeft. Het is daarom van groot belang dat enantiomeren van dergelijke geneesmiddelen kunnen worden gescheiden. Het toevoegen van de cyclodextrines aan een polyethyleen glycol heeft een gunstig effect op de scheiding met als resultaat de detectie van een enantiomere onzuiverheid van 0.1%.

Hoofdstuk 5 beschrijft het gebruik van wiskundige modellen voor het bepalen van de optimale scheidingscondities van andere zogenaamde β -agonisten, wederom door gemodificeerde cyclodextrines aan een polyethyleen glycol gel toe te voegen. Uit deze modellen blijkt dat de ruimtelijke structuur van deze β -agonisten sterk van invloed is op de uiteindelijke scheiding.

In hoofdstuk 6, wordt aangetoond dat cyclodextrines ook kunnen worden gebruikt voor het afstemmen van de selectiviteit voor het scheiden van niet-chirale moleculen. Hiertoe wordt een mengsel van 7 niet-chirale en 3 chirale phenothiazinen (geneesmiddelen die gebruikt worden voor de behandeling van o.a. schizofrenie) gebruikt. Zowel de temperatuur als de concentratie van de cyclodextrines zijn gevarieerd en gebleken is dat het beste resultaat wordt verkregen bij 15 °C bij toevoeging van 8 mM hydroxypropyl- β -cyclodextrine.

Het tweede experimentele gedeelte (de hoofdstukken 7 en 8) van dit proefschrift beschrijft het gebruik van tegengesteld (t.o.v. het analiet) geladen chemisch gemodificeerde cyclodextrines.

In hoofdstuk 7 wordt een overzicht gegeven van geladen cyclodextrines die op dit moment in CE gebruikt worden en van de voordelen van geladen cyclodextrines boven neutrale cyclodextrines. Er wordt in dit hoofdstuk aandacht besteed aan theoretische modellen die zijn ontwikkeld om de enantiomere scheiding beter te kunnen voorspellen en om het scheidingsmechanisme beter te kunnen begrijpen.

In hoofdstuk 8 wordt de scheiding van de enantiomeren van ofloxacin beschreven met behulp van zo'n tegengesteld geladen cyclodextrine. Ofloxacin is een relatief nieuw antibioticum, waarvan de ene enantiomeer vele malen sterker werkzaam is dan het andere. Er is verder gekeken naar het effect van een combinatie van een geladen en een neutrale cyclodextrine op de chirale scheiding. Meestal was er geen significante verbetering van de selectiviteit ten gevolge van het toevoegen van een neutrale cyclodextrine en in één geval was er zelfs een negatief effect waarneembaar. Onder adequate scheidingscondities is tenslotte aangetoond dat er geen chemische en/of metabole omzetting plaatsvindt van de linksdraaiende (levofloxacin) naar het rechtsdraaiende enantiomeer. Hiertoe zijn urine monsters gemeten van een 20-tal hemofiele patiënten, die levofloxacin kregen toegediend vanwege infecties die zij hadden opgelopen ten gevolge van een verminderde weerstand door toegediende cytostatica (anti-tumormiddelen).

Het laatste deel van dit proefschrift (de hoofdstukken 9 en 10) behandelt het gebruik van moleculair geïmprimeerde polymeer ("Molecularly Imprinted Polymers", MIPs) deeltjes in CE.

In hoofdstuk 9 wordt een overzicht gegeven van de toepassingsmogelijkheden van MIPs.

Hoofdstuk 10 beschrijft het gebruik van MIPs in een CE systeem. De gedachte achter het toevoegen van MIPs aan de run buffer is ingegeven door het feit dat op deze wijze de capillairen niet hoeven te worden gepakt of dat er een coating aan de binnenkant van het capillair hoeft te worden aangebracht. De methode is in principe eenvoudig al moet worden opgemerkt dat het capillair alleen gedeeltelijk kan worden gevuld en dat alleen bij een lage pH (geen voorwaartse beweging van de run buffer in het capillair) kan worden gewerkt, zodat lichtverstrooiing in de detectieopening kan worden voorkomen. Er is aangetoond dat toevoeging van dergelijke deeltjes, met een diameter van circa 100 tot 200 nanometer, aan de loopvloeistof kan leiden tot chirale scheidingen en dat met name de grootte van de deeltjes de efficiëntie van de scheiding bepaalt. Tevens wordt in dit hoofdstuk aandacht besteed aan de synthese en karakterisering van deze microsferen. Ook al moet er nog de nodige optimalisering plaatsvinden, de conclusie lijkt gerechtvaardigd dat het gebruik van microsferen al dan niet met moleculaire herkenningselementen een veelbelovende, nieuwe methode is binnen de capillaire electroforese.