

Az enantiomerszelektív kapilláris elektroforézis technika áttekintése

JUVANCZ Zoltán,^{a*} IVÁNYI Róbert^b és BODÁNE KENDROVICS Rita^a

^aÓbudai Egyetem RKK., Környezetmérnöki Int., Doberdó u. 6, 1034 Budapest,

^bCyclolab Kft. Illatos út 7, 1097 Budapest

1. Bevezetés

Az enantiomer szelektív analízisek mára alapvető követelménnyé váltak az iparban (gyógyszer, agrokémia, kozmetika, élelmiszer) és a környezetvédelemben.¹⁻⁷ Az enantiomer szelektív kapilláris elektroforézis (ChCE) technika rendkívüli előnyöket kínál az analitikai enantiomer elválasztásokban, ezért ezen a területen az utóbbi években gyors fejlődés történt. Ebben a témában már megjelent egy könyv,⁸ számos könyvrészlet és áttekintő közlemény.⁹⁻¹¹ Az Electrophoresis folyóirat két évente teljes különszámban foglalkozik az enantiomer-szelektív elválasztásokkal. Más kiadványok (pl. J. Chromatogr., Chromatographia) királis különszámait szintén bő terjedelemben foglalkoznak ezzel a témával.

Az elektroforézis folyamatai önmagukban nem elegendők az enantiomer párok elválasztására. Az elektroforézis körülményei között végrehajtott enantiomer elválasztásokban a többszörösen megismétlődő megoszlási folyamatok is mindig szerepet játszanak, ezért ezek bizonyos mértékig kromatográfiának is tekinthetők.^{8,12} Sok közlemény a pufferben oldott királis szelektort pseudo-állófázisnak nevezi, mert az enantiomerek vándorlási sebessége különböző szabad formában vagy diasztereomer asszociátumként. A kapilláris elektroforézis körülményei között végrehajtott királis elválasztások besorolása és nevezéktana ma még nem egységes. Ebben a közleményben az enantiomer-szelektív, kromatográfiával kombinált kapilláris elektroforézisre az ChCE rövidítést használjuk, hogy megkülönböztetést tegyünk a csak elektroforetikus folyamatokat használó kapilláris elektroforézistől (CZE) és a tényleges állófázist használó elektrokinetikus kromatográfiától (CEC).

A jelen közleményben a szerzők bemutatják a ChCE technika alaptörvényeit, a leggyakrabban alkalmazott szelektorait, fejlődési irányait és különleges megvalósítási formáit. A cikkben leírtakat számos esetben a szerzők saját tapasztalatai és eredményei is alátámasztják.

A cikk nem foglalkozik azokkal a királis elválasztásokkal, amelyeknél az állófázis makroszkopikusan elkülönül a mozgófázistól,¹³ azaz az elektrokinetikus kromatográfiával (CEC).

2. Elméleti alapok

A ChCE megoszlási folyamatai nem két fizikailag makroszkopikusan elkülönült fázis között zajlanak. A királis

szelektor oldott vagy micella formában található az elektrolyt pufferben.^{8,12}

A két enantiomer mozgékonyágának különbségét a következő egyenlettel lehet kifejezni:¹⁴

$$\Delta\mu = \frac{[c](\mu_f - \mu_c)(K_s - K_R)}{1 + [c](K_R + K_s) + (1 + K_R K_s)[c^2]} \quad (1)$$

a $\Delta\mu$ a két enantiomer mozgékonyágának különbsége; $[c]$ a királis szelektor koncentrációja; μ_f és μ_c a szabad és a kölcsönhatásban lévő enantiomerek mozgékonyága; K_s és K_R az S és az R enantiomerek egyensúlyi állandója a királis szelektorttal.

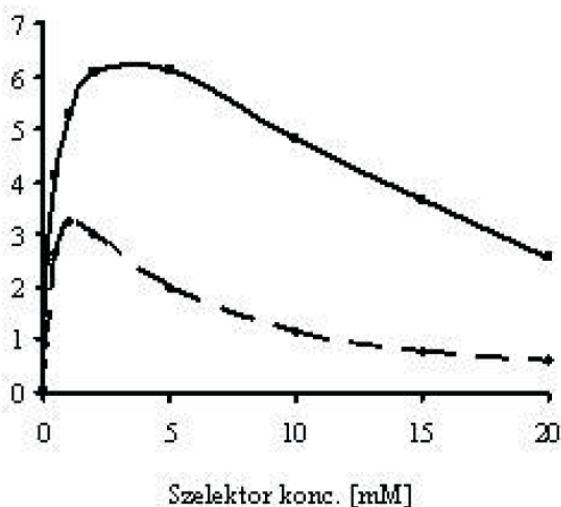
A fenti egyenlet feltételezi, hogy a két enantiomer mozgékonyága azonos állapotban (szabad vagy asszociált) megegyezik ($\mu_s = \mu_R$).

Az 1. egyenlet rávilágít arra, hogy az elválasztáshoz nem elegendő a két enantiomer egyensúlyi állandójának egymástól való eltérése ($K_s \neq K_R$). Az elválasztáshoz szükséges még az enantiomerek mozgékonyágának különbsége szabad és diasztereomer asszociátumuk formájában ($\mu_f \neq \mu_c$). Ez a feltétel azzal a következménnyel jár, hogy semleges királis szelektorttal nem lehet elválasztani semleges molekulákat ChCE-ben. Amennyiben az enantiomerek mind szabad, mind asszociált formában semlegesek, vándorlási sebességük megegyezik az elektroosmotikus áramlás (EOF) sebességével, azaz nincs elválasztás, függetlenül attól, hogy mekkora a különbség a két enantiomer egyensúlyi állandója között. Semleges enantiomereket semleges szelektorttal elválasztani csak segéd ionos adalék (pl. micellaképző) alkalmazásával lehet.¹⁵

Az 1. egyenlet továbbá rámutat arra is, hogy az enantiomerek elválasztása annál nagyobb, minél nagyobb különbséget mutat mozgékonyáguk szabad és asszociált állapotban. Ez a magyarázata annak, hogy a szelektorok és a minták ellentétes töltése előnyös az elválasztás szempontjából. Ilyen párosításban a szelektor kis koncentrációja is elegendő az eredményes elválasztáshoz.^{11,16-21} Végtelen nagyságú elválasztás érhető el ellentétes töltésű szelektorttal és mintával a szelektor bizonyos koncentrációjánál, ha az EOF elhanyagolható.¹⁶ A szelektorhoz erősebben kötődő enantiomer vándorlása megállítható, ha vándorlási sebessége egyenlő, de ellentétes irányú szabad és asszociált állapotban. Ekkor csak a gyengébben kötődő enantiomer mozdul el a minta töltésének megfelelő irányba.

*Tel.: 1666 5946, e-mail: juvancz.zoltan@rkk.uni-obuda.hu

Az 1. egyenletből az is kiolvasható, hogy a két izomer mozgékonyaságának különbsége maximumot mutat a szelektor koncentrációjának függvényében, ami számos esetben kísérletileg bizonyított^{14,21} (1. ábra).



1. Ábra. *Cis*-permetrinsav enantiomerek mozgékonyasági különbség adatai (\blacklozenge , $10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) és felbontási értékei (\blacksquare) a 6-monodezoxi-6-mono(1-metil-2-hidroxi)etilamino-ciklodextrin szelektor koncentrációjának függvényében. Körülmények: 50/58,5 cm x 0,050 mm kvarc kapilláris; 50 mM foszfát puffer; pH 6,0; feszültség, 30 kV; hőm., 25°C; detektor, 214 nm.

A fenti kísérleti körülmények között a *cis*-permetrinsav enantiomerek mozgékonyasági különbségeinek maximuma $3,24 \times 10^{-5}\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ érték, amihez 1 mM 6-monodezoxi-6-mono(1-metil-2-hidroxi)etilamino-ciklodextrin szelektor szükséges. A felbontási értékek maximuma 6,13 amit 5 mM szelektorral lehet elérni. Az 1. ábra jól példázta, hogy a $\Delta\mu$ és a felbontás (R_s) maximuma gyakran nem az azonos szelektor koncentrációnál található. Ezt a túltelítési és az elektrodiszperziós folyamatok okozzák.

Az 1. egyenlet mutatja, hogy a mobilitás különbség nagyságát nem az egyensúlyi állandók (K_s és K_r), azaz a kölcsönhatások abszolút nagysága határozza meg, hanem ezek aránya. A kölcsönhatások abszolút nagysága azt határozza meg, hogy a maximum milyen szelektor koncentrációnál észlelhető. Minél nagyobbak a kölcsönhatások, annál kisebb szelektor koncentráció szükséges a maximum eléréséhez. Ez is az oka annak, hogy a $\Delta\mu$ maximuma a szelektor kis koncentrációjánál jelentkezik a mintával ellentétes töltésű szelektorok esetén. Egy másik következmény, hogy az akirális adalékok megváltoztatják a szelektor optimális koncentrációját.⁸

A ChCE gyakorlatában több kifejezés is használatos a szelektivitás jellemzésére. A cikkben a szeparálás jellemzésére nem csak a $\Delta\mu$ és az elválasztás (R_s) értékeit alkalmazzuk, hanem az effektív szelektivitás (α_{eff}) kifejezést is. Az α_{eff} érték, mely a két enantiomer migrációs idejének hányadosa,⁸ ami fizikai értelemben nem azonos a kromatográfiában megszokott szelektivitás fogalommal, mert a migrációs időket több paraméter (pl. EOF) is befolyásolja.

3. A ChCE előnyei a királis analízisben

A ChCE a következő előnyöket kínálja a királis analízisben:

- Nagy hatékonyság
- Rövid analízis idő
- Alacsony analízis hőmérséklet
- Több enantiomer pár aránya is meghatározható egy analízis alatt
- Könnyű a „kis csúcs elöl” elvet megvalósítani, ami nagy enantiomer felesleg esetén fontos
- Poláris, ionos, nem-illékony minták analízisére kiváló módszer
- Csekély a módszer minta szükséglete
- Elenyésző vegyszerfelhasználás
- Nagy mennyiségű mátrix mellett is pontos meghatározások lehetségesek egyszerűsített minta-előkészítéssel
- A detektorok széles lineáris tartománnyal rendelkeznek
- Jól kapcsolható on-line módon a pozitív anyag-meghatározó tömegspektrométerhez (MS).

A nagy hatékonyságú elválasztások azzal az előnnyel is járnak, hogy már 0,1 kJ/M energia különbség ($\alpha = 1,01$) is elegendő az enantiomerek alapvonal-elválasztáshoz.²² A ChCE gyakorlatában megszokott rendkívül nagy hatékonyság elérését nem csak az áramlás U profilja teszi lehetővé, hanem ehhez a szelektor oldott állapota is nagyban hozzájárul, mivel így az állófázisban nincs anyagátadási ellenállás. Nincs szükség a minta keresztirányú diffúziójára a „mozgófázisban” sem ahhoz, hogy a szelektorral kölcsönhatás megtörténjen. Az utóbbira bizonyíték, hogy sokkal nagyobb hatékonyságú elválasztásokat lehet elérni fehérje és makrociklusos antibiotikumok felhasználása során a ChCE technikával, mint HPLC-s állófázissal. A cikk szerzői gyakran tapasztaltak 500 000 elméleti tányérszám feletti értékeket mindössze 50 cm hasznos kapilláris hosszon.²¹ Az így elért hatékonyság lehetővé tette az ibuprofén enantiomerek alapvonal elválasztását annak ellenére, hogy csak $\alpha_{\text{eff}}=1.009$ szelektivitási érték.¹⁹

A ChCE gyakorlata során tapasztalt rendkívül gyors analízisek szintén a háttér pufferben oldott szelektoroknak köszönhetőek. Az irodalom fél percnél rövidebb tökéletes elválasztásokról is beszámol.²³ Rendkívül gyors elemzések érhetőek el, ha az oszlopba a detektor oldalon injektálunk, mert ilyenkor az injektálás és detektálás távolsága csak 5-7 cm.^{24,25} Az elválasztások sebessége növelhető kisebb átmérőjű kapillárisok használatával, mivel ezek kisebb áramot és jobb hőelvezetést kínálnak.²⁶ Az alacsony vezetőképességű szerves pufferek szintén nagyobb feszültségek alkalmazását teszik lehetővé.⁸ További analízis sebességnövekedést eredményez a chip technológia bevezetése.²⁷

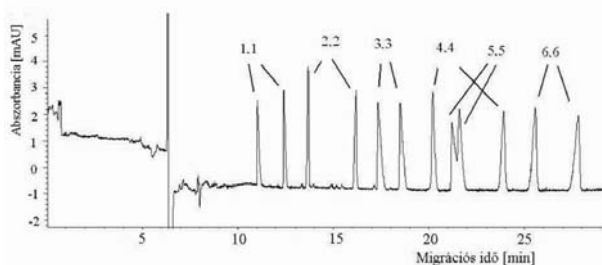
A ChCE alacsony analízis hőmérsékletei elősegítik az enantiomerek jó elválasztását. Két csúcs szelektivitási tényezője termodinamikailag a következő módon írható le:²²

$$\ln\alpha = \frac{-\Delta_{RS}(\Delta G)}{RT} = \frac{\Delta_{RS}(\Delta H)}{RT} - \frac{\Delta_{RS}(\Delta S)}{R} \quad (2)$$

ahol a $\Delta_{RS}(\Delta H)$, $\Delta_{RS}(\Delta S)$ és $\Delta_{RS}(\Delta G)$ sorra az enantiomer pár tagjai közötti entalpia, entrópia és szabadenergia

változások különbsége a két fázis közötti átmenet során. A 2. egyenletről látható, hogy az entalpia tag szerepe emelkedő hőmérséklettel exponenciálisan csökken. Ez összhangban van azzal a kromatográfiás tapasztalattal, hogy csökkenő elemzési hőmérséklettel a szelektivitási tényező exponenciálisan nő.

Az ChCE során az analízisek kedvezően alacsony hőmérsékleten (15-25 °C) végezhetőek a kapillárisok jó hűtőképesége és az intenzív hűtés miatt. A többszörösen töltött szelektorokkal is rendszerint 20 kV feszültség alkalmazható a hatékonyság és a szelektivitás romlása nélkül, azaz a Joule hő hőmérséklet emelő hatása elhanyagolható.¹⁸⁻²¹ Ezeket a szelektorokat kis koncentrációban alkalmazzák, mivel az erős kölcsönhatások miatt kis koncentráció értéknél van a $\Delta\mu$ maximuma. Természetesen alacsony vezetőképességű szerves pufferadalekok még magasabb feszültségek alkalmazását teszik lehetővé.⁸ A ChCE számos enantiomer pár elválasztását teszi lehetővé egy analízis alatt, ahogy ezt a 2. ábra is szemlélteti.¹⁹



2. Ábra. Hat piroxicam sztereoizomerének szimultán elválasztása. Körülmények: 50/58,5 cm x 0,050 mm fused-silica kapilláris; szelektor, 15 mM heptakis(2,3-di-O-metil)-hexakis(6-O-metil)-6-monoamino-6-monodezoxi- β -ciklodextrin; puffer, 40 mM bórsav, ecetsav és foszforsav (1:2:2); pH, 6,5; feszültség, 30 kV; detektálás, 202 nm; hőm., 25°C. Jelölések: S(-)/R(+)-transz-deltametrisav (1), S(-)/R(+)-cisz-deltametrisav (2), S(-)/R(+)-transz-permetrisav (3), S(-)/R(+)-cisz-permetrisav (4), S(-)/R(+)-transz-krizantémsav (5), S(-)/R(+)-cisz-krizantémsav (6)¹⁹.

A 2. ábrán bemutatott szelektor koncentrációja kompromisszum eredménye. A *transz*-krizantémsav enantiomerjeinek alapvonal elválasztása is lehetséges 17,5 mM szelektorral, de ekkor az analízis idő meghaladja az egy órát.

A több enantiomer egymás melletti analízise a gyártási ellenőrzések^{18,19,28} során és a metabolizmus kutatásban is rendkívül hasznos, mivel nem csak az anyavegyületek enantiomer arányára ad választ, hanem a metabolitok és a melléktermékek arányára is.^{29,30}

A ChCE nagy hatékonysága és az alkalmazható szelektorok széles köre miatt kitűnő lehetőséget nyújt a nagy enantiomerfelesleg pontos meghatározására. Emellett a technika az enantiomerek migrációs sorrendjének megváltoztatására is jóval több módszert kínál, mint más kromatográfiás eljárások.^{8,11} A kromatográfiában általános elv, hogy nagy enantiomer felesleg esetén (>99%) a minor csúcs elsőként elúciója vagy migrációja előnyös.^{22,26,31} A nagy mennyiségben jelenlévő izomer csúcsa ugyanis rendszerint "tailinges" (hátrafelé elnyúlt), amit túlerhelési, adszorpciós és áramlási egyenetlenségek okoznak. A nagy

csúcs tailingje teljesen elfedheti a második kis csúcsot, vagy területét meghamisíthatja. A migrációs sorrend megváltoztatása lehetőséget ad az enantiomerek arányának pontos megadására attól függetlenül, hogy melyik izomer van nagy feleslegben.

A migrációs sorrend megváltoztatására a következő paraméterek előjelváltásával van lehetőség: migrációk iránya, migrációs különbségek és az egyensúlyi állandók különbsége.⁸

Az EOF megszüntetése vagy megfordítása az eredetihez képest fordított migrációs sorrendet eredményezhet, de ebben az esetben az injektálás is ellentétes póluson történik.³² Ezt a kapilláris borításával, vagy kationos detergens alkalmazásával lehet elérni. Hasonló eredményre vezet, ha az EOF-nál nagyobb, ellentétes irányú, nyomás indukált áramlást alkalmazunk pufferben.³³ A háttérpuffer pH-jának megváltozása a királis felismerés cserélődése nélkül is eredményezheti a migrációs sorrend átfordulását.^{32,34} Ebben az esetben a minta vagy a szelektor töltésének változása módosítja ezek egymáshoz képesti mobilitását, és így az enantiomerek migrációs sorrendje is átfordulhat. Hasonló hatást válthat ki a nagy mozgékonyaságú, erős kölcsönhatással rendelkező szelektor koncentrációjának növelése.³⁵

A háttér puffer pH-jának megváltoztatása azonban a királis felismerés módosulását is eredményezheti, ami az enantiomerek vándorlási sorrendjének megfordulását okozza.³⁴ Az a szerkezet változás, ami a királis felismerést megváltoztatja, történhet akár a szelektorban akár a minta molekulákban. Hasonló eredményre vezethet, ha vizes közegű pufferről szervesre váltunk.

A szakirodalom a szelektorok megváltoztatásával elért enantiomerek vándorlási sorrendjének megfordulásáról számol be leggyakrabban.^{8,11,18,36-41} A legegyszerűbb eset, amikor a szelektor (pl. kámfoszulfonsav) mindkét enantiomerje rendelkezésre áll.⁴¹ A különböző szelektorok okozta migráció sorrend megfordulását nehéz elméleti alapon megjósolni, inkább a „próba szerencse” módszer vezet eredményre. Gyakran kis szerkezeti különbségek vezetnek az enantiomerek vándorlási sorrendjének megfordulásához. A ciklodextrin (CD) különböző mértékű szulfát szubsztitúciója is okozhatja az enantiomerek migrációs sorrendjének megfordulását.⁴³ A CD foszfátok eltérő gyűrűmérete megváltoztatja a metoprolol enantiomerek migrációs sorrendjét.¹⁸ A tocinidnél pedig az ionos szubsztitúciójú β -CD-k (foszfát, karboxil-metil) eredményeztek fordított migrációt a metilezettekhez képest.³⁸

A kromatográfiás módok változtatása is eredményezheti az enantiomerek sorrendjének változását. A változás alapja, hogy a pufferban oldott királis szelektor helyett (ChCE), valódi állófázisban (GC) történik a királis felismerés.¹⁹

A ChCE eljárás kitűnően alkalmazható poláris, ionos molekulák (pl. savak, aminok) nyomnyi mennyiségű analíziséhez. Az ilyen típusú enantiomerek a HPLC és GC analízise adszorpciójuk miatt problémás, ami sok esetben csak származékképzéssel küszöbölhető ki. Ennél a technikánál azonban puffer adalékokkal vagy a kapilláris borításával az adszorpció kiküszöbölhető.

Az alkalmazott eljárás mintaszükségele rendkívül csekély, nanoliter nagyságrendű. A szakirodalom beszámol egyetlen sejt vagy esőcsepp többszöri analíziséről. A chippek bevezetésével az analízisek mintaszükségele tovább csökkenthető.⁴²

A ChCE vegyszerhasználata a HPLC-hez képest elenyésző. Néhány 10 milliliter puffer elég egy egész napi munkához. A puffer szelektor tartalma is általában csak 1-50 mM. Ez a kis anyagigény lehetővé teszi a rendkívül drága szelektorok (pl. ionos ciklodextrinek, koronaéterek, antibiotikumok) használatát. Meg kell azonban jegyezni, hogy az analízisek alatt a pufferek összetétele és szintje megváltozik, ezért a puffereket rendszeresen cserélni (replanishment) kell.

A nagy felbontóképesség lehetővé teszi az enantiomerek vizsgálatát nagymennyiségű mátrix mellett.^{29,30,43,44} A technika egyik hatalmas előnye, hogy kevesebb minta-előkészítést igényel, mint a kromatográfiai technikák. A komponensek minta-előkészítés nélkül, közvetlenül is analizálhatók, mert minden egyes analízis után a feltapadt mátrix anyagok az oszlopról gyorsan kimoshatóak. Mosófolyadéknak akár mólos koncentrációjú savas vagy lúgos oldatot is lehet használni a rendszer károsodása nélkül.

Ezeknél az analíziseknél a komponensek területét az elválasztás miatt egymástól függetlenül mérjük, ami lehetőséget kínál akár 5 nagyságrendnyi különbség pontos meghatározására.^{26,45} A gyakran alkalmazott on-column detektálás elkerüli a csatlakozóknál keletkező csúcshéledést.

Számos királis szelektor (fehérjék, antibiotikumok, alkaloidok) nagy UV abszorbanciát mutat. Ezek az elektrolitban oldva zavarhatják a minták detektálását, aminek kiküszöbölésére vezeték be az ellenáramú technikát.^{46,47} Ebben az eljárásban az elválasztások ellentétes töltésű szelektorral és enantiomerrel hajthatók végre borított oszlopokon (EOF \approx 0). Az elemzés megkezdése előtt a szelektor oldatával részben megtöltik az oszlopot, majd ezt követően injektálják be a mintát. Az analízis folyamán az oszlop végei olyan elektrolittal töltött edényekbe érnek, amelyek nem tartalmazzák az UV-aktív, vagy a tömegspektrometriás mérést zavaró szelektort. Ebben az elrendezésben a szelektor vándorlási iránya az injektálási pont felé irányul, míg az enantiomereké ezzel ellentétes. Így elérhető, hogy a szelektort tartalmazó elektrolit már eltávozik a detektor ablakból mire a minta komponensei odaérnek. Természetesen a szeparáció úthossza kisebb, mint az injekciós pont és a detektor távolsága, de a felhasznált királis szelektorok nagy szelektivitása miatt a rövidebb elválasztási úthossz is elegendő. Kutatók beszámoltak arról, hogy néhány mm hosszúságú szelektort tartalmazó elektrolit is elég volt alapvonal-felbontáshoz.⁴⁷

A ChCE kis térfogatára miatt jól kapcsolható tömegspektrométerhez.^{8,48} A nagy molekulájú, több töltéssel rendelkező szelektorok zavaró hatását kiküszöböli az ellenáramú technika. Meg kell azonban jegyezni, hogy a CE/MS kapcsolások még nem számítanak rutin módszernek. A lézerral indukált fluoreszcens detektorok (LIF) használata előnyös kapilláris elektroforézisben a quenching hatást csökkentő kis oszlopátmérő miatt.^{8,49} A cirkuláris dikroizmus

spektrométer is alkalmazható on-line kapcsolásban.

4. A ChCE hátrányai a királis analízisben

Az eljárás számos előnye mellett néhány előnytelen tulajdonsággal is rendelkezik:

- Érzékenysége mérsékelt UV detektálással
- Az elektrodiszperzió kiküszöbölésére ügyelni kell a mintával ellentétesen, többször töltött szelektorok esetén
- A migrációs idővel normalizálni kell a csúcsok területét
- Migrációs időknél és a csúcsterületeknek viszonylag nagy a szórása.

A kis oszlopátmérő miatt az UV on-column detektálásnál az optikai úthossz kicsi, ezért a nyomelemzésekre a technika alapelrendezésben csak mérsékelt alkalmas. Buborék és Z cellák alkalmazása is csak kis mértékben javítja az érzékenységet, de a megnövekedett cellatér fogat miatt csökken a felbontás. Az injektálásnál történt különböző koncentrációs eljárások (pl. stacking, izotahorézis), azonban akár három nagyságrenddel is megnövelhetik az érzékenységet a hatékonyság romlása nélkül.²³

A ChCE gyakorlatában ellentétesen töltött szelektor és minta esetén az elektrodiszperzió drasztikusan leronthatja az elválasztás hatékonyságát. Ezt azonban ki lehet küszöbölni a háttér elektrolit és a minta vezetőképességének összehangolásával.⁵⁰

Koncentráció érzékeny detektálás esetén az elektroferogramok mennyiségi értékelésénél a csúcsok területét korrigálni kell a vándorlási idővel. Az elektroforézisben ugyanis a csúcsok nem azonos sebességgel haladnak el a detektor előtt, ezért a kisebb sebességű csúcsok nagyobb jelet adnak.³⁷

A ChCE gyakorlatában a beinjektált minta mennyisége, homogenitása, valamint a migrációs idő a kromatográfiában megszokotthoz képest jelentős szórást mutatnak, amit kompenzálni lehet injektálási standarddal. A migrációs időket és a csúcsterületeket normalizálni kell az injektálási standardra, így az elválasztások validálhatóvá válnak.³⁷

5. A ChCE gyakorlatában használt királis szelektorok

Az előző fejezet bemutatta, hogy a ChCE eljárás szelektor szükséglete rendkívül csekély és az ellenáramú technikával nagy UV abszorbanciájú, vagy MS kiértékelést zavaró szelektorokat is lehet alkalmazni. A fentiek miatt a ChCE a szelektorok sokkal szélesebb spektrumát használhatja, mint a HPLC vagy GC.

A királis szelektorok felosztása a következő:

- Ciklodextrinek (CD-k)
- Antibiotikumok
- Királis micellaképzők
- Egyéb szelektorok (pl. fehérjék, korona éterek, ionpárpépzők).

A ChCE az esetek több mint felében ciklodextrin királis szelektort használ. Ezt a CD-k széles szelektivitási

köre, stabilitásuk, aránylag olcsó árak és mérsékelt UV abszorpciójuk indokolja.^{8,11,31,51,52} A CD-k előnyei közül az sem elhanyagolható, hogy az apoláros anyagok oldódását nagyban elősegítik poláris, vizes pufferekben.^{15,51}

Ezeknek a szelektoroknak a nagy hatékonyságú technikákban (pl. ChCE, GC) van hangsúlyozott szerepük, mivel a ciklodextrinek általában alacsony szelektivitást mutatnak, továbbá rendkívül széles szelektivitási spektrummal rendelkeznek a következők miatt:

A CD molekulában lévő királis centrumok nem egyformák. Egy cukoregységen belül az aszimmetria centrumok kémiai környezete különböző (primer, szekunder glikozidos hidroxidok), még a natív CD-k esetében is. Egy CD alakja, főleg a származékoké nem szabályos kúp, hanem csavart, torzult alakzat, változó kötőhosszakkal és kötőszögekkel. Az aszimmetria centrumok elrendeződése nem ismétlődik cukoregységekenként, hanem egységenként más és más a gyűrű torzulása miatt. A fentiek értelmében a β -CD 35-fajta királis felismerési hellyel rendelkezik. A cukoregységek különbözősége adja a CD szelektorok szelektivitási spektrumának többletét a lineáris szaharidokhoz képest.

Egy CD molekula királis felismerési köre tovább szélesedik a szubsztituensek bevitelével. A szubsztituens csoportok újabb kölcsönhatási módokat kínálnak és a csoportok térigénye tovább torzítja a CD alakját. A többfajta funkció csoporttal helyettesített CD a szubsztituenstől függően más és más kölcsönhatással rendelkezik. Ráadásul a szubsztitúciós csoportokkal (pl. (*S*)-(2-hidroxi)propil) további királis centrumokat lehet egy CD molekulába juttatni.

A legtöbb származék, főleg a ChCE területén, statisztikusan szubsztituált termék. Ez azt jelenti, hogy ezek a származékok kémiaiag nem egységesek, hanem eltérő szubsztitúciós fokú és szubsztituens-elrendezésű vegyületek halmazai. A halmaz tagjai pedig különböznek egymástól királis felismerési tulajdonságaikban.^{39,51,53} Másrészt viszont a statisztikusan szubsztituált CD-származékok szelektivitása változhat a gyártótól és sarzstól függően is. Ez a bizonytalanság az utóbbi időben a szabályosan szubsztituált, egységes termékek (un. „single isomer”) bevezetését vonta maga után.^{19-21,54} Ezek azonban az enantiomerek szűkebb körével szemben mutatnak királis felismerést, mint a statisztikusan helyettesítettek.

Egy CD királis felismerő képességét tovább bővíti, hogy alakját meg tudja változtatni a kölcsönhatásoktól függően („induced-fit”). Az alakváltozás következtében a szelektorok olyan enantiomerekkel is királis felismerő kölcsönhatást tudnak kialakítani, amelyekkel eredeti alakjukban nem.

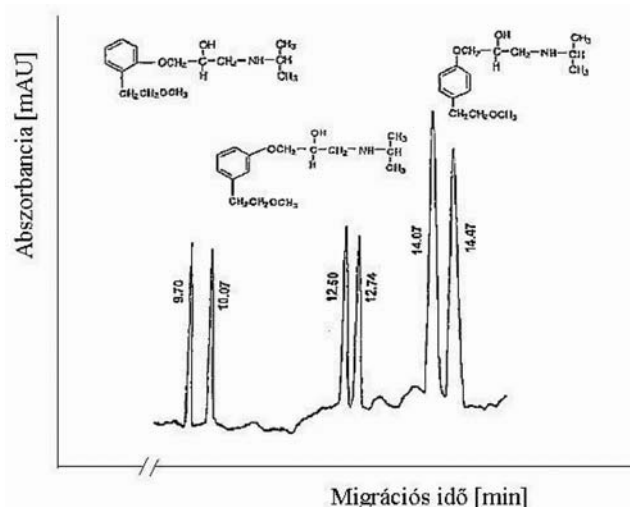
Kezdetben a ciklodextrinek közül a β -CD-t alkalmazták a ChCE gyakorlatában leginkább. A natív CD-k mérsékelt oldhatósága és korlátozott királis felismerési köre miatt használatuk ma már háttérbe szorult. Jelenleg inkább, mint szelektor kombináció alkotórészeként, összehasonlítási alapként, vagy nem vizes pufferek adalékaként alkalmazzák.⁵⁵

A metilezett ciklodextrinek királis felismerési köre szélesebb, oldhatóságuk és oldóképességük jobb, mint a natívaké.^{8,51-53}

A metilezett CD származékok közül egyesek statisztikusan szubsztituáltak, míg mások egységes termékek. Az utóbbi időben a nem-ionos CD-k közül ezeket alkalmazzák leggyakrabban.

Az (*S*)-(2-hidroxi)propil származékok szintén elterjedt nem-ionos királis szelektorok, de statisztikus szubsztitútságuk miatt használatuk kissé visszaszorult.^{15,32}

A szulfo-szubsztituált ciklodextrinek jelenleg a leggyakrabban használt ionos CD származékok.^{8,11,17,26,39,40,47} A szulfo-csoport kapcsolódhat közvetlenül (szulfát) vagy különböző hosszúságú alkiláncon keresztül (szulfon) a CD gyűrűhöz. Ezen származékok szelektivitása nagyban függ a szubsztitúció fokától és módjától. Érdemes megemlíteni, hogy az enantiomerek vándorlási sorrendjének megfordulását is megfigyelték a CD-szulfát szubsztitúciós fokától függően.³⁹ Az eredmények jobb reprodukálhatósága érdekében több fajta, egységes (single isomer), hét szulfát-csoporttal szubsztituált termék is megjelent a ChCE irodalmában.⁵⁴ A szulfo-szubsztituált CD származékok rendkívül nagy elválasztó képességgel rendelkező királis szelektorok. Gyakran 1 mM alatti koncentrációban alapvonal-elválasztást eredményeznek. Ilyen szelektor rövid, néhány milliméter hosszú sávja is elég lehet az elválasztáshoz.⁴⁷ Nagy vezetőképességük miatt ezeket a származékokat 10 mM fölötti koncentrációban ritkán alkalmazzák. A szulfo származékok használatakor szerves adalékok alkalmazása javasolt, továbbá a magasan szubsztituált termékeknel ügyelni kell az elektrodiszperzió kiküszöbölésére.⁵⁰



3. Ábra. A metoprolol és *ortho* és *meta* melléktermékeinek királis elválasztása. Körülmények: 30/35 cm x 0,050 mm fused-silica kapilláris; szelektor, 15 mM karboximetil- α -ciklodextrin; puffer, 100 mM foszfát; pH, 4,9; feszültség, 25 kV; detektálás, 214 nm; hőm., 15°C.⁵⁸

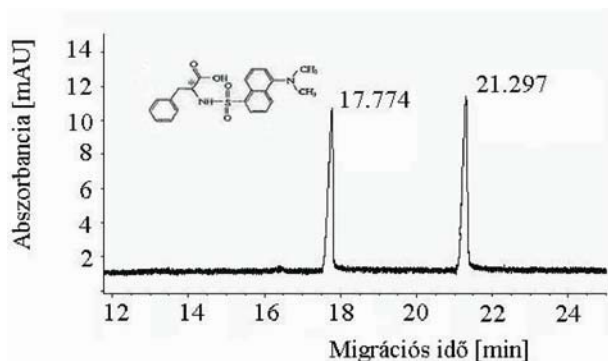
A karboxil-csoporttal szubsztituált CD származékok is gyakran használt ionizálható királis szelektorok.^{38,56-58} A karboxil származék vezetőképessége mérsékelt, ezért az elektrodiszperzió és a Joule féle hőképződés kisebb problémát jelent használatukkor. Ezek mind statisztikusan szubsztituált származékok, ezért szelektivitásuk nagyban függ a gyártótól és gyártási sarzstól. Ezek a szelektorok széles szelektivitási spektrummal rendelkeznek, ahogy ezt a 3. ábra is szemlélteti,⁵⁸ hogy a ciklodextrinek nem csak az enantiomerek elválasztására, hanem más izomerekére

is alkalmasak. A karboxi szubsztituált CD-k alacsony pH tartományban (2-3) semlegesek, ezért pH-tól függően többfajta királis felismerésük is lehet.

A ciklodextrin foszfátok egyre népszerűbb szelektorok, melyeket főleg bázikus mintákra alkalmaznak.^{18,42,61,62} Ezek is széles szelektivitási spektrummal rendelkező keverékek, melyek szelektivitása töltésük számának függvényében változhat.⁵⁷ Az erősebben kötődő enantiomerek esetén kisebb szelektorkoncentrációt vagy szerves adalékot érdemes alkalmazni a jobb elválasztás érdekében. Egyes enantiomerek a ciklodextrin foszfátok gyűrűméretétől függően változtatják migrációs sorrendjüket.^{18,58}

Számos, bázikus funkciós csoporttal statisztikusan szubsztituált ciklodextrin próbáltak savas enantiomerek királis elválasztására,^{8,35} de az áttörést a „single isomer” termékek jelentették.¹⁹⁻²¹ Az erősen bázikus ciklodextrinek az oszlop falához tapadva hatással lehetnek az EOF nagyságára, akár az irányát is megváltoztathatják.

Az egyik legsikeresebb vegyület a heptakis(2,3-di-O-metil)-hexakis(6-O-metil)-6-mono-amino-6-monodezoxi-ciklodextrin elválasztóképességét jól szemlélteti a 2. és 4. ábra.



4. Ábra. Phenilalanin danzil származékának királis elválasztása.

Körülmények: 50/58,5 cm x 0,050 mm fused-silica kapilláris; szelektor, 7 mM heptakis(2,3-di-O-metil)-hexakis(6-O-metil)-6-monoamino-6-monodezoxi- β -ciklodextrin; puffer, 40 mM bórsav, ecetsav és foszforsav (1:2:2); pH 5,0; feszültség, 20 kV; detektálás, 202 nm; hőm., 25°C.¹⁹

A szelektor 0-40 mM tartományában stabil, katódos irányul EOF-t eredményez a hatékonyság romlása nélkül. A szelektor nem csak savak, hanem semleges és bázikus molekulák királis elválasztására is alkalmas akár 30 kV feszültségen is. A szelektorral elérhető nagy hatékonyság demonstrálásának kedvéért a 4. ábra bemutatja egy fenilalanin danzil származékára elvégzett optimalizálás eredményét.¹⁹ A 4. ábra kiváló felbontást (R_s : 15,3) mutat, ami a nagy hatékonyságnak és szelektivitásnak köszönhető.

A hétszer aminált heptakis-(2,3,-dimetil-6-amino-6-dezoxi)- β -ciklodextrin szintén hatásos szelektor.⁵⁹ Ez erősen bázikus, emiatt már 1 mM-os oldatával anódos, fordított EOF mérhető. Az ágens nagy szelektivitást mutat a savas enantiomerekkel szemben, amit jól példáz, hogy 0,5 mM oldata ibuprofénra alapvonal elválasztást eredményezett.

Az izomer-tiszta 6-monodezoxi-6-mono(hidroxi)alkilamino-CD-k szisztematikus tanulmányozása kimutatta, hogy

az amino-CD szelektivitásával összehasonlítva az egy hidroxialkil szubsztituens az amin csoporton megnöveli a szelektivitást, de kettő már csökkenti.

Két CD szelektor kombinációja az egymástól független használatukhoz képest minőségi javulást és időnyereséget okozhat.⁶⁰ Általában egy ionos és egy semleges CD kombinációját alkalmazzák. Nem szükséges, hogy mindkét CD királis felismerést mutasson a vizsgált enantiomerekkel szemben.^{8,15} Ekkor a semleges CD az enantiomer szelektív, míg az ionos csak az EOF sebességétől eltérő vándorlásért felelős. Ciklodextrinekét más típusú szelektorral vagy micellaképzővel kombinálva is többször alkalmazták.

A makrociklikus antibiotikumok használata a királis ChCE legdinamikusabban fejlődő ága.^{23,61-63} Az ilyen szelektorok gyakran rendkívül nagy szelektivitásúak. Teicoplanin 1,2 mM-os oldatával például $R_s = 38$ értéket lehetett elérni. A makrociklikus antibiotikumok széles királis felismerési körrel rendelkeznek, mivel a molekulák számos aszimmetria centrumot (pl. vancomicin 18) és csavart gyűrűrendszert tartalmaznak. A molekulák többféle funkciós csoportja is tág teret enged a különféle kölcsönhatásokra. Szelektivitásukat és egyes tagjaik stabilitását nagyban befolyásolja a háttér puffer pH értéke. A rifamicin kivételével a makrociklusos antibiotikumokat kis (0,1-5 mM) koncentrációban alkalmazzák. Ezeket a szelektorokat általában szerves adalékokkal együtt használják, hogy elkerüljék a szelektor molekulák aggregációját és gátolják adszorpciójukat az oszlop falán. Az elválasztások rendszerint ellenáramú technikával történnek a makrociklusos antibiotikumok nagy UV- aktivitása miatt.

A makrociklusos antibiotikumok legelterjedtebben használt képviselője a vancomicin, amit savas enantiomerek elválasztására használnak.⁶³ Erre használják még a teicoplanint, a ristocetint, az avoparcint és az eremomicint is. A bázikus enantiomerek elválasztására a rifamicin molekulák alkalmasak.

A micellaképző királis szelektorok lehetnek szintetikus előállítottak (pl. alkilglikozidok, aklil-aminósavak), vagy természetben előfordulóak (pl. epesavak).^{8,15} Az ionos és semleges micellaképzők alkalmazásáról egyaránt beszámol az irodalom.⁸ Használatukat sokszor a hidrofób molekulák vizes közegű jó oldása indokolja. Gyakran használatuk biztosítja, hogy a semleges molekulák migrációja -micella komplexben- nem azonos az EOF-el.

A fehérjéket a jobb anyagátadás miatt nagyobb hatékonysággal lehet használni a ChCE gyakorlatában, mint HPLC-s állófázisként.^{8,64} A csúcsok alakja és tányérszáma sokkal jobb ezzel a technikával. Ezen szelektorokat rendszerint akrilammal borított oszlopokban használják, így elkerülhető a szelektor felületi adszorpciója. A borítás egyúttal lehetővé teszi az ellenáramú technika alkalmazását, amit szelektor magas UV adszorbanciája indokol.

Számos más szelektort is kipróbáltak (pl. lineáris dextrinek, ion-pár képzők, korona éterek, ligandcserés szelektorok, kalixirének, tartarátok), de ezek használata nem terjedt el széles körben a ChCE gyakorlatában.

6. A ChCE analízis módszer kidolgozásának alapelvei

A jó ChCE módszer kidolgozására számos recept található az irodalomban, de biztos módszer nem lehetséges.^{8,9,37,65} Az első mérések előtt tisztázni kell a szelektor és a minták pK értékeit, és UV abszorpcióját. Így biztosítani lehet, hogy a minta ne az EOF sebességével vándoroljon, és a detektálásnak megfelelő legyen a hullámhossza, vagy ellenáramú technika alkalmazása javasolt. Amennyiben a minta és a szelektor ellentétes töltésű érdemes három pH értéket kipróbálni (mind két partner ionos, a minta ionos a szelektor semleges és a minta semleges a szelektor ionos). Kezdeti szakaszban statisztikusan szubsztituált termékek használata javasolt, majd a validálás során áttérés a single-isomer termékekre, ha mindkettő beszerezhető.

Kezdeti műszer paramétereknek a következők javasoltak: 50 cm (effektív kapillaris hossz) x 0,050 mm fused-silica kapillaris; szelektor, 10 mM; puffer, 40 mM bórsav, ecetsav és foszforsav (1:2:2); feszültség, 20 kV; hőm., 20°C. Amennyiben $R_s > 0,8$ felbontást észlelünk, a módszert érdemes tovább finomítani, a szelektor koncentrációnak, pH, szerves adalékok és az ionerőség változtatásával. Az $R_s < 0,8$ értéknél szelektort kell váltani.

Bázikus és semleges anyagokra először karboximetil CD-k, utána szulfoszubsztituált CD-k, végül CD foszfátok kipróbálása javasolt. Savas és semleges anyagokra heptakis(2,3-di-O-metil)-hexakis(6-O-metil)-6-monoamino-6-monodezoxi-β-CD alkalmazása javasolt. Töltéssel rendelkező mintáknál a statisztikusan metilezett ciklodextrinet is érdemes kipróbálni alacsony árak miatt. Amennyiben a CD-k használata nem vezet eredményre, akkor vancomicin vagy a rifamicin antibiotikumok kipróbálása javasolt.

A ChCE körében számos validált mérést végeztek, amely a módszer használhatóságát bizonyítja GLP körülmények között.³⁷

7. Következtetések

A királszelektív ChCE egyesíti magában a kromatográfia és a CE előnyeit. Nagy hatékonyságú, gyors módszer. A technika elsősorban különböző ciklodextrin szelektorokat alkalmaz, de más ágensek rendkívül széles köre is használható. Elsősorban ionos enantiomerek analízisében nyit új lehetőséget, de az apoláris vegyületek elválasztása sem jelent problémát. Várhatóan ez a módszer fogja kitenni néhány éven belül a királszelektív analízisek túlnyomó részét, ha a meglévő érzékenységi problémákat a technika kiküszöböli.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők megköszönik Jicsinszky Lászlónak és Karin E. Markidesnek, hogy a közlemény háttérül szolgáló publikációk létrejöttéhez hozzájárultak. A közlemény az NKTH-OTKA No. NI-688863 és OTKA K72861 projektek támogatásával készült.

Hivatkozások

1. Department of Health and Human Service of USA Food and Drug Administration's: Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs, Fed. Regist. **1992**, *57*, 2 May, pp 102.
2. Batra, S.; Seth, M. A.; Bhaduri, P. *Chirality and Future Drug Design, In Progress Drug Research*, Jucker, E., Ed.; Birhauser Verlag **1994**; Vol. 41, pp 191–248.
3. Kallenborn, R.; Hühnerfuss, H. *Chiral Environmental Pollutants*, Springer, **2001**.
4. König, W. A.; Hochmuth, D. H. *J. Chromatogr. Sci.* **2004**, *42*, 423–439.
5. Martinez A. B.; Crego A. L.; Gonzalez M. J.; Marina M. L. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 1157–1165.
6. Ali, I.; Aboul-Enein, H. Y. *Chiral Pollutants*, Wiley, **2004**.
7. Garrison, W. A. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 18–23.
8. Chankvetadze, B. *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, Wiley, **1997**.
9. Wrenn, S. A. C. *The Separation of Enantiomers by Capillary Electrophoresis, in Chromatographia Suppl.* **2001**, *54*, S7–92.
10. Simó C; Rizzi. A.; Barbas C.; Cifuentes A. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1432–1441.
11. Chankvetadze, B. *Electrophoresis* **2009**, *30*, S211–S221.
12. Terabe, S.; Ozaki, H.; Otsuka, K.; Ando, T. *J. Chromatogr.* **1985**, *332*, 211–217.
13. Wistuba D. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 941–952.
14. Wrenn, S. A. C.; Rowe, R. C. *J. Chromatogr.* **1992**, *603*, 235–241.
15. Lantz, A. W.; Rozhkov, R. V.; Larock, R. C.; Armstrong, D. W. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2727–2734.
16. Rudaz S.; Calleri E.; Geiser L.; Cherkaoui S.; Prat J.; Veuthey J. L. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 2633–2641.
17. Servais A. C.; Rousseau A.; Fillet M.; Lomsadze K.; Salgado A.; Crommen J.; Chankvetadze, B. *Electrophoresis* **2010**, *31*, 1467–1474.
18. Juvancz, Z.; Markides, K. E.; Jicsinszky, L. *J. Microcol. Sep.* **1997**, *9*, 581–589.
19. Iványi, R.; Jicsinszky, L.; Juvancz, Z. *Chromatographia* **2001**, *53*, 166–172.
20. Iványi, R.; Jicsinszky, L.; Juvancz, Z. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3232–3236.
21. Iványi, R.; Jicsinszky, L.; Juvancz, Z.; Roos, N.; Otta, K.; Szejtli, J. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2675–2686.
22. Schurig, V. *J. Chromatogr.* **1994**, *666*, 111–129.
23. Guzman, N. A.; Majors, R. E. *LC/GC Europe* **2001**, *14*, 288–299.
24. Aumatell, A.; Guttman, A. *J. Chromatogr. A* **1995**, *717*, 229–234.
25. Perrin, C.; Heyden, Y. V.; Maftouh, M.; Massart, D. L. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3203–3215.
26. Nussbaum, M. A. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 2664–2669.
27. Nagl S.; Schulze P.; Ludwig M.; Belder D. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 2765–2772.
28. Rodriguez S.A.; Jerfy M.; Saraceno R. *Chromatographia* **2006**, *64*, 369–374.
29. Borges K. B.; Pupo M. T.; Bonato P. S. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 3910–3917.
30. Szökő, É.; Tábi, T.; Borbás, T.; Dalmadi, B.; Tihanyi, K.; Magyar, K. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2866–2875.
31. Juvancz, Z.; Bodáné Kendrovics R.; Iványi R.; Szenthe L. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 1701–1712.
32. Magnusson, J.; Wan, H.; Blomberg, L. G. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3013–3019.
33. Chankvetadze, B.; Burjanadze, N.; Bergenthal, D.; Blaschke, G. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 2680–2685.
34. Sabah, S.; Scriba G. J. *Chromatogr. A* **1999**, *833*, 261–266.
35. Schulte, G.; Chankvetadze, B.; Blaschke, G. *J. Chromatogr. A* **1997**, *771*, 259–266.

36. Horimai, T.; Ohara, M.; Ichinose, M. *J. Chromatogr. A* **1997**, *760*, 235–244.
37. Altria, K. D. Analysis of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis, *Chromatographia CE Series* **1998**.
38. Juvancz, Z.; Markides, K. E.; Jicsinszky, L.; Iványi, R. *J. Microcol. Sep.* **2001**, *13*, 62–68.
39. Lurie, I.S.; Odenal N. D.; McKibben, T. D.; Casale, J. F. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 2918–2925.
40. Lin, C. E.; Lin, S. L.; Fang, I. J.; Liao, W. S.; Chen, C. C. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2786–2794.
41. Bjornsdottir, I.; Hansen, S. H.; Terabe, S. *J. Chromatogr. A* **1996**, *745*, 37–44.
42. Verpoorte E. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 677–712.
43. Hadley, M. R.; Camilleri, P.; Hutt, A. J. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1953–1976.
44. Majid E.; Male K. B.; Tzeng Y.-M.; Omamoghio J. O.; Glennon J. D.; Luong J. H.T. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 1967–1975.
45. Nishi, N. *Electrophoresis* **1999**, *19*, 3237–3258.
46. Hedeland, M.; Isaksson, R.; Petterson, C. *J. Chromatogr. A* **1998**, *807*, 297–305.
47. Rudaz, S.; LeSaux, T.; Prat, J.; Garell P.; Veuthey, J. L. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 261–2771.
48. Giuffrida A.; Leon C.; Cucinotta V.; Cifuenres A. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 1734–1742.
49. Chankvetadze, B.; Burjandze N.; Blaschke, G. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3281–3285.
50. Williams, R. L.; Vigh, Gy. *J. Chromatogr. A* **1996**, *730*, 273–280.
51. Juvancz, Z.; Szejtli, J. *Trac* **2002**, *21*, 379–388.
52. Fanali, S. *Electrophoresis* **2009**, *30*, S203–S210.
53. Szemán, J.; Ganzler, K.; Salgó, A. *J. Chromatogr. A* **1996**, *728*, 423–431.
54. Busby B. M.; Maldonado O.; Vigh, Gy. *J. chromatogr. A* **2003**, *990*, 63–73.
55. Valkó I. E.; Sirén H.; Riekkola M.-L. *J. Chromatography A* **1996**, *737*, 263–272.
56. Schmitt, U.; Ertan, M.; Holzgrabe, U. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2801–2807.
57. Juvancz, Z.; Markides, K. E.; Jicsinszky, L. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 1002–1006.
58. Juvancz, Z.; Markides, K. E.; Jicsinszky, L. *J. Microcol. Sep.* **1999**, *11*, 716–722.
59. Iványi R. Ph.D. tézisek, ELTE, **2007**.
60. Dubsy P.; Svobodová J.; Tesarova E.; Gas B. *Electrophoresis* **2010**, *31*, 1435–1441.
61. Armstrong, D.W.; Tang, Y.; Chen, S.; Zhou, Y.; Bagwill, C.; Chen, J. R. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1473–1484.
62. Prokhorova A. F.; Shapovalova E. N.; Shapak A. V.; Staeoerov S. M.; Shpigun O. A. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 3674–3677.
63. Aboul-Enein, H. Y.; Ali, I. *Chromatographia* **2000**, *52*, 679–691.
64. Chu B.-L.; Lin J.-M.; Wang Z.; Guo B. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 2845–2852.
65. Juvancz, Z., Seres, G. *Chiral selective chromatographic analysis, in CRC Handbook of Optical Resolutions via Diastereomeric Salt Formation*; Kozma D. Ed.; CRC, **2001**.
66. Nevado J. J. B.; Penalvo G. C.; Sanchez J. C. J.; Mochon M.C.; Dorado R.M. R.; Navarro M. V. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 2940–2946.

Chiral selective capillary electrophoresis (ChCE)

Chiral selective determinations have become essential requirements of up to date analyses in various branches of industry (e.g. pharmaceutical, agro, food and cosmetic). The capillary electrophoresis offers unique advantages in the analytical scale enantiomer selective separations.

Electrophoretic processes alone are not enough to separate chiral molecules. Partition (chromatographic) processes are also necessary for chiral separations in electrophoresis. In this paper, the ChCE abbreviation is used for chiral selective capillary electrophoresis to distinguish it from CZE and CEC. CZE uses only electrophoretic processes, and CEC has a real stationary phase.

The mobility difference of two enantiomers ($\Delta\mu$) can be expressed with the Eq. 1., where $[c]$ is the concentration of the chiral selector, μ_f and μ_{c_s} are the mobility of analyses in free and complex (diastereomeric associated) forms, K_S and K_R are stability (partition) constants of enantiomers with chiral selectors. The separation comes from the migration speed difference between the free and associated states of the enantiomers, if K_S is not equal with K_R . The migration difference has an optimum in the function of concentration of chiral selectors (Fig. 1.). This equation also shows that, the oppositely charged selectors and analytes produce big mobility differences. Eq. 1 also suggests that the neutral enantiomers can not be separated with neutral selectors, because migration speeds of enantiomers are equal to EOF in both free and associated forms.

ChCE offers several advantages in chiral selective analyses:

- High efficiency (> 100 000 theoretical plate)
- Fast analyses
- Low analysis temperatures
- Enantiomer ratio of several analytes can be established during one analysis

- Several ways for changing migration orders of enantiomers
- Excellent for polar ionized molecules, but suitable for the apolar neutrals enantiomers too
- Very low sample requirement (~nl)
- Small buffer consumption (10-20 ml/day)
- No or minute sample pretreatment even from biological matrices
- Detectors with broad linear range even in the case of high enantiomer excess (> 99.9)
- On-line coupling with mass spectrometer

For example, the high efficiency of ChCE made it possible to achieve baseline resolutions for enantiomers of ibuprofen, although their selectivity (α_{eff}) was only 1.009.

Fig.2. demonstrates the advantages of ChCE: high efficiency, selectivity and ability to separate several enantiomer pairs during one analysis.

The disturbing high UV activity of the selector can be eliminated by partially filling or the counter migration technique.

ChCE has bigger deviation of migration times and peak areas than those usually accustomed in chromatographic practice. However, using the internal standard and normalization method, these disadvantages can be minimized.

ChCE applies a lot more types of chiral selectors than other techniques.

Cyclodextrins (CDs) are the most frequently used chiral selectors in CE, because they show very broad selectivity spectra. The high efficiency of ChCE suits well moderate selectivity values and broad selectivity spectra of CDs. Most of the derivatives of CD

are statistically substituted products. The members of such CD products differ from each other in their substitution degrees and substitution patterns having different selectivity features. Uniform derivatives (single-isomer) of CDs have also been introduced to solve the selectivity deviation of statistically substituted products. The single-isomers, however, have narrower selectivity spectra than statistically derivatized ones. CDs act not only as chiral selectors but also ortho, meta, para selectors (Fig. 3.) and solubizers.

The neutral CDs (natives, methylated, (*S*)-(2-hidroxy)propylated) are used for ionized enantiomers. The sulphate, carboxyl, phosphate CD derivatives are good for the separation of basic and neutral chiral molecules. Various amines containing CD derivatives are excellent for the separation of acidic and neutral enantiomers (Fig. 4.). The mixtures of ionic and neutral CDs can

have synergetic separation effects offering shorter analysis times and better resolutions.

The use of macrocyclic antibiotics is the most dynamically developing branch of ChCE. Every² member of them has several functional groups, and twisted cyclic parts resulting in high separation power. Even R_s value of 38 was achieved using only 1.2 mM Teicoplanin.

Several chiral ionic and neutral surfactants have been introduced into ChCE, working among micellar electrokinetic chromatography (MEKC) conditions. They are natural (bile acids) or synthetic alkyl substituted chiral compounds (sugars, amino acids).

ChCE is an excellent, reliable method with validated analyses. It will soon substitute HPLC in the majority of chiral separations.