

# Elektroforeza kapilarna jako nowoczesne narzędzie w analizie chiralnej leków

## Część I. Mechanizm elektroforetycznego rozdzielania związków chiralnych, selektory chiralne

Katarzyna Michalska

Zakład Antybiotyków i Mikrobiologii, Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

Adres do korespondencji: Katarzyna Michalska, Zakład Antybiotyków i Mikrobiologii, Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa, tel./faks 022 851 52 15, e-mail: kmichalska@il.waw.pl

### Wstęp

Zainteresowanie badaczy ciągle wzbudają zagadnienia dotyczące izomerów optycznych (enancjomerów), czyli związków nieposiadających płaszczyzny symetrii w cząsteczce i dlatego niedających się nałożyć na swe odbicie lustrzane. Produkty lecznicze optycznie czynne zazwyczaj produkowane są jako racematy, czyli mieszaniny obu enancjomerów ze względu na wysokie koszty i trudność techniczną związaną z ich syntezą asymetryczną. Jednak od czasu raportu nad talidomidem [1] stopniowo zaczęto zdawać sobie sprawę, że często tylko jeden z enancjomerów wykazuje pożądaną aktywność terapeutyczną – korzystne parametry farmakologiczne, toksykologiczne oraz farmakodynamiczne (eutomer), podczas gdy drugi (distomer) jest nieaktywny lub może przyczyniać się do większej toksyczności [2, 3]. Zachowanie takie jest wynikiem innego oddziaływania każdego z enancjomerów z docelowym miejscem działania leków, tj. enzymy czy receptory, które mają również strukturę chiralną. Dzisiaj, co jest powszechnie akceptowane, para enancjomerów jest traktowana jako dwa różne związki. Dlatego obecnie dąży się do tego, aby otrzymywane leki były stereochemicznie czyste.

Władze odpowiedzialne za rejestrację leków zachęcają przemysł farmaceutyczny do rejestracji pojedynczych enancjomerów. Amerykańska agencja do spraw żywności i leków (US FDA) w przypadkach związków optycznie czynnych zaostrzyła wymagania patentowe o pełną dokumentację farmakologiczną i farmakokinetyczną pojedynczych enancjomerów, jak również ich kombinacji

**Capillary electrophoresis as a modern tool for chiral analysis of medicinal products. Part I. Enantioselection mechanism in capillary electrophoresis, chiral selectors** · The separation of enantiomers is a challenge in the pharmacy, but also in the chemistry and biology. The stereochemistry of enantiomers can affect their biological activities, therefore developing of a method for their purification and separation is of great interest. Capillary electrophoresis (CE) is a modern and advantageous tool in the chiral separation technique. This technique provides a number of advantages in chiral separations when compared with other methods: a high separation efficiency as well as flexibility in relation to optimization of chiral separation.

The separation of chiral compounds can be achieved in CE by simple addition to the background electrolyte of an appropriate chiral selector, e.g., native and derivatized cyclodextrin, natural and synthetic chiral micelles, crown ethers, chiral ligands, protein, oligo- and polysaccharides, and macrocyclic antibiotics. Among different chiral selectors, cyclodextrins and their derivatives are the most widely employed in chiral CE techniques. In the first part of this article cyclodextrin and crown ethers are described. The resolution mechanism, when CDs and crown ethers are used as chiral selectors, is usually based on inclusion complexation.

**Keywords:** Chiral capillary electrophoresis, cyclodextrins, crown ethers.

© Farm Pol, 2009, 65(9): 673-678

(racematów). Dodatkowo dokumentacja powinna zawierać dane dotyczące konwersji jednego enancjomeru w drugi. Klasycznym już przykładem racemizacji, czyli nieodwracalnego procesu przekształcania jednego z enancjomerów w mieszaninę

racemiczną jest talidomid, gdzie R-izomer ma pożądaną działaniem lecznicze, natomiast S-izomer jest silnym mutagenem powodującym choroby genetyczne u potomstwa. Właśnie z powodu racemizacji, jaka zachodzi w organizmie podanie nawet czystego R-enancjomeru nie jest do końca bezpieczne. Obecnie talidomid stosuje się jedynie w przypadkach leczenia szpiczaka mnogiego [4] oraz tylko u mężczyzn w ciężkich przypadkach trądu, jako leprostatyk [5].

### Elektroforeza kapilarna wśród technik separacyjnych służących do rozdzielania związków chiralnych

Coraz więcej syntetycznych związków optycznie czynnych stosuje się w lecznictwie w postaci pojedynczych enancjomerów. Pociąga to za sobą konieczność stosowania i rozwijania sprawnych i czułych technik analitycznych w celach zapewnienia właściwej kontroli leków.

Najbardziej popularne techniki analityczne służące do rozdzielania enancjomerów to chromatografia gazowa (ang. *gas chromatography*, GC) oraz wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high performance liquid chromatography*, HPLC). Zastosowania metody GC są ograniczone jedynie do związków lotnych, natomiast HPLC posiada szeroki zakres zastosowalności między innymi dlatego, że możliwe jest użycie dużej i różnorodnej liczby kolumn chiralnych służących do chromatograficznego rozdzielania enancjomerów. Kolumny te są stosunkowo drogie, ich czas życia jest krótki, sprawność mierzona liczbą pól teoretycznych jest niska w porównaniu z konwencjonalnym rozdziałem prowadzonym

w odwróconym układzie faz (ang. *reversed phase high performance liquid chromatography*, RP-HPLC). To wszystko stanowi o ograniczeniach tej techniki.

W porównaniu do HPLC elektroforeza kapilarna (ang. *capillary electrophoresis*, CE) postrzegana jest jako atrakcyjna technika służąca do rozdzielania związków optycznie czynnych ze względu na:

- wysoką sprawność, która pozwala obserwować enancjoselektywne efekty oddziaływań selektor-selektand niewidoczne w innych technikach,
- dużą elastyczność w odniesieniu do optymalizacji rozdzielania enancjomerów (możliwość szybkiej zmiany warunków rozdzielania oraz typu i stężenia selektora chiralnego),

- krótki czas analizy, małe objętości analizowanych substancji, jak i elektrolitu podstawowego, co daje możliwość stosowania nawet bardzo drogich selektorów chiralnych,
- jednoczesne stosowanie różnych selektorów chiralnych rozpuszczonych w elektrolicie podstawowym (układ podwójny) [6].

Znaczenie CE, jako techniki służącej do rozdzielania chiralnych ciągle wzrasta. Przejawem tego zainteresowania są liczne artykuły przeglądowe [7–15].

Różne rodzaje CE: kapilarna elektroforeza strefowa (ang. *capillary zone electrophoresis*, CZE), micelarna chromatografia elektrokinetyczna (ang. *micellar electrokinetic chromatography*, MEKC), elektrochromatografia kapilarna (ang. *capillary electrochromatography*, CEC), kapilarna izotachoforeza (ang. *capillary isotachopheresis*, CITP), kapilarna elektroforeza żelowa (ang. *capillary gel electrophoresis*, CGE) są wykorzystywane do rozdzielania chiralnych.

Informacje na temat kapilarnych technik elektromigracyjnych zamieszczono w książce autorstwa Witkiewicza [16] oraz monografii ogólnej Farmakopei Polskiej wydanie VII [17] oraz VIII. Zamieszczone tam informacje dotyczą istoty kapilarnych technik elektromigracyjnych, aparatury, charakterystyki przepływu elektroosmotycznego, ruchliwości elektroforetycznej oraz mechanizmu rozdzielania elektroforetycznego. Informacje te są wystarczające dla zrozumienia zasad, jakie obowiązują w kapilarnych technikach elektromigracyjnych. W niniejszej pracy opisano wykorzystanie techniki elektroforezy kapilarnej do elektroforetycznego rozdzielania enancjomerów, jak również skoncentrowano się na grupach selektorów chiralnych.

Rozdział izomerów optycznych można osiągnąć metodą bezpośrednią i pośrednią. Bezpośredni rozdział enancjomerów polega na tworzeniu labilnych kompleksów diastereoizomerycznych albo kompleksów inkluzyjnych, powstałych z enancjomerów z cząsteczkami chiralnymi, będącymi z nimi w procesie dynamicznej równowagi. Siły elektrostatyczne, wiązania wodorowe, van der Waalsa,  $\omega$ - $\omega$  oraz oddziaływania polarne przyczyniają się do rozpoznania procesu. Na skutek tych oddziaływań tworzą się nietrwałe kompleksy o różnej ruchliwości. W pośredniej metodzie rozdzielania [18] enancjomer tworzą kowalencyjne pary, diastereoizomerów z chiralnymi odczynnikami derywatyzującymi (ang. *chiral derivatizing agent*, CDA). Ze względu na fakt, że pary diastereoizomerów mają różne właściwości fizykochemiczne mogą być rozdzielane przy użyciu achiralnych warunków, tj.: metody krystalizacji frakcjonowanej, niestereoselektywnej chromatografii albo destylacji. Jednakże, aby różnice we właściwościach fizykochemicznych diastereoizomerów były wystarczająco duże, derywatacja powinna wystąpić blisko centrum stereogenicznego.

Zainteresowanie badaczy ciągle wzbudza zagadnienia dotyczące izomerów optycznych (enancjomerów), czyli związków nieposiadających płaszczyzny symetrii w cząsteczce i dlatego niedających się nałóżyc na swe odbicie lustrzane. Produkty lecznicze optycznie czynne zazwyczaj produkowane są jako racematy, czyli mieszaniny obu enancjomerów ze względu na wysokie koszty i trudność techniczną związaną z ich syntezą asymetryczną.

### Mechanizm rozdzielania elektroforetycznego związków chiralnych

Mechanizm rozdzielania enancjomerów w chiralnej elektroforezie kapilarnej (ang. *chiral capillary electrophoresis*, CCE) oparty jest na zasadach chromatograficznych, podczas gdy mechanizm ich migracji jest elektroforetyczny [19]. Ruchliwość elektroforetyczna ( $\mu_{ep}$ ) enancjomerów posiadających te same właściwości fizykochemiczne jest równa ruchliwości achiralnego medium, aby je rozdzielić należy zróżnicować ich ruchliwość elektroforetyczną. Rolą selektorów chiralnych jest zmiana nieselektywnej ruchliwości enancjomerów na różną efektywną ruchliwość elektroforetyczną ( $\mu_{eff}$ ), która jest wypadkową ruchliwości elektroforetycznej wolnego ( $\mu_{ep(E)}$ ) i skomplexowanego enancjomeru ( $\mu_{ep(EC)}$ ) [20].

$$\mu_{eff} = \left\{ \frac{[E]}{[E] + [EC]} \right\} \mu_{ep(E)} + \left\{ \frac{[EC]}{[E] + [EC]} \right\} \mu_{ep(EC)}$$
 gdzie [E] i [EC] są stężeniami wolnego i skomplexowanego enancjomeru.

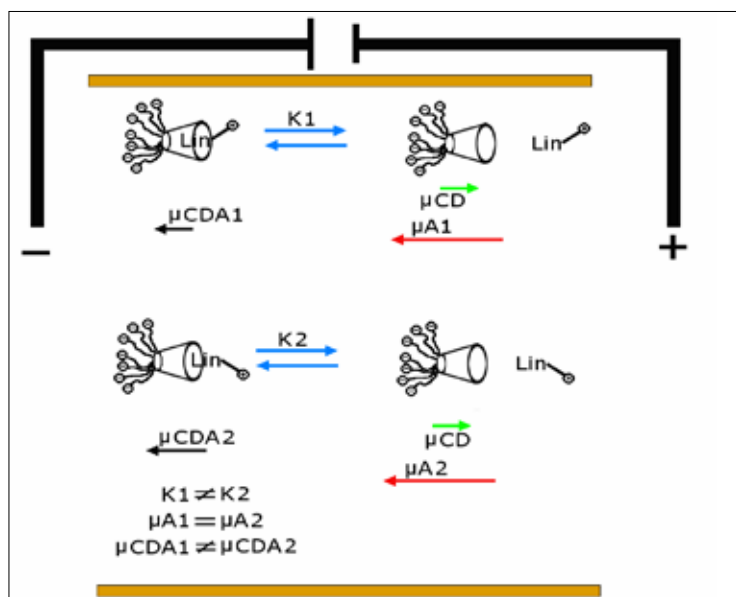
Schemat mechanizmu rozdzielania enancjomerów przedstawiono na **rycynie 1**.

Rozdziały izomerów optycznych, w CE można prowadzić dodając do elektrolitu podstawowego (ang. *background electrolyte*, BGE) różne selektory chiralne: cyklodekstryny [21] – natywne albo ich pochodne (obojętne i/albo obdarzone ładunkiem), metale chelatujące, etery koronowe, substancje powierzchniowo czynne [22], polisacharydy [23, 24], białka [25] oraz antybiotyki [26]. W **tabeli 1** zestawiono główne rodzaje selektorów chiralnych.

### Cyklodekstryny nieobdarzone ładunkiem elektrycznym

Cyklodekstryny (CD) i ich pochodne ze względu na niską wartość absorpcji w UV, niski koszt oraz dobrą rozpuszczalność w wodzie są najszerzej stosowanymi selektorami chiralnymi w CE [28]. Po raz pierwszy CD, jako selektory chiralne w CE zostały wykorzystane przez grupę Smolkowej-Keulemansowej [29], która w metodzie izotachoforezy zastosowała dimetylową (di-OMe- $\beta$ -CD) oraz trimetylową (tri-OMe- $\beta$ -CD) pochodną  $\beta$ -CD dodaną do elektrolitu wiodącego.

Do najczęściej spotykanych CD zaliczamy  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -CD (natywne), które składają się odpowiednio z 6, 7 i 8 reszt D-(+)-glukopiranozy połączonych ze sobą wiązaniem  $\alpha$ -1,4-glikozydowym. Cyklodekstryny mają budowę ściętego stożka, który otwarty jest na obu końcach. Jedno z obrzeży modelowego stożka otoczone jest drugorzędowymi grupami hydroksylowymi przy węglach C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub> każdej jednostki glukozy. Mniejszy otwór stożka otoczony jest bardziej polarnymi pierwszorzędowymi grupami hydroksylowymi znajdującymi się przy węglach C<sub>6</sub> każdej z reszt glukozy tworzących makrocykl. Powierzchnia CD jest



**Rycina 1.** Schemat rozdziału enancjomerów (A1, A2; Lin-) metodą bezpośrednią z wykorzystaniem cyklodekstryny (CD) jako selektora chiralnego. Nietrwale kompleksy (CDA1, CDA2) poruszają się w kierunku detektora z różną prędkością ( $\mu$ ), wówczas, kiedy posiadają różną stałą trwałości kompleksów ( $K1 \neq K2$ ) i/lub różne efektywne ruchliwości elektroforetyczne ( $\mu_{CDA1} \neq \mu_{CDA2}$ ). Bez dodatku selektora chiralnego szybkość migracji obu enancjomerów jest identyczna,  $\mu_{A1} = \mu_{A2}$ , wg [18], zmodyfikowana

w zasadzie hydrofilowa, natomiast wnętrza ma charakter hydrofobowy. Związki te posiadają zdolność tworzenia kompleksów inkluzyjnych typu „gospodarz-gość” właśnie dzięki obecności hydrofobowego wnętrza, stanowiąc w ten sposób cząsteczkę „gospodarza” dla rozmaitych cząsteczek lub jonów. Budowa geometryczna cząsteczek „gościa” determinuje selektywność procesu kompleksowania. Czynniki powodującymi stereoselektywne tworzenie kompleksów jest kształt i wielkość wnęki CD. Głębokość wnęki wynosi 7,9 Å (dla wszystkich  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ), natomiast szerokość zależy od liczby jednostek glukozy tworzących pierścienia. Na **rycynie 2** przedstawiono schemat cząsteczki cyklodekstryny.

Jednym z warunków utworzenia kompleksu inkluzyjnego jest to, że cząsteczki „gościa” muszą w całości albo przynajmniej w znacznej części wnikać do wnętrza CD. Steryczne dopasowanie nie jest jednak jedynym wymogiem chiralnego różnicowania. Musi ono być uzupełnione oddziaływaniami elementów strukturalnych „gościa” z grupami funkcyjnymi obecnymi na krawędzi toroidalnej struktury CD, czyli oddziaływaniami grup hydroksylowych w pozycji C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub>, tworzącymi w ten sposób wiązania

Różne rodzaje CE:  
 kapilarna elektroforeza strefowa (ang. *capillary zone electrophoresis*, CZE),  
 micelarna chromatografia elektrokinetyczna (ang. *micellar electrokinetic chromatography*, MEKC),  
 elektrochromatografia kapilarna (ang. *capillary electrochromatography*, CEC),  
 kapilarna izotachoforeza (ang. *capillary isotachopheresis*, CITP),  
 kapilarna elektroforeza żelowa (ang. *capillary gel electrophoresis*, CGE)  
 są wykorzystywane do rozdzielów chiralnych.

**Tabela 1.** Główne rodzaje selektorów chiralnych wg [27], zmodyfikowana

Źródło pochodzenia	Typ	Selektor chiralny
naturalne	białka albuminy:	albuminy surowicy ludzkiej, bydłęcej <sup>CE</sup>
	glikoproteiny:	orozomukoid (kwaśna $\alpha_1$ -glikoproteina) <sup>CE</sup> owomukoid <sup>CE</sup> , owoglikoproteina <sup>CE</sup> , awidyna <sup>CE</sup> , białka wiążące ryboflawinę <sup>CE</sup> , trypsyna, $\alpha$ -chymotrypsyna, pepsyna <sup>CE</sup>
	enzymy:	lizozym <sup>CE</sup> , celobiohydrolaza I <sup>CE</sup>
	inne:	owotransferyna <sup>CE</sup> , $\beta$ -laktoglobulina <sup>CE</sup> , transferyna <sup>CE</sup>
	oligosacharydy	$\alpha$ -, $\beta$ - i $\gamma$ -cyklodekstryny <sup>CE</sup> disacharydy <sup>CE</sup> maltodekstryny <sup>CE</sup>
	polisacharydy	celuloza, amyloza <sup>CE</sup> , skrobia, dekstran <sup>CE</sup> 40, 70 heparyna <sup>CE</sup> , siarczan chondroityny (A, B, C) <sup>CE</sup> peptyny <sup>CE</sup>
	antybiotyki ansamycyny:	ryfamycyna B, ryfamycyna SV <sup>CE</sup>
	glikopeptydy:	wankomycyna <sup>CE</sup> , teikoplanina <sup>CE</sup> , awoparycyna <sup>CE</sup> eromomycyna <sup>CE</sup> , substancje pokrewne wankomycyny <sup>CE</sup> , rystocetyna A, aktaplanina A <sup>CE</sup>
	aminoglikozydy:	kanamycyna, streptomycyna, fradiomycyna <sup>CE</sup>
	cząsteczki o niskiej $M_{cz}$	aminokwasy <sup>CE</sup> kwas cholowy/sole żółciowe alkaloidy kwas winowy
półsyntetyczne	modyfikowane oligosacharydy	pochodne cyklodekstryn <sup>CE</sup> polimery cyklodekstryn <sup>CE</sup>
	modyfikowane polisacharydy	karbaminiany polisacharydów <sup>CE</sup> estry polisacharydów <sup>CE</sup>
	siarczany polisacharydów	siarczan dekstranu <sup>CE</sup> $\lambda$ -karagenina <sup>CE</sup> pochodne chondroityny <sup>CE</sup>
	modyfikowane cząsteczki o niskiej $M_{cz}$	selektory jono-wymienne <sup>CE</sup>
syntetyczne	cząsteczki o niskiej $M_{cz}$	selektor typu Pirkle'a (donorowo-akceptorowe) <sup>CE</sup> receptory cząsteczkowe <sup>CE</sup>
	selektory LEC	etery koronowe <sup>CE</sup> pochodne proliny <sup>CE</sup>
	polimery spiralne/helikalne	poliakrylamid <sup>CE</sup> poliakrylan, MIPs (mukopolisacharydy)

CE – selektory chiralne stosowane w elektroforezie kapilarnej,  
LEC – chromatografia z wymianą ligandów

wodorowe lub oddziaływania typu dipol-dipol [31]. Powstający kompleks inkluzyjny jest zazwyczaj bardziej stabilny od substratów, a tym samym układ taki jest bardziej korzystny energetycznie. W ogromnej większości powstających w ten sposób kompleksów stosunek molowy cząsteczki „gościa” do „gospodarza” wynosi 1:1. W większości przypadków proces kompleksowania jest regioselektywny i stereospecyficzny, a CD wykazują selektywność substratów.

Modyfikacje grup hydroksylowych w pozycjach  $C_2$ ,  $C_3$  i  $C_6$  w sposób istotny zmieniają właściwości fizyczne wnęki. Modyfikacja grup  $C_2$  i  $C_6$  np. przez

podstawienie grupy metoksylovej powoduje, że wnęka zwiększa swoją głębokość, dzięki czemu cząsteczki „gościa” mogą wnikać głębiej i być lepiej inkludowane [31, 32].

Rodzaj i stężenie CD odgrywają jedną z najważniejszych ról w osiągnięciu właściwego rozdzielania. Choć rozpuszczalność  $\beta$ -CD w wodnych roztworach jest ograniczona do poziomu 20 mM (limit ten może ograniczyć rozdzielanie enancjomerów), można ją zwiększyć przez chemiczną modyfikację  $\beta$ -CD, dodatek mocznika lub modyfikatora organicznego do BGE [33, 34]. I tak metylowa  $\beta$ -CD jest równie popularnym selektorem chiralnym biorąc pod uwagę wysoką rozpuszczalność i niską cenę jak nie podstawiona  $\beta$ -CD. Inne modyfikowane chemicznie CD to np.: heptakis-(2,3,6-tri-O-metylo)- $\alpha$ -CD, hydroksypropylo- $\beta$ -CD, hydroksyetylo- $\beta$ -CD, mono-3-O-fenylkarbamilo- $\beta$ -CD, dimetylo- $\beta$ -CD i trimetylo- $\beta$ -CD. Natywne CD i ich obojętne pochodne [35] są skutecznymi selektorami chiralnymi do rozdzielania enancjomerów obdarzonych ładunkiem. W ich obecności nie można natomiast różnicować ruchliwości obojętnych enancjomerów, ponieważ obojętne CD nie posiadają własnej ruchliwości elektroforetycznej. Obojętne CD tylko w połączeniu z micelami, albo naładowanymi CD mogą być wykorzystane do rozdzielania neutralnych lub hydrofobowych substancji. W pierwszym przypadku tworzą układ podwójny [8], w drugim zmodyfikowaną poprzez dodatek cyklodekstryn micelną chromatografię elektrokinetyczną (CD-MEKC) [36].

### Cyklodekstryny obdarzone ładunkiem elektrycznym

Oprócz neutralnych, występują również cyklodekstryny obdarzone ładunkiem elektrycznym (ang. *charge cyclodextrins*, CCDs). Naładowane CD posiadają własną ruchliwość elektroforetyczną, różną w zależności od rodzaju i liczby grup funkcyjnych. Zsyntetyzowanie CCDs dało możliwość rozdzielania zarówno neutralnych jak i obdarzonych ładunkiem analitów. Ponadto CCDs oferują wyższą zdolność rozdzielczą niż neutralne CD [13].

W 1989 r. Terabe jako pierwszy zastosował CCDs w CE [37]. Obdarzone ładunkiem CD mogą posiadać grupy funkcyjne pochodzące od słabych elektrolitów (tj. grupa karboksymetylowa, karboksyetylowa, fosforanowa, aminowa), co pozwala na stosowanie tych cyklodekstryn w ograniczonym zakresie pH, albo mogą posiadać grupy funkcyjne pochodzące od silnych elektrolitów (tj. grupa siarczanowa, eter sulfobutylowy, eter sulfopropylowy, tetraalkyloamoniowy), co daje możliwość użycia ich w bardzo szerokim zakresie pH [38], ponieważ niezależnie od wartości pH elektrolitu podstawowego CD występują w formie zjonizowanej.

Większość stosowanych obecnie CCDs jest mieszaniną wielu CD, różniących się pomiędzy sobą zarówno



stopniem, jak i pozycją podstawienia grup hydroksylowych przy węglach C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> i C<sub>6</sub>. Są to tzw. przypadkowo podstawione CD. Liczba i miejsce podstawienia grup hydroksylowych w cząsteczce CD odgrywa ogromną rolę w procesie enancjoróżnicowania. Należy podkreślić, że stosowanie cyklodekstryn, które są różnie podstawione może dawać niepowtarzalne wyniki analityczne. W celu wyeliminowania tego problemu zsyntetyzowano pojedyncze, dobrze scharakteryzowane izomery CD. Pojedyncze izomery –β i –γ CD zostały zsyntetyzowane i wprowadzone po raz pierwszy przez grupę Vigha [39–42]. Autorzy ci zsyntetyzowali pochodne, które były całkowicie podstawione w pozycji C<sub>6</sub> CD grupą siarczanową oraz całkowicie podstawione w pozycji C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub> grupą hydrofilową, umiarkowanie hydrofilową lub hydrofobową. Jednakże pomimo stosowania regioselektywnej syntezy w przypadku pojedynczych izomerów CD możliwe jest również, że i one będą zanieczyszczone kilkoma różnymi CD, jak zostało opisane przez Mikuša i wsp. [43].

Cyklodekstryny obdarzone ładunkiem ujemnym mogą być zastosowane do rozdzielania związków o charakterze zasadowym i obojętnym, jak również kwaśnych, ale w formie obojętnej [44]. Natomiast kationowe CD, mają zastosowanie do rozdzielania kwasów organicznych. Najczęściej stosowane kationowe pochodne CD zawierają grupy aminowe lub alkiłamiinowe, czwartorzędowe sole amonowe, sole sulfoniowe oraz sole fosfonowe.

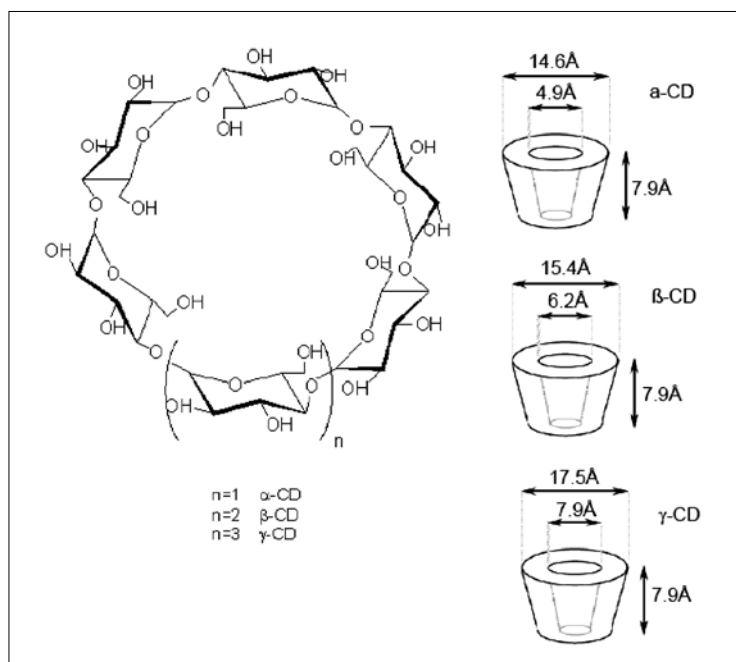
Niedogodnością stosowania CCDs może być: silna absorpcja w UV, wzrost siły jonowej buforu oraz możliwość adsorpcji selektora chiralnego do ścianek kapilary.

### Etery koronowe

Etery koronowe są makrocyclicznymi polieterami tworzącymi stabilne i selektywne kompleksy z jonami metali alkalicznych oraz aminami pierwszorzędowymi. Etery koronowe cechują się szczególnymi właściwościami, tj. dobra rozpuszczalność w różnych rozpuszczalnikach oraz wysoka selektywność dla wielu jonów. Najbardziej popularnym eterem koronowym używanym w CE jest tetrakarboksylowy eter 18-korona-6 (18C6H<sub>4</sub>).

Metale alkaliczne tj. sód i potas mogą tworzyć silne kompleksy z eterami koronowymi przeszkadzając w rozdzielaniu enancjomerów z grupą aminową [45]. Z tego właśnie powodu powinno się unikać jonów metali alkalicznych przygotowując zarówno bufor rozdzielający z użyciem 18C6H<sub>4</sub>, jak również próbkę, ponieważ obecność tych jonów może znacząco popsuć wydajność rozdzielczą układu [46].

W przypadku eterów koronowych tworzenie kompleksu inkluzyjnego zachodzi poprzez oddziaływanie typu jon-dipol oraz wiązania wodorowe O-H...N<sup>+</sup>. Im więcej wiązań wodorowych oraz im mniejsza zawada



Rycina 2. Wzór strukturalny oraz schemat toroidalnej budowy cyklodekstryn (CD-α, CD-β, CD-γ), wg [30]

przestrzenna podstawników w pobliżu grupy aminowej, tym trwalszy powstaje kompleks.

Elektroforetyczny rozdział enancjomerów można osiągać również dodając achiralny eter koronowy do buforu BGE zawierającego w swoim składzie β-CD. Tworzy się wówczas kompleks kanapkowy (ang. sandwich) pomiędzy eterem, analitem i β-CD, jako chiralnym selektorem.

### Podsumowanie

Najczęściej stosowanymi selektorami chiralnymi są cyklodekstryny. Natywne CD i ich obojętne pochodne są skutecznymi selektorami chiralnymi do rozdzielania enancjomerów obdarzonych ładunkiem. Natomiast w ich obecności nie można zróżnicować ruchliwości obojętnych enancjomerów. Dopiero wprowadzenie przez Terabego w 1989 r. cyklodekstryn obdarzonych ładunkiem elektrycznym umożliwiło elektroforetyczny rozdział związków optycznie czynnych zarówno o charakterze kwasowym, zasadowym, jak i obojętnym. Jednakże zastosowanie CD, które są różnie podstawione daje niepowtarzalne wyniki analityczne, co objawia się brakiem odtwarzalności metody. Zastosowanie odpowiednich pojedynczych izomerów CD, otrzymywanych w wyniku stereospecyficznej i regioselektywnej syntezy pozwala na uniknięcie tego problemu.

W drugiej części pracy dotyczącej wykorzystania CE do rozdzielania związków optycznie czynnych zostaną scharakteryzowane metody chiralnej micelarnej chromatografii elektrokinetycznej, elektroforezy z wymianą ligandów, elektrokinetycznej chromatografii powinowactwa oraz elektrochromatografii kapilarnej.

## Piśmiennictwo

1. Blaschke G., Kraft H.P., Fickentscher K., Köhler K.: Chromatographische racemattrennung von thalidomide und teratogene wirkung der enantiomere, *Arzneim-Forsch.*, 1979, 29, 1640–1642.
2. Hutt A.J., Drug chirality and its pharmacological consequences. W: *Introduction to the Principles of Drug Design and Action*, Smith H.J. (Ed), 4<sup>th</sup> edition; CRS Press (Taylor & Francis) (Boca Raton & London), 2006, 117–183.
3. Hutt A.J., O'Grady J.: Drug chirality: A consideration of the significance of the stereochemistry of antimicrobial agents, *J. Antimicrob. Chemother.*, 1996, 37, 7–32.
4. Szpiczak mnogi – zalecenia National Comprehensive Cancer Network, streszczenie National Comprehensive Cancer Network Clinical practice guidelines in oncology: multiple myeloma, *Medycyna Praktyczna, Onkologia*, 2007/3, 73–78.
5. Zejc A., Gorczyca M.: *Z chemii leków, Budowa chemiczna a działanie farmakologiczne*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004, 59–65.
6. Fillet M., Crommen H.J.: Enantiomeric separations of drugs using mixtures of charged and neutral cyclodextrins, *J. Chromatogr. A*, 2000, 875, 123–134.
7. Vespalec R., Božek P.: Chiral separation in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 1999, 20, 2579–2591.
8. Gübitz G., Schmid M.G.: Recent progress in chiral separation principles in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 2000, 21, 4112–4135.
9. Scriba G.K.E.: Selected fundamental aspects of chiral electromigration techniques and their application to pharmaceutical and biomedical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, 27, 373–399.
10. Chankvetadze B., Blaschke G.: Enantioseparations in capillary electromigration techniques: recent developments and future trends, *J. Chromatogr. A*, 2001, 906, 309–363.
11. Amini A.: Recent developments in chiral capillary electrophoresis and applications of this technique to pharmaceutical and biomedical analysis, *Electrophoresis*, 2001, 22, 3107–3130.
12. Ha Ph.T.T., Hoogmartens J., Schepdael A.V.: Recent advances in pharmaceutical applications of chiral capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41, 1–11.
13. Chankvetadze B.: Enantioseparations by using capillary electrophoretic techniques. The story of 20 and a few more years, *J. Chromatogr. A*, 2007, 1168, 45–70.
14. Gübitz G., Schmid M.G.: Chiral separation by capillary electromigration techniques, *J. Chromatogr. A*, 2008, 1204, 140–156.
15. Sánchez-Hernández L., Crego A.L., Marina M.L., García-Ruiz C.: Sensitive chiral analysis by CE: An update, *Electrophoresis*, 2008, 29, 237–251.
16. Witkiewicz Z.: *Podstawy chromatografii, kapilarnie techniki elektromigracyjne*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2005, 355–400.
17. *Farmakopea Polska VII*, tom I, *Elektroforeza kapilarna 01/2005: 20247*, Wydawnictwo PTFarm, Warszawa 2006, 167–173.
18. Gübitz G., Schmid M.G.: Chiral separation principles in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1997, 792, 179–225.
19. Chankvetadze B.: Recent trends in enantioseparations using capillary electromigration techniques, *Trends Anal. Chem.*, 1999, 18, 485–498.
20. Wren S.A.C., Rowe R.C.: Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis I. Initial evaluation of a model, *J. Chromatogr.* 1992, 603, 235–241.
21. Del Valle E.M.M.: Cyclodextrin and their uses: a review, *Process Biochemistry* 2004, 39, 1033–1046.
22. Otsuka K., Terabe S.: Enantiomer separation of drugs by micellar electrokinetic chromatography using chiral surfactants, *J. Chromatogr. A*, 2000, 875, 163–178.
23. Nishi H., Kuwahara Y.: Enantiomer separation by capillary electrophoresis utilizing noncyclic mono-, oligo- and polysaccharides as chiral selectors, *J. Biochem. Biophys. Methods* 2001, 48, 89–12.
24. Zheng J., Bragg W., Hou J., Lin N., Chandrasekaran S., Shamsi S.A.: Sulfated and sulfonated polysaccharide as chiral stationary phases for capillary electrochromatography and capillary electrochromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 857–872.
25. Haginaka J.: Enantiomer separation of drugs by capillary electrophoresis using proteins as chiral selectors, *J. Chromatogr. A*, 2000, 875, 235–254.
26. Bojarski J.: Antybiotyki jako elektroforetyczne i chromatograficzne selektory chiralne, *Wiadomości chemiczne*, 1999, 53, 235–247.
27. Maier N.M., Franco P., Linder W.: Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives, *J. Chromatogr. A*, 2001, 906, 3–33.
28. Chankvetadze B.: *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*. Wiley, Chichester 1997, 555.
29. Snopek J., Jelínek I., Smolková-Keulemansova E.: Use of cyclodextrin in isotachopheresis. IV The influence of CD on chiral resolution of ephedrine alkaloid enantiomers, *J. Chromatogr.*, 1988, 438, 211–218.
30. Huang L., Tonelli A.J.M.S., *Macromol. Chem. Phys.*, 1998, 38, 781, z: [http://64.233.183.104/search?q=cache:stphps1BH14:txspace.tamu.edu/bitstream/1969.1/4211/1/etd-tamu-2005B-CHEM-Maldona.pdf+Huang+L.,+Tonelli+A.J.M.S-Rev.,+Macromol.Chem.Phys.+38+\(1998\)+781-788&hl=pl&ct=clnk&cd=1&gl=pl](http://64.233.183.104/search?q=cache:stphps1BH14:txspace.tamu.edu/bitstream/1969.1/4211/1/etd-tamu-2005B-CHEM-Maldona.pdf+Huang+L.,+Tonelli+A.J.M.S-Rev.,+Macromol.Chem.Phys.+38+(1998)+781-788&hl=pl&ct=clnk&cd=1&gl=pl).
31. Fanali S.: Identification of chiral drug isomers by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1996, 735, 77–121.
32. Tökés B., László F., Buchwald P., Donáth-Nagy G., Vancea Sz., Sánta N., Kis E.L.: Structural studies on the chiral selector capacity of cyclodextrin derivatives, *J. Biochem. Biophys. Methods* 2008, 70, 1276–1282.
33. Li J., Waldron K.C.: Estimation of the pH-independent binding constants of alanylphenylalanine and leucylphenylalanine stereoisomers with beta-cyclodextrin in the presence of urea, *Electrophoresis*, 1999, 20, 171–179.
34. Wang F., Khaledi M.G.: Chiral separations by nonaqueous capillary electrophoresis, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 3460–3467.
35. Koppenhoefer B., Zhu X., Jakob A., Wuerthner S., Lin B.: Separation of drug enantiomers by capillary electrophoresis in the presence of neutral cyclodextrins, *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 135–161.
36. Terabe S., Miyashita Y., Shibata O., Barnhart E.R., Alexander L.R., Patterson D.G., Karger B.L., Hosoya K., Tanaka N.: Separation of highly hydrophobic compounds by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr.*, 1990, 516, 23–31.
37. Terabe S.: Electrokinetic chromatography: An interface between electrophoresis and chromatography, *Trends Anal. Chem.*, 1989, 8, 129–134.
38. Williams B.A., Vigh G.: Dry look at the CHARM (charged resolving agent migration) model of enantiomer separations by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1997, 777, 295–309.
39. Vincent J.B., Kirby D.M., Nguyen T.V., Vigh G.: A family of single-isomer chiral resolving agents for capillary electrophoresis. 2. Hepta-6-sulfato- $\beta$ -cyclodextrin, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 4419–4428.
40. Vincent J.B., Sokolowski A.D., Nguyen T.V., Vigh G.: A family of single-isomer chiral resolving agents for capillary electrophoresis. 1. Heptakis (2,3-diacetyl-6-sulfato)- $\beta$ -cyclodextrin, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 4226–4233.
41. Cai H., Nguyen T.V., Vigh G.: A family of single-isomer chiral resolving agents for capillary electrophoresis. 3. Heptakis (2,3-dimethyl-6-sulfato)- $\beta$ -cyclodextrin, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 580–589.
42. Zhu W., Vigh G.: A family of single-isomer, sulfated  $\gamma$ -cyclodextrin chiral resolving agents for capillary electrophoresis. 1. Octakis (2,3-diacetyl-6-sulfato)- $\gamma$ -cyclodextrin, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 310–317.
43. Mikuš P., Kaniánsky D., Sebesta R., Salisova M.: Analytical characterization of purities of alkyl- and arylamino derivatives of  $\beta$ -cyclodextrin by capillary zone electrophoresis with conductivity detection, *Enantiomer*, 1999, 4, 279–287.
44. Yanes E.G., Gratz S.R., Sutton R.M.C., Stalcup A.M.: A comparison of phosphated and sulfated  $\beta$ -cyclodextrins as chiral selectors for capillary electrophoresis, *Anal. Chem.*, 2001, 369, 412–417.
45. Jang J., Cho S.-I., Chung D.S.: Comparative studies of various run buffers for chiral capillary electrophoresis using chiral crown ether as a chiral selector, *Electrophoresis*, 2001, 22, 4362–4367.
46. Cho S.-I., Lee K.-N., Kim Y.-K., Jang J., Chung D.S.: Chiral separation of gemifloxacin in sodium-containing media using chiral crown ether as a chiral selector by capillary and microchip electrophoresis, *Electrophoresis*, 2002, 23, 972–977.

Otrzymano: 2009.06.26 · Zaakceptowano: 2009.07.10