

Elektroforeza kapilarna jako nowoczesne narzędzie w analizie chiralnej leków. Część II. Techniki elektromigracyjne stosowane do rozdzielania związków chiralnych, antybiotyki jako selektory i związki chiralne

Katarzyna Michalska

Zakład Antybiotyków i Mikrobiologii, Narodowy Instytut Leków, 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

W pierwszej części pracy opisano mechanizm rozdzielania elektroforetycznego związków chiralnych oraz scharakteryzowano dwie grupy selektorów chiralnych tworzących kompleksy inkluzyjne – cyklodekstryny i etery koronowe. W tej części pracy opisano kolejne grupy selektorów chiralnych i powiązane z nimi techniki elektromigracyjne tj.: substancje powierzchniowo czynne i chiralną micelną chromatografię elektrokinetyczną, metale chelatujące i elektroforezę z wymianą ligandów, białka i elektrokinetyczną chromatografię powinowactwa oraz elektrochromatografię kapilarną. Opisano również antybiotyki makrocycliczne, jako selektory chiralne oraz przedstawiono wybrane aplikacje rozdzielania chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych.

Chiralna micelarna chromatografia elektrokinetyczna

Technika MEKC [1] wprowadzona przez Terabego w 1984 r. jest wykorzystywana do rozdzielenia związków obojętnych, albo takich, które mają podobną ruchliwość elektroforetyczną. W MEKC wykorzystuje się różne substancje powierzchniowo czynne (jonywe, neutralne) powyżej ich krytycznego stężenia tworzącego micelle (ang. *critical micellar concentration*, CMC) – uzyskując w ten sposób micelną fazę pseudostacjonarną (PS). Rozdział dokonuje się na podobnych zasadach, jakie obowiązują w chromatografii – rozpuszczone cząsteczki ulegają podziałowi między wodną fazę buforu a fazę PS złożoną z miceli. Rozdział

Capillary electrophoresis as a modern tool for chiral analysis of medicinal products. Part II. Electromigration techniques of enantioseparation, antibiotics as chiral selectors and chiral compounds

This paper provides an overview of the chiral capillary electrophoresis, according to CE modes, micellar electrokinetic capillary chromatography, ligand-exchange electrophoresis, affinity capillary electrokinetic chromatography, capillary electrochromatography and use of a macrocyclic antibiotics as chiral selectors.

Due to the tremendous number of publications, this article is aimed to focus on major developments in chiral separation and selected applications of antibacterial chemotherapeutics.

Keywords: Chiral capillary electrophoresis.

© Farm Pol, 2009, 65(12): 901-906

dokonuje się na podstawie różnic współczynników podziału dla różnych substancji.

Rozdział enancjomerów z wykorzystaniem MEKC może być realizowany na dwa sposoby. Pierwszy wymaga dodatku chiralnego środka powierzchniowo czynnego, drugi zastosowania achiralnego surfaktanta w obecności chiralnego selektora.

Do chiralnych surfaktantów zaliczamy zarówno naturalne środki powierzchniowo czynne, jak również syntetyczne monomery oraz polimery. Do chiralnych surfaktantów pochodzenia naturalnego zaliczyć można pochodne kwasu cholanowego: kwas cholowy, deoksycholowy, chenodeoksycholowy, litocholowy oraz chiralne surfaktanty glikozydowe (GS), tj. digitonina,

Technika MEKC wprowadzona przez Terabego w 1984 r. jest wykorzystywana do rozdzielania związków obojętnych, albo takich, które mają podobną ruchliwość elektroforetyczną. W MEKC wykorzystuje się różne substancje powierzchniowo czynne (jonowe, neutralne) powyżej ich krytycznego stężenia tworzącego micelle (ang. *critical micellar concentration*, CMC) – uzyskując w ten sposób micelną fazę pseudostacjonarną (PS). Rozdział dokonuje się na podobnych zasadach, jakie obowiązują w chromatografii – rozpuszczone cząsteczki ulegają podziałowi między wodną fazę buforu a fazę PS złożoną z miceli. Rozdział dokonuje się na podstawie różnic współczynników podziału dla różnych substancji.

saponiny [2]. W większości GS są związkami obojętnymi, które mogą zostać zjonizowane *in situ* przez kompleksowanie grup sacharydowych z jonami boranowymi, tworząc natadowane micelle, jak zostało to przedstawione przez Mechrefa i Rassiego [3]. W ostatnich latach zsyntetyzowano wiele chiralnych środków powierzchniowo czynnych [4]: N-alkanoylo-L-aminokwasy, N-dodeksoxykarbonylo-aminokwasy, alkiłowane glikozydy, kwas winowy, glikozydy steroidowe. Monomeryczne surfaktanty nie zyskały dużego zainteresowania wśród badaczy, z wyjątkiem nowej tendencji, syntetyczne chiralne surfaktanty tworzą tzw. strukturę pęcherzykową (ang. *vesicles*). Pęcherzyki mają większe rozmiary w porównaniu do normalnych miceli, dzięki czemu pozwalają poszerzyć okno czasowego rozdzielania, powodując tym samym wzrost rozdzielczości dla wysoce hydrofobowych chiralnych analitów. Korzystając z konwencjonalnych miceli rozdział hydrofobowych analitów jest trudny do przeprowadzenia, ponieważ czasy ich migracji są zbliżone do czasu migracji miceli, posiadając bardzo wysoki współczynnik retencji. Mohanty i Dey przeprowadzili liczne rozdziały związków chiralnych z wykorzystaniem surfaktantów, tworzących pęcherzyki,

które składają się z następujących elementów: aromatycznego pierścienia, wiązania amidowego i estrowego oraz łańcucha węglowodorowego. Są to pochodne N-acylowe aminokwasów, tj.: sól sodowa N-(4-*n*-dodecyloksybenzoilo)-L-waliny, N-(4-*n*-dodecyloksybenzoilo)-L-leucyny, N-(4-*n*-dodecyloksybenzoilo)-L-izoleucyny, N-(4-*n*-oktyloksybenzoilo)-L-waliny [5, 6, 7]. Głównymi zaletami surfaktantów tworzących pęcherzyki wydają się być: niskie wartości krytycznego stężenia tworzącego pęcherzyki (ang. *critical vesicles concentration*, CVC), wysoka hydrofobowość pęcherzykowych agregatów, co ułatwia podział analitów pomiędzy fazę wodną a utworzoną z pęcherzyków, jak również możliwość analizy w połączeniu z detektorem masowym.

Jednak najbardziej interesującymi w chiralnej MEKC są polimerowe środki powierzchniowo czynne [8]. Otrzymywane są one poprzez polimeryzację kowalencyjnie związanych małych cząsteczek surfaktantów, tworząc w ten sposób pojedynczą cząsteczkę, nazwaną micelą cząsteczkową. Takie micelle są stabilniejsze i bardziej sztywne od konwencjonalnych miceli. Strukturalna stabilność polimerowych surfaktantów umożliwia ich zastosowanie w bogato organicznym BGE. Wartość CMC jest z zasady równa zeru, i dlatego

polimerowe surfaktanty mogą być używane w bardzo małych stężeniach, umożliwiając tym samym stosowanie również innych substancji rozpuszczonych w BGE, nie obawiając się o nadmierny wzrost prądu w kapilarze, który mógłby zahamować przebieg procesu elektroforetycznego. Inną istotną cechą polimerowych miceli jest to, że nie mogą wnikać do wnętrza cząsteczki CD (CD-MEKC) i dlatego nie mogą przeszkadzać w chiralnym rozpoznawaniu przez cząsteczkę CD. Pomagają w ten sposób ominąć problem współzawodnictwa pomiędzy enancjomerami, surfaktantem a CD, prowadzący do zmniejszenia rozdzielczości pomiędzy badaną parą enancjomerów [9].

Jednak sztywność cząsteczkowych miceli prowadzi również do wolniejszego przeniesienia masy analitu pomiędzy fazę pseudostacjonarną a fazę wodną, prowadząc do gorszej rozdzielczości w porównaniu z zastosowaniem konwencjonalnych miceli. Więcej uwag dotyczących stosowania cząsteczkowych miceli można znaleźć w pracy Palmera i wsp. [10].

Optymalizacja rozdzielania w chiralnej MEKC może być osiągnięta poprzez: zmianę rodzaju i stężenia chiralnego środka powierzchniowo czynnego, użycie mieszanych micelarnych pseudostacjonarnych faz, dodanie selektorów chiralnych, np. CD do BGE zawierającego chiralne albo achiralne surfaktanty oraz użycie syntetycznych albo półsyntetycznych chiralnych substancji powierzchniowo czynnych.

Elektroforeza z wymianą ligandów

Elektroforeza z wymianą ligandów (ang. *ligand-exchange electrophoresis*, LEE) została zastosowana po raz pierwszy w 1985 roku przez Gassmanna i wsp., którzy zastosowali kompleksowanie miedzi (II) z L-histydyną do rozdzielania dansylowych pochodnych aminokwasów [11]. Rozdział enancjomerów metodą LEE oparty jest na tworzeniu wieloskładnikowego kompleksu chelatowego, składającego się z jonu centralnego (Cu^{2+} , Zn^{2+}) i przynajmniej dwóch chiralnych ligandów dwufunkcyjnych [12]. Stężenie chelatora i jonu centralnego musi być w odpowiednim stosunku. Wykorzystali to Horimai i wsp. do rozdzielania nowych chinolonów [13]. Optymalizowano ilości zarówno jonów Zn (II), γ -CD, jak i aromatycznego aminokwasu.

Davankov przeprowadził przegląd piśmiennictwa z zakresu LEE, od lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku do 2003 roku, jak również opisał zastosowanie enancjoselektywnej wymiany ligandów w technikach elektromigracyjnych [14].

Elektrokinetyczna chromatografia powinowactwa

W elektrokinetycznej chromatografii powinowactwa (ang. *affinity capillary electrokinetic*

chromatography, AEKC), jako selektory chiralne stosuje się makrocząsteczki takie jak białka. Ten rodzaj rozdzielania klasyfikowany jest jako gałąź elektrokinezy chromatografii, ponieważ makrocząsteczki często posiadają ładunek elektryczny oraz własną ruchliwość elektroforetyczną. Wypadkowy ładunek elektryczny cząsteczki białka jest uzależniony od wartości pH elektrolitu podstawowego i można znaleźć taką jej wartość, przy której wypadkowy ładunek równy jest zeru, jest to tzw. punkt izoelektryczny (pI). W pH powyżej pI białko jest naładowane ujemnie, a w pH poniżej punktu pI posiada ładunek dodatni [15]. Elektrokinezy rozdzielanie enancjomerów z użyciem białek, jako selektorów chiralnych, może zostać przeprowadzony na dwa sposoby: w pierwszym białko jest immobilizowane na żelu krzemionkowym (ang. *affinity capillary chromatography mode*), w drugim białko jest rozpuszczone bezpośrednio w elektrolicie podstawowym (ang. *affinity CE mode*) [16].

Białko ze względu na wielorakie możliwości oddziaływań wewnątrz cząsteczkowych ze związkiem chiralnym, posiada najszerszy zakres enancjoselektywności pomiędzy różnymi grupami selektorów chiralnych. Jednakże stosowanie makrocząsteczek jako selektorów chiralnych może powodować jeden z dwóch problemów, tj.: adsorpcje selektora chiralnego do ściany kapilary [17], bądź pochłanianie światła UV przez makrocząsteczki.

Powierzchniowe oddziaływania białek, bądź antybiotyków makrocyclicznych, mają charakter hydrofobowy i elektrostatyczny. Grupy silanolowe obecne na powierzchni ścianek kapilar kwarcowych działają jak słabe wymiennicze kationów, które wchodzi w reakcje z niektórymi białkami powodując ich denaturację (deaktywację). Dodatkowo adsorpcja selektora chiralnego do ściany kapilary zmienia przepływ elektroosmotyczny, co wpływa na odtwarzalność i sprawność rozdzielczą układu [18]. Aby rozwiązać ten problem ścianka kapilary musi być modyfikowana, w celu wyeliminowania interakcji pomiędzy selektorem chiralnym a powierzchnią kapilary. Istnieją trzy techniki modyfikowania powierzchni kapilary: pierwszy to dynamiczne modyfikowanie ścianek kapilary poprzez dodatek odpowiednich jonów amin organicznych do BGE [19], kolejne to adsorpcja polimerów (np. polietylenoimina) do ścianek kapilary [20] oraz kowalencyjna derywatywacja grup silanolowych występujących na powierzchni ścianek kapilar kwarcowych.

Makrocząsteczki mogą również powodować pochłanianie promieniowania ultrafioletowego (UV), powodując wystąpienie niestabilnej linii bazowej i wysoką absorbcję tła, co stanowi ograniczenie dla osiągnięcia dobrej czułości metody. Aby ominąć ten problem zastosowano specjalną technikę z częściowo wypełnioną kapilarą (ang. *partial-filling technique*, PFT) [17]. Została ona wprowadzona przez Valtechevą i wsp. [21], a następnie zmodyfikowana przez Tanakę

i Terabego [22]. Polega ona na tym, że białko pełniące rolę selektora chiralnego nie przechodzi przez celkę detektora – „okienko”, a tym samym nie powoduje spadku czułości metody. Tanaka i Terabe [22] zastosowali powlekaną liniowym poliakrylamidem kapilarę w celu zahamowania przepływu elektroosmotycznego i zredukowania adsorpcji białka do ścianek kapilary. Po przemyciu kapilary wodą i roztworem elektrolitu podstawowego (bez dodatku selektora chiralnego) wypełniono kapilarę buforem rozdzielającym (zawierającym białko, jako selektor chiralny), stosując ciśnienie 1 p.s.i. przez 190 s, co spowodowało wypełnienie kolumny na długości około 27 cm z pominięciem „okienka” (długość kapilary do „okienka” w tym przypadku wynosiła 31,5 cm). Następnie wprowadzono próbkę i przyłożono napięcie. Stosowano bufor rozdzielający o różnej wartości pH (4,0–7,0), tak, że anality o charakterze zasadowym obdarzone były ładunkiem dodatnim, a białko (pI około 4,0) posiadając niewielki ładunek dodatni migrowało w przeciwnym kierunku do analitu, co spowodowało, że bufor rozdzielający porusza się dala od detektora i nie przeszkadzał w osiągnięciu dobrej czułości metody. Ward i wsp. zastosowali wankomycynę, jako selektor chiralny, korzystając z techniki PFT w procesie przeciwprądowym [23]. W technice PFT zastosowano różne selektory chiralne: tert-butylokarbamioochininę [24], analogi awidyny, etery koronowe [25], żółtko jaja przepiórczego, białka wiążące ryboflawinę oraz metylo- β -CD, czy też ludzką albuminę surowicy [26].

Elektrochromatografia kapilarna

Elektrochromatografia kapilarna jest techniką hybrydową, łączącą metody wysokosprawnej mikrokolumnowej chromatografii cieczowej i elektroforezy kapilarnej [27]. W większości przypadków CEC przeprowadzana jest w kapilarach wypełnionych porowatymi makrocząsteczkami (około 1 μ m) z użyciem wysokiego napięcia do generowania przepływu elektroosmotycznego. Przepływ ten zależy od natężenia pola elektrycznego, składu fazy ruchomej, siły jonowej, pH buforu oraz od rodzaju wypełnienia kolumnowego. Retencja składników mieszaniny zależy od ich oddziaływania z powierzchnią cząsteczek fazy stacjonarnej, a w przypadku składników obdarzonych ładunkiem elektrycznym zależy także od ich ruchliwości elektroforetycznej. CEC łączy zalety HPLC i CE. Uzyskanie wysokiej sprawności kapilary związane jest z płaskim profilem przepływu, który jest charakterystyczny dla CE. Co więcej, konsekwencją braku

Najbardziej interesującymi w chiralnej MEKC są polimerowe środki powierzchniowo czynne. Otrzymywane są one poprzez polimeryzację kowalencyjnie związanych małych cząsteczek surfaktantów, tworząc w ten sposób pojedynczą cząsteczkę, nazwaną micelą cząsteczkową. Takie micelle są stabilniejsze i bardziej sztywne od konwencjonalnych miceli.

Elektrochromatografia kapilarna jest techniką hybrydową, łączącą metody wysokosprawnej mikrokolumnowej chromatografii cieczowej i elektroforezy kapilarnej. W większości przypadków CEC przeprowadzana jest w kapilarach wypchniętych porowatymi makrocząsteczkami (około 1 μm) z użyciem wysokiego napięcia do generowania przepływu elektroosmotycznego. Przepływ ten zależy od natężenia pola elektrycznego, składu fazy ruchomej, siły jonowej, pH buforu oraz od rodzaju wypełnienia kolumnowego. Retencja składników mieszaniny zależy od ich oddziaływania z powierzchnią cząsteczek fazy stacjonarnej, a w przypadku składników obdarzonych ładunkiem elektrycznym zależy także od ich ruchliwości elektroforetycznej.

przepływu hydraulicznego jest brak wysokich ciśnień, co umożliwia zastosowanie wypełnień o małej wielkości, pozwalając w CEC na uzyskanie większej liczby pól teoretycznych. Dzięki stosowaniu modyfikatorów organicznych w fazie ruchomej, generowany jest niższy prąd bieżący, co umożliwia zastosowanie kapilar o większych rozmiarach wewnętrznych (100 μm). Zwiększa to czułość metody, obniżając granicę wykrywalności (ang. *limit of detection*, LOD).

W chiralnej CEC można zastosować selektory chiralne obecne w fazie ruchomej albo w stacjonarnej: kolumny o przekroju otwartym (ang. *open tubular*) CEC, konwencjonalnie upakowane kolumny oraz kolumny monolityczne. Zastosowanie złóż monolitycznych w CEC było rezultatem prac Hjertena i wsp. nad preparatyką usieciowanych w wysokim stopniu polimerów akryloamidowych, jako mediów separacyjnych [28]. Duże osiągnięcia w dziedzinie preparatyki kolumn monolitycznych zanotował zespół Buszewskiego [29, 30].

Chiralna CEC została wprowadzona przez Mayera i Schuriga [31]. Postępy w chiralnej CEC zostały zebrane w pracach, Lämmerhofera i wsp. [32], Wištuba i Schurida [33], Gübitza i Schmidta [34] oraz Malinowskiej i wsp. [35].

Antybiotyki makrocycliczne jako selektory chiralne oraz związki optycznie czynne

Antybiotyki stosowane w rozdzielaczach chiralnych obejmują ansamycyny, glikopeptydy, polipeptydy oraz niebędące antybiotykami makrocyclicznymi, aminoglikozydy [36, 37]. Najwięcej rozdzielaczy chiralnych przeprowadzono z glikopeptydami: wankomycyną, teikoplaniną, rystocetyną i awoparycyną [38]. Antybiotyki makrocycliczne posiadają wiele charakterystycznych właściwości fizykochemicznych [37], pozwalając im na selektywne oddziaływanie z chiralnym analitem, tj. wiele centrów stereogenicznych, różnorodność grup funkcyjnych oraz trzy albo cztery wnęki chiralne. Dzięki temu możliwych jest wiele interakcji z chiralnym analitem, poprzez wytworzenie wiązań wodorowych, oddziaływań π - π , dipol-dipol, hydrofobowych, jak również efektów sterycznych. Antybiotyki makrocycliczne ze względu na wysoką absorpcję w UV, podobnie jak białka wymagają zastosowania techniki PFT albo pośredniej detekcji [39]. Makromolekuły mogą również

ulegać adsorpcji na wewnętrznych ściankach kapilary, dlatego wymagana jest modyfikacja powierzchni kapilary w celu poprawy powtarzalności oraz sprawności rozdzielczej układu.

Ansamycyny, ryfamycyna B i ryfamycyna SV posiadają charakterystyczną strukturę ansa, silnie absorbują w UV/VIS ze względu na obecność pierścienia naftohydrochinonu – maksima absorpcji wynoszą odpowiednio około 220, 304, 425 nm, minima 275, 350 nm [40]. Ze względu na silną absorpcję i stosunkowo wysokie stężenia (20–25 mM) potrzebne do uzyskania odpowiedniej rozdzielczości, korzysta się z metody pośredniej detekcji. Ansamycyny potrzebują dodatku około 10–40% modyfikatora organicznego w celu poprawy rozdzielczości enancjomerów [41], bez dodatku modyfikatorów nie obserwowano rozdzielczości. Izopropanol okazał się najbardziej efektywnym modyfikatorem dla ansamycyn. Modyfikatory organiczne najprawdopodobniej przerywają tworzenie samoasocjacyjnych agregatów i poprawiają rozdzielczość enancjomerów [39].

Glikopeptydy, awoparycyna, rystocetyna A i teikoplanina nie są czystymi związkami, ale funkcjonują jako mieszaniny znanych składników. Pomiędzy nimi teikoplanina jest wyjątkowa, ze względu na obecność acylowego – hydrofobowego łańcucha bocznego przyłączonego do grupy 2-amino-2-deoksy- β -glukopyranozy. Dzięki temu ugrupowaniu teikoplanina jest związkiem powierzchniowo czynnym, zdolnym do agregacji i tworzenia miceli [42]. Podobnie jak ansamycyny glikopeptydy silnie absorbują w UV – w kwaśnych roztworach absorbują silnie poniżej 250 nm i wykazują niewielkie minimum w okolicach 260 nm, dlatego większość rozdzielaczy jest możliwa pracując blisko absorpcyjnego minimum (260 nm) [42]. Glikopeptydy efektywnie rozdzielają anality w stężeniach pomiędzy 1–5 mM.

Wankomycyna i teikoplanina są skutecznymi selektorami dla kwaśnych analitów, podczas gdy ryfamycyna dla enancjomerów o charakterze zasadowym. Ostatnio Ghassempour i wsp. zastosowali produkty degradacji samej wankomycyny, jako selektory chiralne do rozdzielaczy związków racemicznych [43]. Prokhorowa i wsp. zastosowali nowy selektor – eremomycynę, do elektroforetycznego rozdzielacza niesterydowych leków przeciwwzapalnych (NLPZ) z grupy profenów [44]. Badano stabilność roztworów, wpływ wartości pH, składu, stężenia buforu i selektora chiralnego, jak również modyfikatora organicznego na rozdzielczość NLPZ.

Antybiotyki aminoglikozydowe posiadają niską masę cząsteczkową i bardzo niską absorpcję w UV spowodowaną brakiem aromatycznego pierścienia w swojej strukturze. Wśród amino glikozydów, jako selektory chiralne stosowane są: kanamycyna, streptomycyna i fradiomycetyna [37].

Antybiotyki makrocycliczne, jako związki posiadające wiele centrów stereogenicznych, wykorzystywane

Tabela 1. Zestawienie odmian chiralnej CE w analizie chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych

Klasa/ substancja aktywna	Rodzaj CE	Warunki rozdzielania	Detekcja	LOD
β -laktamy/ cefadroksyl	CEC [45]	28,5 mM octanu sodu + 0,95% (v/v) kwasu octowego, 19 mM β -CD, 5% (v/v) izopropanolu w formamidzie (pH 7,0) kolumna monolityczna – 60 cm x 100 μ m i.d.; warunki – 25°C, 12 kV	UV- 254 nm	-
Fluorochinolony/ ofloksacyna	CD-EKC [46]	0,35 mM SO_3 - β -CD + 50 mM bufor fosforanowy (pH 2,5) kapilarna 35 cm x 50 μ m; warunki – 15°C	UV- 291 nm	2 μ g/ml
Fluorochinolony/ ofloksacyna, DV-7751,DU-6859	LEE [13]	(10–20 mM) γ -CD-10 mM Zn (II)-10 mM D-Phe + 10 mM bufor octanowy (pH 6,5) kapilarna 75 cm x 50 μ m; 25°C; warunki – 10 kV	UV- 300 nm, 295 nm	-
Fluorochinolony/ ofloksacyna,	AEKC [47]	Albuminy surowicy kapilarna niepowlekania: 75 cm x 50 μ m; warunki – 25°C, 10 kV	UV- 300 nm, 295 nm	-
Fluorochinolony/ gatyfloksacyna	CD-CZE [48]	40 mM HP- β -CD + 70 mM bufor fosforanowy (pH 3,9) kapilarna 35 cm x 50 μ m; warunki – 10 kV; 20°C	UV- 254 nm	-
Fluorochinolony/ gemifloksacyna	Micro-chip CE [49]	50 μ M 18C6H ₄ + 50 mM Bis-Tris/CA (pH 4,0); warunki – 3,0 kV	LIF- 405 nm	-
Antracykliny/ doksorubicyna	CD-MEKC [50]	20 mM γ -CD + 50 mM SDS + 50 mM bufor boranowy (pH 9,3) kapilarna 37,5 cm x 50 μ m; warunki – 15 kV	LIF; 488 nm	pmole
Oksazolidynony/ PHA-549184	CD- MEKC [51]	5% HS- γ -CD (m/v) + 3% Brij 35 (m/v) + 18,8 mM fosforanu litu (pH 2,5) kapilarna 39 cm x 50 μ m; warunki – 25 kV	UV- 254 nm	1,5 μ g/ml
Oksazolidynony/ linezolid	CD-EKC [52]	27,5 mM HDAS- β -CD + bufor boranowy (pH 9,0) kapilarna: 60 cm x 75 μ m; warunki – 15 kV, 15°C	UV- 254 nm	1,0 μ g/ml

Stosowane skróty: SO_3 - β -CD – siarczanowa- β -CD, D-Phe – D-feniloalanina, Bis-Tris – Bis(2-hydroksy-etylo)aminotris(hydroksymetylo)metan, CA – kwas cytrynowy, SDS – dodecylosiarczan sodu, HS- γ -CD – wysoce podstawiona siarczanowa- β -CD, HDAS- β -CD – heptakis-(2,3-diacetylo-6-sulfato)- β -cyklodekstryna, CEC – elektrochromatografia kapilarna, CD-EKC – elektrokinetyczna chromatografia z CD, jako selektorem chiralnym, LEE – elektroforeza z wymianą ligandów, AEKC – elektrokinetyczna chromatografia powinowactwa, CD-MEKC – micelarna chromatografia elektrokinetyczna zmodyfikowana poprzez dodatek CD, LIF – fluorescencja wzbudzona laserowo, LOD – granica wykrywalności

są jako selektory chiralne, ale również same podlegają analizie chiralnej. Metody analizy izomerów optycznych znajdują zastosowanie do rozdzielania antybiotyków chiralnych, może nie tak często jak w innych grupach leków, ze względu na biotechnologiczny proces ich wytwarzania i otrzymywanie związków homochiralnych, jednakże wszędzie tam, gdzie produkt jest wynikiem syntezy chemicznej i chemioterapeutyk przeciwbakteryjny posiada centrum asymetrii właściwe jest jej zastosowanie. W tabeli 1 zestawiono chemioterapeutyki przeciwbakteryjne, które zostały rozdzielone metodą chiralnej elektroforezy kapilarnej.

Podsumowanie

Elektroforeza kapilarna w badaniach związków optycznie czynnych znalazła zastosowanie w analizie jakościowej, zwłaszcza do określenia czystości enancjomerycznej. Dzięki wprowadzeniu przez Terabego modyfikacji, polegającej na zastosowaniu naładowanych pochodnych CD jako selektorów chiralnych, obok cząsteczek obdarzonych ładunkiem, możliwa stała się również analiza cząsteczek elektrycznie obojętnych. Ogromna ilość różnorodnych selektorów chiralnych, jak również odmian CE, sprawia że większość chiralnych związków może być rozdzielanych za pomocą chiralnej CE.

Liczba syntetyzowanych selektorów chiralnych ciągle wzrasta, dając użytkownikom nie tylko większą możliwość wyboru, ale również lepszy elektroforetyczny rozdział enancjomerów, bardziej powtarzalne rezultaty, wyższą rozpuszczalność w solventach oraz kompatybilność zwłaszcza z detektorem masowym (ang. *mass spectrometry*, MS). Osiągnięcia te pomagają wzmocnić zalety i ominąć wady chiralnej CE. Połączenie chiralnej CE z detekcją promieniowania fluorescencyjnego, wzbudzonego laserowo (LIF) albo MS, uważana jest jako próba zwiększenia czułości metody.

Warte zaznaczenia są wysiłki mające na celu wyjaśnienie mechanizmów rozpoznawania, łącznie z interpretacją zależności chiralnej rozdzielczości od oddziaływań wiążących i sterycznego dopasowania. Znalezienie odpowiedzi na ciągle otwarte pytania dotyczące chiralnego rozpoznawania pozwolą na systematyczny wybór selektora chiralnego, jego stężenia oraz wyznaczenie pozostałych czynników wpływających na rozdział.

Biorąc pod uwagę niezaprzeczalne zalety CE, tj. wysoka sprawność, duża łatwość w odniesieniu do optymalizacji enancjoseparacji, możliwość szybkiej zmiany warunków rozdzielania oraz typu i stężenia selektora chiralnego można przypuszczać, że rola chiralnej CE będzie nadal wzrastać.

Otrzymano: 2009.06.26 · Zaakceptowano: 2009.07.27

Piśmiennictwo

1. Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A., Ando T.: Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal. Chem.* 1984, 56: 111–113.
2. El Rassi Z.: Chiral glycosidic surfactants for enantiomeric separation in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 2000, 875: 207–233.
3. Mechref Y., El Rassi Z.: Micellar electrokinetic capillary chromatography with *in-situ* charged micelles VI. Evaluation of novel chiral micelles consisting of steroidal-glycoside surfactant-borate complexes. *J. Chromatogr. A.* 1996, 724: 285–296.
4. Otsuka K., Terabe S.: Enantiomer separation of drugs by micellar electrokinetic chromatography using chiral surfactants. *J. Chromatogr. A.* 2000, 875: 163–178.
5. Mohanty A., Dey J.: Vesicles as pseudostationary phase for enantiomer separation by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 2005, 1070: 185–192.
6. Mohanty A., Dey J.: Enantioselectivity of vesicle-forming chiral surfactants in capillary electrophoresis. Role of the surfactant head-group structure. *J. Chromatogr. A.* 2006, 1128: 259–266.
7. Mohanty A., Dey J.: Effect of hydrophobic chain length of the chiral surfactant on enantiomeric separations by electrokinetic chromatography: Comparison between micellar and vesicular pseudo-stationary phases. *Talanta.* 2007, 71: 1211–1218.
8. Palmer C.P.: Polymeric and polymer supported pseudostationary phases in micellar electrokinetic chromatography: performance and selectivity. *Electrophoresis.* 2000, 21: 4054–4072.
9. Amini A.: Recent developments in chiral capillary electrophoresis and applications of this technique to pharmaceutical and biomedical analysis. *Electrophoresis.* 2001, 22: 3107–3130.
10. Palmer C.P., McCarney J.P.: Recent progress in the use of soluble ionic polymers as pseudostationary phases for electrokinetic chromatography. *Electrophoresis.* 2004, 25: 4086–4094.
11. Gassmann E., Kuo J.E., Zare R.N.: Electrokinetic separation of chiral compounds. *Science.* 1985, 230: 813–815.
12. Schmid M.G., Grobuschek N., Lecnik O., Gübitz G.: Chiral ligand-exchange capillary electrophoresis. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2001, 48: 143–154.
13. Horimai T., Ohara M., Ichinose M.: Optical resolution of new quinolone drugs by capillary electrophoresis with ligand-exchange and host-guest interactions. *J. Chromatogr. A.* 1997, 760: 235–244.
14. Davankov V.A.: Enantioselective ligand exchange in modern separation techniques. *J. Chromatogr. A.* 2003, 1000: 891–915.
15. Amini A., Pettersson C.: Enantioresolution of disopyramide by capillary affinity electrokinetic chromatography with human α_1 -acid glycoprotein (AGP) as chiral selector applying a partial filling technique. *Electrophoresis.* 1997, 18: 950–957.
16. Haginaka J.: Enantiomer separation of drugs by capillary electrophoresis using proteins as chiral selectors. *J. Chromatogr. A.* 2000, 875: 235–254.
17. Castelletti L., Verzola B., Gelfi C., Stoyanov A., Righetti P.G.: Quantitative study on the adsorption of proteins to the bare silica wall in capillary electrophoresis III: Effects of adsorbed surfactants on quenching the interaction. *J. Chromatogr. A.* 2000, 894: 281–289.
18. Chiari M., Cretich M., Damini F., Ceriotti L., Consonni R.: New adsorbed coating for capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 2000, 21: 909–916.
19. Wang F., Khaledi M.G.: Chiral separations by nonaqueous capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 1996, 68: 3460–3467.
20. Chankvetadze B., Schulte G., Blaschke G.: Selected applications of capillaries with dynamic or permanent anodal electroosmotic flow in chiral separations by capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997, 5: 1577–1584.
21. Valtcheva L., Mohammad J., Pettersson G., Hjerten S.: Chiral separation of β -blockers by high-performance capillary electrophoresis based on non-immobilized cellulase as enantioselective protein. *J. Chromatogr.* 1993, 638: 263–267.
22. Tanaka Y., Terabe S.: Partial separation zone technique for the separation of enantiomers by affinity electrokinetic chromatography with proteins as chiral pseudo-stationary phases. *J. Chromatogr. A.* 1995, 694: 277–84.
23. Ward T.J., Dann I.C., Brown A.P.: Separation of enantiomers using vancomycin in a countercurrent process by suppression of electroosmosis. *Chirality.* 1996, 8: 77–83.
24. Lämmerhofer M., Zarbl E., Linder W.: tert-Butylcarbamoylquinine as chiral ion-pair agent in non-aqueous enantioselective capillary electrophoresis applying the partial filling technique. *J. Chromatogr. A.* 2000, 892: 509–521.
25. Tanaka Y., Otsuka K., Terabe S.: Separation of enantiomers by capillary electrophoresis-mass spectrometry employing a partial filling technique with a chiral crown ether. *J. Chromatogr. A.* 2000, 875: 323–330.
26. Martínez-Gómez M.A., Sagrado S., Villanueva-Camanas R.M., Medina-Hernández M.J.: Enantioseparation of phenothiazines by affinity electrokinetic chromatography using human serum albumin as chiral selector. Application to enantiomeric quality control in pharmaceutical formulations. *Anal. Chim. Acta.* 2007, 582: 223–228.
27. Altria K.A.: Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A.* 1999, 856: 443–463.
28. Liao J.-L., Chen N., Ericson Ch., Hjerten S.: Preparation of continuous beds derivatized with one-step alkyl and sulfonate groups for capillary electrochromatography. *Anal. Chem.* 1996, 68: 3468–3472.
29. Kłodzińska E., Moravcova D., Jandera P., Buszewski B.: Monolithic continuous beds as a new generation of stationary phase for chromatographic and elektro-driven separations. *J. Chromatogr. A.* 2006, 1109: 51–59.
30. Buszewski B., Szumski M.: Sposób wytwarzania polimerowych złożeń, zwłaszcza kolumn kapilarnych, opis patentowy PL 198359 B1 <http://pubserv.uprp.pl/PublicationServer/Temp/qi6rbv12m7hvf8d-cu78bpd9i6/PL198359B1.pdf>
31. Mayer S., Schurig V.: Enantiomer separation by electrochromatography on capillaries coated with Chirasil-Dex. *J. High Resolut. Chromatogr.* 1992, 15: 129–131.
32. Preinerstorfer B., Lämmerhofer M.: Recent accomplishments in the field of enantiomer separation by CEC. *Electrophoresis.* 2007, 28: 2527–2565.
33. Wistuba D., Schurig V.: Enantiomer separation of chiral pharmaceuticals by capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A.* 2000, 875: 255–276.
34. Gübitz G., Schmid M.G.: Chiral separation by capillary electrochromatography. *Enantiomer.* 2000, 5: 5–11.
35. Malinowska I., Drozdowski M., Bojarski J.: Elektrochromatografia kapilarna: teoretyczne podstawy i zastosowania. *Wiadomości chemiczne.* 2005, 59: 771–789.
36. Bojarski J.: Antybiotyki jako elektroforetyczne i chromatograficzne selektory chiralne. *Wiadomości chemiczne.* 1999, 53: 235–247.
37. Ward T.J., Farris III A.B.: Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review. *J. Chromatogr. A.* 2001, 906: 73–89.
38. Desiderio C., Fanali S.: Chiral analysis by capillary electrophoresis using antibiotics as chiral selector. *J. Chromatogr. A.* 1998, 807: 37–56.
39. Armstrong D.W., Nair U.B.: Capillary electrophoretic enantioseparations using macrocyclic antibiotics as chiral selectors. *Electrophoresis.* 1997, 18: 2331–2342.
40. Ward T.J., Oswald T.M.: enantioselectivity in capillary electrophoresis using macrocyclic antibiotics. *J. Chromatogr. A.* 1997, 792: 309–325.
41. Armstrong D.W., Rundlett K., Reid I.G.L.: Use of a macrocyclic antibiotic, rifamycin B, and indirect detection for the resolution of racemic amino alcohols by CE. *Anal. Chem.* 1994, 66: 1690–1695.
42. Gasper M.P., Berthod A., Nair U.B., Armstrong D.W.: Comparison and modeling study of vancomycin, ristocetin A, and teicoplanin for CE enantioseparations. *Anal. Chem.* 1996, 68: 2501–2514.
43. Ghassempour A., Aboul-Enein H.Y.: Vancomycin degradation products as potential chiral selectors in enantiomeric separation of racemic compounds. *J. Chromatogr. A.* 2008, 1191: 182–187.
44. Prokhorova A.F., Shapovalova E.N., Shpak A.V., Staroverov S.M., Shpigun O.A.: Enantiorecognition of profens by capillary electrophoresis using a novel chiral selector eremomycin. *J. Chromatogr. A.* 2009, 1216: 3674–3677.
45. Liu H., Yu A., Liu F., Soi Y., Han L., Chen Y.: Chiral separation of cefadroxil by capillary electrochromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41: 1376–1379.
46. Boer T.D., Mol R., Zeeuw R.A.D., Jong G.J.D., Ensing K.: Enantioseparation of ofloxacin in urine by capillary electrokinetic chromatography using charged cyclodextrin as chiral selectors and assessment of enantioconversion. *Electrophoresis.* 2001, 22: 1413–1418.
47. Arai T., Nimura N., Kinoshita T.: Investigation of enantioselective ofloxacin-albumin binding and displacement interactions using capillary affinity zone electrophoresis. *Biomed. Chromatogr.* 1995, 9: 68–74.
48. Zhou S., Ouyang J., Baeyens W.R.G., Zhao H., Yang Y.: Chiral separation of four fluoroquinolone compounds using capillary electrophoresis with hydroxypropyl- β -cyclodextrin as chiral selector. *J. Chromatogr. A.* 2006, 1130: 296–301.
49. Cho S.I., Shim J., Kim M.-S., Kim Y.-K., Chung D.S.: On-line sample cleanup and Chiral separation of gemifloxacin in a urinary solution using chiral crown ether as a chiral selector in microchip electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 2004, 1055: 241–245.
50. Eder A.R., Chen J.S., Arriaga E.A.: Separation of doxorubicin by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic capillary chromatography. *Electrophoresis.* 2006, 27: 3263–3270.
51. Antczak A., Ramstad T., Johnson R.: A CD-MEK method utilizing a neutral surfactant for enantiomeric purity determination of an oxazolidinone drug candidate. *Chromatographia.* 2006, 64: 57–64.
52. Michalska K., Pajchel G., Tyski S.: Determination of enantiomeric impurity of linezolid by capillary electrophoresis using heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfato)- β -cyclodextrin. *J. Chromatogr. A.* 2008, 1180: 179–186.