

SEPARÁCIE CHIRÁLNYCH LÁTKOK KAPILÁRNOU ELEKTROFORÉZOU

JURAJ ŠEVČÍK^{a,b}, EVA TESAŘOVÁ^c
a ZDENĚK STRÁNSKÝ^{a,b}

^aKatedra analytické chemie, e-mail: sevcik@risc.upol.cz a ^bCentrum analytické chemie molekulárních struktur, Univerzita Palackého, Třída Svobody 8, 771 46 Olomouc, ^cKatedra fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 00 Praha 2

Došlo dňa 1.III.2000

Klíčové slová: kapilárna elektroforéza, chirálna separácia, opticky aktívne látky

Obsah

1. Úvod
2. Separácie chirálnych látok metódami kapilárnej elektroforézy
 - 2.1. Mechanizmus ligandovej výmeny
 - 2.2. Tvorba inklúzných komplexov
 - 2.3. Afinitné interakcie
 - 2.4. Micelárne systémy a mikroemulzie
 - 2.5. Imobilizované chirálne systémy
3. Ovplyvnenie separácie chirálnych látok – modely versus experiment
 - 3.1. Vplyv experimentálnych parametrov na separáciu chirálnych látok
 - 3.1.1. Vplyv typu a koncentrácie chirálneho selektora
 - 3.1.2. Vplyv zloženia, koncentrácie a pH základného elektrolytu
 - 3.1.3. Vplyv prídavku organických aditív
 - 3.1.4. Vplyv pracovných parametrov
 - 3.2. Modely a postupy chirálnych separácií pomocou cyklodextrínov

1. Úvod

Kapilárna elektroforéza je modernou analytickou separačnou technikou, ktorá dnes prežíva prudký rozvoj. Vďaka dobre prepracovanej teórii, množstvu pracovných módov, vysokej účinnosti, rýchlosti analýzy, jednoduchému vývoju metód a dostupnosti automatizovaných prístrojov na trhu nachádza svoje uplatnenie v rôznych oblastiach aplikácií. Príkladmi môžu byť jej použitia pri analýzach biomakromolekúl – proteínov, cukrov, oligonukleotidov, restričných fragmentov DNA (projekt Hugo zameraný na dešifrovanie ľudského genomu), obsahu buniek či častí vírusov, aminokyselín, organických kyselín, liečiv, vitamínov, potravinárskych farieb, anorganických iónov, pesticídov či detergentov.

Jednou z oblastí analytickej chémie, v ktorej kapilárna

elektroforéza dnes v plnom rozsahu prezentuje svoje možnosti, je problematika separácií chirálnych látok. Separácie opticky aktívnych zlúčenín majú okrem lákavého analytického problému (enantioméry vykazujú v achirálnom prostredí totožné fyzikálno-chemické vlastnosti) i značný praktický význam, pretože jednotlivé enantioméry chirálnych zlúčenín vo väčšine prípadov vykazujú značne odlišné farmakologické, toxikologické či pesticídne vlastnosti pri svojich interakciách so živými – tj. chirálnymi – systémami. Doposiaľ však pri tvorbe analytických postupov separácií konkrétnych chirálnych zlúčenín prevláda empirický prístup spojený ako s výberom vhodného chirálneho činidla, tak i s množstvom nutných krokov pri optimalizácii experimentálnych parametrov.

Tento prehľadný článok je venovaný problematike separácií chirálnych látok metódami kapilárnej elektroforézy. Vzhľadom k tomu, že od roku 1988 neustále narastá množstvo publikovaných prác, prehľadných článkov^{1–30} ako i špeciálnych čísel odborných časopisov (napr. *Electrophoresis* 18 (1997), *J. Chromatogr.* 792 (1997).) vzťahujúcich sa k tomuto problému, je uvedený prehľad iba reprezentatívnym prierezom rôznych postupov a vybraných aplikácií.

2. Separácie chirálnych látok metódami kapilárnej elektroforézy

Separácie optických izomérov sú založené na interakciách enantiomérov s chirálnym selektorom (pred, alebo počas separačného procesu) za tvorby diastereoizomérnych komplexov líšiacich sa vo svojich fyzikálno-chemických vlastnostiach. Rozdiely vo fyzikálno-chemických vlastnostiach sa využívajú k ovplyvneniu rozdielov vo výsledných efektívnych pohyblivostiach enantiomérmeho páru. Teória diskriminácie chirálnych látok je založená na predstave minimálne trojbojovej interakcie enantiomérov s chirálnym selektorom³¹, pričom minimálne jedna z týchto interakcií musí byť stereochemicky definovaná³².

Transformácia enantiomérneho páru na stabilné diastereoizoméry derivatizáciou s chirálnym selektorom pred vlastnou separáciou v achirálnom prostredí je princípom tzv. nepriamych metód analýzy chirálnych látok. Výhodou tohoto postupu je značná flexibilita vo voľbe elektroforetických separačných podmienok a možnosť zníženia detekčného limitu analyzovaných látok. Nevýhody spočívajú v nutnosti validácie derivatizačného kroku (výťažok reakcie, tvorba vedľajších produktov, možnosť racemizácie, vplyv vzorkovej matrice), v nárokoch na čistotu chirálnych selektorov určených k derivatizácii, v potrebe analytu vlastniť vhodné funkčné skupiny schopné reakcie s chirálnym selektorom a v časovej náročnosti metódy. Pomocou tohoto postupu boli separované napr. enantioméry aminokyselín derivatizáciou s Marfeyovým činidlom³³ (*N*⁶-(2,4-dinitrofenyl-5-fluor)-L-alaninamid), s GITC (cit.³⁴) (2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glukopyranozylyzotiokyanátom), methamfetamínu, amfetamínu a ich prekurzorov s GITC (cit.³⁵) či deriváty tryptofanu s anhydridom kyseliny (+)-*O*,*O*'-diacetyl-L-vínnej³⁶.

Priame metódy analýzy enantiomérov sú založené na ich priamej separácii v chirálnom prostredí. Chirálny selektor je pridávaný do základného elektrolytu^{37–88}, inkorporovaný do gélu^{48,89,90}, naviazaný na nosič^{91,92} či imobilizovaný na stenách kapiláry^{93–96}. Zaujímavé možnosti určite prinesie používanie chirálnych „monolitických kolón“⁹⁷. Jednotlivé enantioméry sú diskriminované na základe tvorby rôzne stabilných diastereomérnych komplexov s chirálnym selektorom. Tento postup je dnes najčastejšie používaný, pretože eliminuje všetky nevýhody spomínané u nepriamych metód (nie je vyžadovaná derivatizácia, čistota chirálneho selektoru nie je dominantná, atd.). Určitá nevýhoda tohoto postupu spočíva vo výbere vhodného chirálneho selektoru.

Princípy používaných priamych metód podľa typu použitého chirálneho selektoru a separačného mechanizmu spolu s niektorými aplikáciami sú bližšie diskutované v nasledujúcich podkapitolách. Je si treba uvedomiť, že uvedené rozdelenie selektorov podľa separačného mechanizmu nie je najpresnejšie, pretože v interakčnom mechanizme chirálny selektor – analyt sa často kombinuje viacerými typmi interakcií.

2.1. Mechanizmus ligandovej výmeny

Enancioseparácia výmenou ligandov je založená na tvorbe koordinačných komplexov pozostávajúcich z centrálného iónu tranzitného kovu (napr. Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{3+} , ...) a pri najmenšom dvoch chirálnych bifunkčných ligandov (chirálného koselektoru a separovaného enantioméru). Tieto koordinačné komplexy sú charakterizované svojimi konštantami stability, ktoré sú závislé na geometrii a orientácii ligandov vznikajúcich ternárnych komplexov, na vzájomných interakciách krátko dosahu koselektoru s jednotlivými enantiomérmi a sú významne ovplyvňované separačným prostredím (zložením základného elektrolytu).

Týmto postupom bolo v kapilárnej elektroforéze vykonaných relatívne málo experimentov, pretože dvojica enantiomérov, ktorá má byť separovaná, musí obsahovať minimálne dve funkčné skupiny schopné poskytovať elektrónový pár centrálnemu kovu (napr. amino- a karboxylovú či hydroxy- a karboxylovú skupinu). Navyše stabilita vznikajúcich koordinačných komplexov klesá s narastajúcou početnosťou atómov chelátového kruhu.

Princíp tvorby diastereomérnych kovových komplexov bol využitý, podobne ako rovnaký princíp v kvapalinovej chromatografii, najmä pri analýzach enantiomérov aminokyselín (s Co^{3+} -etyléndiaminom v prostredí kyseliny (L)-(+)-vinnej⁹⁸, Cu^{2+} -(L)-hydroxyprolínom⁹⁹), danzylderivátov aminokyselín (pomocou Cu^{2+} -L(D)-histidínu^{100,101}, Cu^{2+} -aspartámu¹⁰², Cu^{2+} -N,N-didecyl-L-alanínu¹⁰³), dipeptidov obsahujúcich histidín (komplexy Zn^{2+})¹⁰⁴, α -hydroxykyselín (s Cu^{2+} -(L)-hydroxyprolínom¹⁰⁵).

2.2. Tvorba inklúzných komplexov

Podstata separácií chirálnych analytov pomocou tvorby labilných inklúzných komplexov spočíva v rozdielnej afinitive jednotlivých enantiomérov s rigídnym vnútorným prostredím kavít chirálneho selektora a jeho okolia. Reprezentantmi tejto skupiny chirálnych selektorov sú najmä cyklodextríny a deriváty crown etérov. Avšak v literatúre sa objavujú i ďalšie typy selektorov, ktoré aspoň čiastočne využívajú hosť-hosti-

telské interakcie (napr. makrocyclické antibiotiká^{39–41}, kalixareny⁴²).

Zo širokého spektra crown etérov bola k chirálnym separáciám doposiaľ použitá iba [18]-crown-6-tetrakarboxylová kyselina, ktorá vďaka rozmerom svojho kruhu vytvára s protonizovanými primárnymi amínmi selektívne inklúzne komplexy (interakcie medzi vodíkovými atómami aminoskupiny s kyslíkovými atómami polyetérového kruhu). Teória chirálnej diskriminácie je založená na predstave, že štyri karboxylové skupiny na crown etérovom kruhu vytvárajú chirálnu bariéru pre inkludujúce sa enantioméromé molekuly, pričom sa súčasne medzi nimi uplatňujú i interakcie krátko dosahu (najmä elektrostatické interakcie karboxylových skupín a vodíkové mostíky). Je zaujímavé, že so vzrastajúcou koncentráciou [18]-crown-6-tetrakarboxyklovej kyseliny v základnom elektrolyte dochádza k lepšiemu rozlíšeniu bez významného poklesu pohyblivosti analytov⁴³. Enancioseparáciu môžu negatívne ovplyvňovať ióny alkalických kovov prítomné v separačnom elektrolyte, pretože taktiež tvoria s crown etérmi komplexy.

[18]-Crown-6-tetrakarboxylová kyselina bola úspešne použitá pri separáciách niektorých aminokyselín^{44,45}, dipeptidov⁴⁴, aminoalkoholov⁴⁵ a ďalších zlúčenín majúcich primárnu aminoskupinu⁴⁶. Synergický účinok α -cyklodextrínu a chirálneho crown etéru bol pozorovaný pri separácii racemického tryptofanu⁴.

Cyklodextríny v natívnom stave, alebo modifikované rôznymi či už ionizovateľnými (sulfbutyl-, succinyl-, fosfo-, karboxymetyl-, acetyl-, metylamino-, aminoethylamino-, ...), alebo neionizovateľnými (hydroxypropyl-, metyl-, ...) skupinami patria medzi najpopulárnejšie a najčastejšie používané chirálne selektory. Cyklodextríny sú neutrálne prírodné cyklické oligosacharidy majúce tvar zrezaného kužela. Ich relatívne hydrofóbna kavita s vysokou elektrónovou hustotou umožňuje vytvárať inklúzne komplexy s nepolárnymi analytmi (resp. ich skupinami) o vhodných rozmeroch. Objem kavít varíuje s počtom glukózových jednotiek⁴⁷. Enancioselektivita cyklodextrínov je daná asymetrickými uhlíkmi glukózy a hydroxylovými skupinami primárnych a sekundárnych alkoholov na vstupných prstencoch⁴⁸. Afinita cyklodextrínovej kavít k analytu vzrastá s jeho narastajúcou hydrofóbcitou. Chirálny analyt môže byť inkludovaný do kavít úplne, alebo čiastočne, pričom vznikajúci komplex je stabilizovaný interakciami so sekundárnymi hydroxylovými skupinami glukózových jednotiek, ktoré sú zodpovedné za enanciodiskrimináciu. Stabilita vznikajúcich inklúzných komplexov spolu s efektívnymi pohyblivosťami jednotlivých enantiomérov, a tým i výsledné chirálne rozlíšenie, sú ovplyvňované množstvom rôzne vyvážených experimentálnych parametrov, ktorých vplyv je bližšie diskutovaný v nasledujúcich podkapitolách. Derivatizáciou hydroxylových skupín dochádza k zmene v molekulárnej štruktúre natívnych cyklodextrínov, čo sa následne odráža napr. v zmene veľkosti a hydrofóbcity kavít, novej ponuke stereoselektívnych centier umožňujúcich ďalšie interakcie, alebo v ich solvatacii či stabilite. U β -cyklodextrínov sa navyše často zvýši ich rozpustnosť vo vodnom prostredí. Priaznivým dôsledkom chemickej modifikácie najmä u β -cyklodextrínov je významné zvýšenie selektivity separácie enantiomérov^{49,50}. Nabité deriváty cyklodextrínov ďalej rozširujú možnosti použitia týchto chirálnych selektorov pre separáciu analytov, ktoré sami nenesú vlastný náboj. Nový rozmer do

diskriminačného procesu separácie enantiomérov vnáša použitie β -cyklodextrínových oligomérov^{51–54}, u ktorých sa uplatňuje vplyv ich konformácie⁶³.

Cyklodextríny použili ako chirálne aditíva v jednotlivých elektromigračných technikách medzi prvými Smolková-Keulemansová¹⁰⁶ (izotachoforéza), Karger⁴⁸ (gelová elektroforéza), Terabe⁵⁵, Fanali⁴⁹ (kapilárna zónová elektroforéza), Dobashi¹⁰⁷, Terabe⁵⁶ Nishi⁵⁷ (micelárna elektrokinetická chromatografia). Odvtedy bolo rôznymi autormi analyzované nespočetné množstvo enantiomérov fyziologicky významných látok a liečiv^{58–63}, aminokyselín^{64,65}, aromatických hydroxykyselín⁶⁶, pesticídov⁶⁷ atd. Množstvo ďalších aplikácií je obsiahnutých v prehľadných článkoch a publikáciách^{7,8,11,14,15}.

2.3. Afinity interakcie

Názov tejto podkapitoly nie je najpresnejší, pretože afinitné interakcie zahŕňujú celý rad interakcií, počínajúc elektrostatickými, cez vodíkové väzby, hydrofóbne interakcie a končiac napríklad inklúziou. Termín „afinitné“ bol prevzatý z názvu „afinitná kapilárna elektroforéza“⁶⁸, ktorý sa používa pre systémy obsahujúce napr. proteíny, alebo iné biomakromolekuly ako aditíva.

Následne prezentované chirálne selektory vykazujú vo svojich molekulách enantiodiskriminačné centrá, ktoré sú definované konformáciou týchto selektorov a sú vysokoselektívne iba pre ten ktorý analyt (enantiomér). Tieto selektory sú väčšinou biologického pôvodu a majú veľké množstvo chirálnych atómov v molekule. Ich použitie je odvodené najmä od ich transportných vlastností v živých organizmoch. Väčšinou ide o polyméry pozostávajúce z chirálnych monosacharidov a aminokyselín.

Proteíny tvoria jednu zo skupín chirálnych biopolymérnych selektorov úspešne použitých k separácii množstva rôznych typov enantiomérov. Substrátová špecifita proteínov determinujúca separačnú selektivitu je však značne závislá na použitých experimentálnych podmienkach (najmä na pH a zložení základného elektrolytu, resp. danej iónovej sile). Vzhľadom k pomalej kinetike a nízkej kapacite proteín – ligandových interakcií sú obdržané píky široké a asymetrické. Určitou nevýhodou použitia proteínov vo vyšších koncentraciách je i ich absorbancia v UV oblasti spektra. Navyše, ich interakcie so stenou kapiláry výrazne znižujú opakovateľnosť a reprodukovateľnosť meraní a často i negatívne ovplyvňujú výsledné chirálne rozlíšenie. Z proteínových selektorov boli použité najmä sérové albumíny či už navzájom zosieťované (kapilárna gelová afinitná elektroforéza)^{69–71}, alebo ako chirálne aditívum pridávané do základných elektrolytov^{72,73}, celobiohydroláza⁷⁴, avidín⁷⁵ či kyslé glykoproteíny (orosomucoid, ovomucoid, ...) ^{75,76}.

Lineárne sacharidy tvoria druhú skupinu biopolymérnych selektorov, ktorá bola použitá pre enantiodiskrimináciu. Zo širokej skupiny vo vode rozpustných oligosacharidov boli ako chirálne selektory úspešne použité zmesi maltodextrínov (Maldex, Glucidex, Maltrin, mylóza)⁷⁷, dextran⁷⁸ a heparín⁹. Niektoré protonizovateľné enantioméromerne liečivá (clenbuterol, mianserin, verapamil, ...) boli separované pomocou dextrín sulfopropyleteru⁷⁹. Zaujímavé enantiodiskriminačné vlastnosti vykazujú tiež chondroitínsulfát A (cit.⁸⁰), chondroitínsulfát C (cit.⁸¹) či curdlan (lineárny β -1,3-glukan)⁸² tvoriaci po zahriatí stabilný gel.

Jednu z najnovších a veľmi sľubných skupín chirálnych selektorov tvoria makrocyclické antibiotiká. Použité makrocyclické antibiotiká vlastnia množstvo stereogénnych centier a funkčných skupín, ktoré sú využiteľné pri enantioselekciiach (aromatické skupiny, amidové väzby, skupiny poskytujúce tvorbu vodíkových väzieb, hydrofóbne regióny, kavity, ...). Pomocou makrocyclických glykopeptidových antibiotík vancomycínu^{83–86} a teikoplanínu⁸⁷ bolo doposiaľ rozlíšených cez sto rôznych racemátov zahrňujúcich nesteroidné protizápalové látky, antineoplastické zlúčeniny či derivatizované aminokyseliny. K chirálnemu rozlíšeniu aminoalkoholov boli tiež použité antibiotiká rifamicínového typu⁴⁰, Ristocetin A (cit.⁸⁸) a Avoparcin¹⁰⁸.

Z ďalších prírodných látok boli pre separáciu opticky aktívnych zlúčenín použité pozitívne nabitý ergotový alkaloid (+)-(5*R*,8*S*,10*R*)-1-allyl-tergurid^{109,110}, cinchonový alkaloid quinín¹¹¹ či polymérny chitosan (deacetylovaný chitín)¹¹².

2.4. Micelárne systémy a mikroemulzie

Pri separáciách opticky aktívnych látok pomocou micelárnych systémov sú chirálne centrá zodpovedné za enantiodiskrimináciu väčšinou inkorporované v micelách. Tenzidy tvoriace micely či mikroemulzie plnia obyčajne jednu z dvoch funkcií – buď vytvárajú vlastné chirálne micelárne prostredie či už zo samotných chirálnych tenzidov, alebo z nechirálnych tenzidov zmiešaných s chirálnymi selektormi, ktoré sú v základnom elektrolyte nerozpustné, alebo málo účinné (zmesné micely), alebo na druhej strane solubilizujú a transportujú neutrálne či nenabité analyty v základnom elektrolyte.

Medzi najčastejšie používané chirálne tenzidy patria deriváty žľočových kyselín (kyselina cholová, deoxycholová, taurocholová a taurodeoxycholová). Mechanizmus ich chirálnej diskriminácie však nie je doposiaľ dostatočne objasnený. Pomocou týchto chirálnych tenzidov boli analyzované niektoré danzylované aminokyseliny^{13,113} a liečivá^{114–117}. Ďalšími používanými chirálnymi tenzidmi sú dodekanoylové deriváty niektorých aminokyselín (L-valínu, L-alanínu, L-glutamátu), ktoré boli použité pri separáciách enantiomérov derivatizovaných aminokyselín^{107,118–122} či cukrov¹²³. Zvýšenie selektivity tohoto typu chirálnych tenzidov sa docieli tvorbou zmesných miciel s dodecylsulfátom sodným (SDS) (kombináciou elektrostatických a hydrofóbnych interakcií s chirálnymi centrami a micelárnym jadrom zmesného systému). Komicelárne systémy SDS s digitonínom^{119,124} a SDS s niektorými saponínmi¹²⁵ (glycínrhizovou kyselinou či β -escinom) boli použité pri analýze derivátov aminokyselín. Tenzidy (najmä SDS) sú významnými aditívami pridávanými do základného elektrolytu pri enantioseparáciách pomocou γ -cyklodextrínov, kedy okrem modifikácie vnútra kavity plnia i solubilizačnú a transportnú funkciu. Týmto zmesným systémom boli separované napr. enantioméry derivatizovaných aminokyselín (SDS)^{126,127}, binaftylov¹²⁸, niektorých pyrethroidov (SDS)¹²⁹, bupivakaínu (hexadecyltrimetylamoniumbromid¹³⁰). Súčasne makrocyclické antibiotiká boli úspešne použité v micelárnych systémoch s SDS²². Teikoplanín tvorí sám agregáty, ktorých prítomnosť v elektrolyte enantioseparáciu skôr zhoršuje⁸⁷. Boli použité i zmesné systémy cyklodextrínov s chirálnymi tenzidmi (taurodeoxycholát) pre separácie danzylovaných aminokyselín^{131–133}.

Mikroemulzie možno zjednodušene označiť ako „micelár-

ne systémy s veľmi vysokým agregačným číslom“. Sú preto vhodné predovšetkým pre separácie hydrofóbných zlúčenín. Avšak širšieho uplatnenia mikroemulzné systémy pre separácie opticky aktívnych látok nedosiahli. Príkladom použitia mikroemulzií je separácia efedrínu pomocou lipofilného (2*R*,3*R*)-di-*n*-butylvínanu s butanolom a SDS¹³⁴.

2.5. Imobilizované chirálne systémy

Alternatívou k priamemu pridávaniu chirálneho aditíva do základného elektrolytu je použitie imobilizovaných chirálnych fáz. Toto experimentálne usporiadanie je síce sľubné, ale doposiaľ obtiažne realizovateľné. Použitie tradičných chirálnych HPLC stacionárnych fáz (β -cyklodextrínových⁹¹, glykoproteínových⁹², ...) , chirálnych aditív navzájom spolymerezovaných (allylkarbamoylovaný β -cyklodextrín s akrylamidom⁸⁹, β -cyklodextrín s dextranom¹³⁵, hovädzí sérový albumín s glutaraldehydom⁹⁰, ...) či zosieťovaných pomocou polyakrylamidových gélov (β -cyklodextrín⁴⁸), alebo priamo vyviazaných na stenách kapiláry (modifikované β -cyklodextríny⁹³⁻⁹⁶) nenachádza pri praktických elektrochromatografických enancioseparáciách uplatnenie vzhľadom k problémom spojeným najmä s ich prípravou (napr. gelové matrice sú obtiažne reprodukovateľné, majú krátku dobu životnosti, vytvárajú sa bubliny, ...) a malou operačnou flexibilitou. Možné riešenie týchto problémov by mohlo priniesť už spomínané zavedenie monolitov, alebo modifikovaných lineárnych polymérov.

3. Oplyvnenie separácie chirálnych látok – modely versus experiment

Separácia dvoch analytov v kapilárnej elektroforéze je založená na rozdieloch v ich efektívnych elektroforetických pohyblivostiach. Mierou úspešnosti tejto separácie je rozlíšenie R_S , ktoré je funkciou účinnosti N a selektivity S (relatívneho rozdielu v pohyblivostiach¹³⁶) a môže byť definované rovnicou (1)¹³⁷

$$R_S = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\Delta\mu}{\bar{\mu} - \mu_{eo}} \quad (1)$$

kde $\Delta\mu$ je rozdiel v efektívnych elektroforetických pohyblivostiach dvoch analytov, $\bar{\mu}$ stredná elektroforetická pohyblivosť a μ_{eo} elektroosmotická pohyblivosť.

Separáčna selektivita je ovplyvňovaná navzájom množstvom experimentálnych parametrov, pričom vplyv niektorých z nich sa dá takmer predpovedať (pH, koncentrácia chirálneho selektora, teplota) a predpoved' u iných je obtiažna (typ cyklodextrínu, typ a koncentrácia základného elektrolytu či organického aditíva). Preto je potrebné pri vývoji metódy separácie daných opticky aktívnych látok, či pri testovaní nových chirálnych selektorov študovať vplyv všetkých experimentálnych parametrov a nájsť medzi nimi najvhodnejší kompromis.

Systematické štúdium vplyvu experimentálnych parametrov na separáčnu selektivitu je založené buď na menení hodnôt jedného parametru pri konštantnom zachovaní hodnôt ostatných parametrov (nevariačné postupy), alebo na súčasnom menení viacerých parametrov podľa určitého algoritmu (multivariačné postupy¹³⁸ napr. metóda úplných či frakčných

faktoriálov (Plackettova-Burmanova)¹³⁹, simplexová metóda, mapovania prekryvu rozlíšenia či metóda hlavných zložiek). Výhodou multivariačných postupov je podstatné zníženie počtu experimentov a lepšia štatistická interpretácia. Avšak postupy meniace iba jeden parameter prinášajú lepšiu interpretáciu vplyvu daného parametru na enanciodiskriminačný proces.

3.1. Vplyv experimentálnych parametrov na separáciu chirálnych látok

3.1.1. Vplyv typu a koncentrácie použitého chirálneho selektora

Výber vhodného typu chirálneho selektora vychádza z chemickej štruktúry analytu a výrazne predurčuje úspešnosť výsledného chirálneho rozlíšenia^{140,141}. Aby mohlo dôjsť k maximálnemu rozvinutiu všetkých interakcií medzi analytom a chirálnym selektorom musia si obidvaja navzájom maximálne priestorovo vyhovovať⁶⁴. Toto všeobecné pravidlo možno dokumentovať na príklade β -cyklodextrínov. Ak porovnáme natívne a derivatizované β -cyklodextríny, výhoda použitia modifikovaných β -cyklodextrínov spočíva okrem ich lepšej rozpustnosti tiež i vo variabilite objemu a geometrie kavity či ponuke stereoselektívnych interakcií daných rôznorodosťou substituentov. Zavedenie ionizovateľnej skupiny do štruktúry cyklodextrínu zvyšuje separáčnu selektivitu (predĺžením účinnej separačnej dráhy, ponukou elektrostatických interakcií).

Koncentrácia cyklodextrínov je dominantným parametrom enancioselektivity. S narastajúcou koncentráciou cyklodextrínov narastá viskozita základného elektrolytu, redukuje sa elektroosmotický tok a predlžuje doba analýzy. Vzhľadom k tomu, že nie sú známe asociačné rovnovážne konštanty inklúzných komplexov jednotlivých enanciomérov, ani ich elektroforetické pohyblivosti, je nutné túto optimálnu koncentráciu zistiť experimentálne. Určité semiempirické prístupy sú demonštrované v kapitole 3.2.

3.1.2. Vplyv zloženia, koncentrácie a pH základného elektrolytu

Zloženie základného elektrolytu, jeho koncentrácia, pH a iónová sila významne ovplyvňujú účinnosť (vplyv elektrodisperzie, adsorpcie na steny kapiláry, modifikácie elektroosmotického toku¹⁴²) i selektivitu (modifikácia polarita prostredia, hustoty náboja analytov, interakcií analytov či chirálnych selektorov s proti-iónmi¹⁴³) výsledného chirálneho rozlíšenia. pH ovplyvňuje ionizáciu analytov i chirálnych selektorov, a tým dáva možnosť (alebo naopak bráni) vniku nových vzájemných interakcií. Vzrast iónovej sily zvyšuje chirálne rozlíšenie napr. v cyklodextrínom modifikovaných systémoch, pretože vzrastom hydrofilicity pufovacieho systému sa zintenzívňujú hydrofóbné interakcie medzi analytom a cyklodextrínovou kavitou⁶⁵. K príprave základných elektrolytov je vhodné používať látky s nízkou vodivosťou¹⁴¹ (potlačenie generovania Joulovho tepla).

3.1.3. Vplyv prídavku organických aditív

Prídavok organických rozpúšťadiel do základného elektrolytu v rôznej miere modifikuje (zmenou rozpustnosti, solvátá-

cie, ionizácie) vzájomnú interakciu analytov a chirálnych selektorov či už v pozitívnom¹⁴⁴ alebo negatívnom zmysle (solvatačná stabilizácia iónov sa zmenšuje, klesá stupeň disociácie, rozpúšťadlá potlačujú tvorbu micel). V prípade teikoplanínu má rozrušenie jeho agregátov (zvýšenie kritickej micelárnej koncentrácie) prídavkom niekoľkých percent acetonitrilu za následok zlepšenie enantioselektivity i separačnej účinnosti¹⁴⁵. Pri použití napr. proteínových chirálnych selektorov môže prídavok organického aditíva spôsobiť zmenu konformácie a tým negatívne ovplyvniť enantioseparáciu. K ovplyvneniu interakčného mechanizmu prispieva i zmena polarít základného elektrolytu (pokles hydrofóbných interakcií). Vplyv prídavku organických rozpúšťadiel sa odráža i v zmene viskozity základného elektrolytu a zeta potenciálu (pokles elektroosmotického toku). Vzhľadom ku komplexnosti zmien, výsledný efekt vplyvu organických rozpúšťadiel na chirálne rozlíšenie je podstatný a musí byť experimentálne optimalizovaný.

Podobne i tenzidy pridané do základného elektrolytu významne modifikujú selektivitu systému. Svojimi nepolárnymi časťami molekúl interagujú napr. s kavitou cyklodextrínov a súťažia s analytmi o jej väzbové miesta^{130,146}. Pravdepodobne i polárne časti tenzidov interagujú s hydrofilným povrchom cyklodextrínov čo sa môže odrážať v modifikácii stereoselektívnych interakcií na vstupných otvoroch kavity. Tenzidy sa sorbujú na steny kapiláry a ovplyvňujú veľkosť a smer (katiónové tenzidy) elektroosmotického toku¹⁴⁷.

3.1.4. Vplyv pracovných parametrov – voľba kapiláry, aplikovaného napätia a teploty

Výber pokrytej či nepokrytej kapiláry je daný látkami, ktoré majú byť analyzované a použitými chirálnymi selektorami (využitie, alebo potlačenie elektroosmotického toku, potlačenie sorbie). Všeobecne s poklesom vnútorného priemeru kapiláry a vzrastom dĺžky kapiláry sa zlepšuje chirálne rozlíšenie⁵⁹ – vďaka lepšej disipácii generovaného Joulovho tepla a predĺženiu separačnej dráhy. Nevýhodou predĺženia kapiláry je nárast času, ktorý je potrebný k analýze. Nižšie priemery kapilár vedú k poklesu citlivosti detekcie.

Intenzita elektrického poľa je pracovný parameter, ktorý musí byť opatrne optimalizovaný¹⁴⁸. Je potrebné nájsť kompromis medzi elektrickou silou udeľujúcou rýchlosť danému analytu a chemickou asociačnou silou (afinitou) vznikajúceho asociátu (v prípade cyklodextrínu inklúzneho komplexu), ktorá umožňuje chirálnu diskrimináciu. S narastajúcou hodnotou aplikovaného napätia narastá účinnosť systému (N) a rýchlosť analýzy, avšak klesá hodnota rovnovážnej asociačnej konštanty inklúzneho komplexu (vplyvom generovaného Joulovho tepla a posunom chemickej rovnováhy).

Zmeny v teplote separačného systému vedú k rozdielnym efektom na výsledné chirálne rozlíšenie. S narastajúcou teplotou klesá viskozita základného elektrolytu (zvyšuje sa efektívna pohyblivosť a difúzia separandov), narastá rýchlosť elektroosmotického toku (klesá účinná separačná dráha). Pri použití cyklodextrínov klesá asociačná rovnovážna konštanta vznikajúcich inklúzných komplexov (exotermný charakter vlastnej komplexácie). Všeobecne s nárastom teploty dochádza k poklesu selektivity systému^{60,65}, a tým i výsledného chirálneho rozlíšenia. Niektoré chirálne selektory (napr. makrocyclické antibiotiká) sú navyše pri vyšších teplotách nestabilné.

Z kinetického hľadiska môže byť výhodné také experimentálne usporiadanie, kde chirálny selektor a jednotlivé enantioméry migrujú oproti sebe. Pokiaľ chirálny selektor absorbuje pri vlnovej dĺžke, ktorá je potrebná k detekcii analytov (napr. vankomycín^{20,22}), je možné si vypomôcť napr. iba čiastočným naplnením kapiláry chirálnym selektorom¹⁴⁹.

3.2. Modely a postupy chirálnych separácií pomocou cyklodextrínov

Vzhľadom k tomu, že cyklodextríny v 80. rokoch takmer úplne ovládli pole chirálnych separácií, je väčšina modelov a postupov chirálnych separácií demonštrovaná prostredníctvom použitia cyklodextrínov ako chirálnych selektorov. Následujúce príklady majú iba ilustrovať prístupy k optimalizácii (resp. hľadaniu najlepších podmienok) enantioseparácie a nekladú si nárok na to, aby podali vyčerpávajúci prehľad. Skutočnosťou ale stále ostáva, že zatiaľ žiadny z nich nedokáže predpovedať podmienky, za ktorých dôjde k najlepšej separácii daného páru enantiomérov. Tieto podmienky musia byť doposiaľ stanovované empiricky.

Wrenov model optimálnej koncentrácie chirálneho selektora¹⁵⁰⁻¹⁵⁴ vychádza z predstavy, že meraná efektívna elektroforetická pohyblivosť je vektorovým súčtom pohyblivostí voľného a v komplexe viazaného enantioméru. Obidve elektroforetické pohyblivosti sú determinované afinitou k chirálnemu selektoru a jeho koncentráciou. Pre rozdiel v efektívnych pohyblivostiach jednotlivých enantiomérov $\Delta\mu$ bola odvodená rovnica (2) (cit¹⁵) z ktorej môže byť vypočítaná optimálna koncentrácia chirálneho selektora poskytujúca najlepšie rozlíšenie.

$$\Delta\mu = \frac{[C]\{K_1(\mu_1 - \mu_0) - K_2(\mu_2 - \mu_0) + K_1K_2[C](\mu_1 - \mu_2)\}}{(1 + K_1[C])(1 + K_2[C])} \quad (2)$$

V rovnici (2) reprezentuje μ_0 elektroforetické pohyblivosti voľných (nevyviazaných) enantiomérov, μ_1 a μ_2 limitné elektroforetické pohyblivosti oboch enantiomérov – cyklodextrínových komplexov (ktoré môžu, ale nemusia byť rozdielne), K_1 a K_2 ich asociačné rovnovážne konštanty, C koncentráciu cyklodextrínu. Pomocou tohoto modelu sa dajú veľmi dobre popísať i inverzie v pohyblivostiach jednotlivých enantiomérov pozorované s narastajúcou zmenou koncentrácie chirálneho selektora.

Modely navrhnuté Vighom a spolupracovníkmi¹⁵⁶⁻¹⁶⁰ korelujú vplyvy koncentrácie cyklodextrínu a pH (zmena disociácie slabých elektrolytov a konštant stability inklúzných komplexov) spolu so zložením základného elektrolytu¹⁶¹ (vplyv elektromigračnej disperzie) na efektívnu pohyblivosť voľných i inkludovaných enantiomérov slabých elektrolytov, separačnú selektivitu a symetriu pík. Snahou tohoto modelu je nájsť sledom zmien jednotlivých experimentálnych parametrov (pH, koncentrácie cyklodextrínu a koncentrácie ko-iónu) tzv. modelové parametre (iónovú pohyblivosť enantioméru a komplexu enantiomér–cyklodextrín, spolu s hodnotami ich disociačných konštant), ktorých dosadením do odvodených rovníc môžu byť stanovené tzv. povrchové profily pohyblivosti, separačného faktoru či rozlíšenia. Modelové parametre sa experimentálne stanovujú tromi setmi meraní – meraním zmien

pohyblivostí analytu na zmene pH (bez prídavku cyklodextrínu v základnom elektrolyte) a na zmene koncentrácií cyklodextrínu pri vysokej a nízkej hodnote pH základného elektrolytu.

Technika cyklodextrínového setu analýzy chirálnych látok^{162,163} navrhnutá Guttmanom popisuje rýchly vývoj metódy enancioseparácie slabých elektrolytov. Vychádza z predstavy, že úspech chirálnej separácie (enancioselektivita) závisí najmä na hodnote pH použitého základného elektrolytu, koncentracii a type vhodného chirálneho selektoru. Je založená na vykonaní sady experimentov s vybraným setom štyroch cyklodextrínov (β - a γ -cyklodextrín, hydroxypropyl- β -cyklodextrín a dimetyl- β -cyklodextrín) pri dvoch hodnotách pH základného elektrolytu (2,5 a 8,0).

Uvedené príklady ukazujú, že vytvorenie si predstavy o konkrétnom enancioselektívnom separačnom systéme pre rozseparovanie požadovaných enanciomérov nie je jednoduché. Tiež ďalšie prístupy, ako sú napr. modelovanie interakcií medzi chirálnym selektorom a analytom^{164–166} či stanovovanie konštanty stability¹⁶⁷ takéhoto asociátu, sú omedzené iba na konkrétny systém s daným základným elektrolytom (v prípade modelovania sa dokonca na vplyv pufru úplne zabúda) a nedajú sa jednoducho zovšeobecniť. Preto zatiaľ najlepšou cestou k úspešnému rozdeleniu daného páru enanciomérov ostáva skúsenosť experimentátora spolu s informáciami o enancioseparáciách podobných látok získaných z literatúry.

Tato práca bola podporená grantami MŠMT ČR VŠ 96021, MSM 153100013 a GA UK 9/1998/B CH/PřF.

LITERATÚRA

- Snopek J., Jelínek I., Smolková-Keulemansová E.: *J. Chromatogr.* 452, 571 (1988).
- Snopek J., Smolková-Keulemansová E., v knihe: *New Trends in Cyclodextrins and Derivatives* (Duchene D., ed.), str. 483. Edition Sante, Paris 1991.
- Fanali S., v knihe: *Capillary Electrophoresis Technology* (Guzman N. A., ed.), str. 731. Marcel Dekker, New York 1993.
- Kuhn R., Hoffstetter-Kuhn S.: *Chromatographia* 34, 505 (1992).
- Snopek J., Jelínek I., Smolková-Keulemansová E.: *J. Chromatogr.* 603, 235 (1992).
- Valko I. E., Billiet H. A. H., Corstjens H. A. L., Frank J.: *LC-GC Int.* 6, 420 (1993).
- Otsuka K., Terabe S.: *Trends Anal. Chem.* 12, 125 (1993).
- Fanali S., Cristalli M., Vespalec R., Boček P., v knihe: *Advances in Electrophoresis* (Chrambach A., Dunn M. J., Radola B. J., ed.), sv. 7, str. 1. VCH, Weinheim 1994.
- Ward T. J.: *Anal. Chem.* 66, 633A (1994).
- Novotný M., Soini H., Stefansson M.: *Anal. Chem.* 66, 646A (1994).
- Rogan M. M., Altria K. D., Goodall D. M.: *Chirality* 6, 25 (1994).
- Vespalec R., Boček P.: *Electrophoresis* 15, 755 (1994).
- Terabe S., Otsuka K., Nishi N.: *J. Chromatogr.* 666, 295 (1994).
- Schmitt T.: *Separation of Enantiomers in Capillary Electrophoresis*. Thermo Separation Products, Fremont 1995.
- Nishi H., Terabe S.: *J. Chromatogr.* 694, 245 (1995).
- Rogan M. M., Altria K. D.: *Introduction to the Theory and Application of Chiral Capillary Electrophoresis*. Beckman Instruments, Fullerton 1995.
- Nishi H.: *J. Chromatogr. A* 735, 57 (1996).
- Fanali S.: *J. Chromatogr. A* 735, 77 (1996).
- Bressolle F., Audran M., Pham. T. N.: *J. Chromatogr. B* 687, 303 (1996).
- Fanali S.: *An Introduction to Chiral Analysis by Capillary Electrophoresis*. Bio-Rad, Richmond 1996.
- Vespalec R., Boček P.: *Electrophoresis* 18, 843 (1997).
- Ward T. J., Ostwald T. M.: *J. Chromatogr. A* 792, 309 (1997).
- Hage D. S.: *Electrophoresis* 18, 2311 (1997).
- Sutton R. M. C., Sutton K. L., Stalcup A. M.: *Electrophoresis* 18, 2297 (1997).
- Chankvetadze B.: *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*. Willey, New York 1997.
- Verleysen K., Sandra P.: *Electrophoresis* 19, 2798 (1998).
- Tesařová E., Armstrong D. W., v knihe *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences* (Deyl D., Mikšík I., Tagliaro F., Tesařová E., ed.), str. 197. Elsevier, Amsterdam 1998.
- Desiderio C., Fanali S.: *J. Chromatogr. A* 807, 37 (1998).
- Vespalec R., Boček P.: *Electrophoresis* 20, 2579 (1999).
- Fanali S., Aturki Z., Desiderio C.: *Enantiomer* 4, 229 (1999).
- Dalgies C. E.: *J. Chem. Soc.* 47, 3940 (1952).
- Pirkle W. H., Pochapsky T. C.: *Chem. Rev.* 89, 347 (1989).
- Tran A. D., Blanc T., Leopold E.: *J. Chromatogr.* 516, 241 (1990).
- Nishi H., Fukuyama T., Matsuo M.: *J. Microcol. Sep.* 2, 234 (1990).
- Lurie I. S.: *J. Chromatogr.* 605, 269 (1992).
- Schutzner W., Fanali S., Rizzi A., Kenndler E.: *J. Chromatogr.* 639, 375 (1993).
- Snopek J., Jelínek I., Smolková-Keulemansová E.: *J. Chromatogr.* 308, 472 (1989).
- Fanali S., Boček P.: *Electrophoresis* 11, 757 (1990).
- Armstrong D. W., Rundlett K. L., Chen R. J.: *Chirality* 6, 496 (1994).
- Armstrong D. W., Rundlett K., Reid L.: *Anal. Chem.* 66, 1690 (1994).
- Gaspar M. P., Berthod A., Nair U. B., Armstrong D. W.: *Anal. Chem.* 68, 2501 (1996).
- Pena M. S., Zhang Y. L., Wainer I. M.: *Anal. Chem.* 69, 3239 (1997).
- Kuhn R., Stoecklin F., Erni F.: *Chromatographia* 33, 32 (1992).
- Kuhn R., Erni F., Bereuter T., Hauser J.: *Anal. Chem.* 64, 2815 (1992).
- Hohne E., Krauss G. J., Gubitzi G.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 15, 698 (1992).
- Kuhn R., Wagner J., Walbroehl Y., Bereuter T.: *Electrophoresis* 15, 828 (1994).
- Szejtli J.: *Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes*. Academiai Kiado, Budapest 1982.
- Guttman A., Paulus A., Cohen N., Grinberg N., Karger B. L.: *J. Chromatogr.* 448, 41 (1988).

49. Fanali S.: *J. Chromatogr.* 474, 441 (1989).
50. Nardi A., Eliseev E., Boček P., Fanali S.: *J. Chromatogr.* 638, 247 (1993).
51. Aturki Z., Fanali S.: *J. Chromatogr.* 680, 137 (1994).
52. Nishi H., Nakamura K., Nakai H., Sato T.: *J. Chromatogr.* 678, 333 (1994).
53. Ingelse B. A., Everaerts F. M., Desiderio C., Fanali S.: *J. Chromatogr.* 709, 89 (1995).
54. Ingelse B. A., Everaerts F. M., Ševčík J., Stránský Z., Fanali S.: *J. High. Resol. Chromatogr.* 18, 348 (1995).
55. Misyashita Y., Terabe S., v kniže: *Application Data, DS 767*, str. 1. Beckman Instruments, Palo Alto 1990.
56. Terabe S., Ozaki H., Otsuka K., Ando T.: *J. Chromatogr.* 332, 211 (1985).
57. Nishi H., Fukuyama T., Terabe S.: *J. Chromatogr.* 553, 503 (1991).
58. Nielsen M. W. F.: *Anal. Chem.* 65, 885 (1993).
59. Peterson T. E.: *J. Chromatogr.* 630, 353 (1993).
60. Schutzner W., Fanali S.: *Electrophoresis* 13, 687 (1992).
61. Schmitt T., Engelhardt J.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 16, 35 (1993).
62. Ševčík J., Lemr K., Smysl B., Jirovský D., Hradil P.: *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 21, 2473 (1998).
63. Ševčík J., Stránský Z., Ingelse B., Lemr K.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14, 1089 (1996).
64. Sepaniak M. J., Cole R. O., Clark B. K.: *J. Liq. Chromatogr.* 15, 1023 (1992).
65. Kuhn R., Stocklin F., Erni F.: *Chromatographia* 33, 32 (1992).
66. Nardi A., Eliseev A., Boček P., Fanali S.: *J. Chromatogr.* 638, 247 (1993).
67. Nielsen M. W. F.: *J. Chromatogr.* 637, 81 (1993).
68. Neubert R. H. H., Schwartz M. A., Mrestani Y., Platzer M., Raith K.: *Pharmaceut. Res.* 16, 1663 (1999).
69. Birnbaum S., Nilsson S.: *Anal. Chem.* 64, 2872 (1992).
70. Sun P., Barker G. E., Hartwick R. A., Grinberg N., Kaliszán R.: *J. Chromatogr.* 652, 247 (1993).
71. Sun P., Wu N., Barker G., Hartwick R. A.: *J. Chromatogr.* 648, 475 (1993).
72. Barker G. E., Russo P., Hartwick R. A.: *Anal. Chem.* 64, 3024 (1992).
73. Vespalec R., Šustáček V., Boček P.: *J. Chromatogr.* 638, 255 (1993).
74. Valtcheva L., Mohammad J., Petterson G., Hjerten S.: *J. Chromatogr.* 638, 263 (1993).
75. Tanaka Y., Matsubara N., Terabe S.: *Electrophoresis* 15, 848 (1994).
76. Busch S., Kraak J. C., Poppe H.: *J. Chromatogr.* 635, 119 (1993).
77. D'Hulst A., Verbeke N.: *J. Chromatogr.* 608, 275 (1992).
78. Sun P., Wu N., Barker G. E., Hartwick R. A.: *J. Chromatogr.* 648, 475 (1993).
79. Jung M., Bornsen K. O., Francotte E.: *Electrophoresis* 17, 130 (1996).
80. Nishi H.: *J. Chromatogr. A* 735, 345 (1996).
81. Nishi H., Nakamura K., Nakai H., Sato T.: *Anal. Chem.* 67, 2334 (1995).
82. Long Z., Ohta T., Nakamura H.: *Anal. Sci.* 11, 663 (1995).
83. Armstrong D. W., Rundlett K. L., Chen R. J.: *Chirality* 6, 496 (1994).
84. Vespalec R., Corstjen H., Billiet H. A. H., Frank J., Luyben K. A. Ch. M.: *Anal. Chem.* 67, 3223 (1995).
85. Vespalec R., Billiet H. A. H., Frank J., Luyben K. C. A. M.: *J. High. Resolut. Chrom.* 19, 137 (1996).
86. Chankvetadze B., Endresz G., Blaschke G.: *Electrophoresis* 15, 804 (1994).
87. Rundlett K. L., Gasper M. P., Zhou E. Y., Armstrong D. W.: *Chirality* 8, 88 (1996).
88. Armstrong D. W., Gasper M. P., Rundlett K. L.: *J. Chromatogr.* 689, 285 (1995).
89. Cruzado I., Vigh G.: *J. Chromatogr.* 608, 421 (1992).
90. Birnbaum S., Nilsson S.: *Anal. Chem.* 64, 2872 (1992).
91. Li S., Lloyd D. K.: *J. Chromatogr.* 666, 321 (1994).
92. Li S., Lloyd D. K.: *Anal. Chem.* 65, 3684 (1993).
93. Mayer S., Schurig V.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 15, 129 (1992).
94. Armstrong D. W., Tang Y., Ward T., Nichols M.: *Anal. Chem.* 65, 1114 (1993).
95. Mayer S., Schurig V.: *J. Liq. Chromatogr.* 16, 915 (1993).
96. Meyer S., Schurig V.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 15, 129 (1992).
97. Peters E. C., Petro M., Svec F., Freché J. M. S.: *Anal. Chem.* 70, 2288 (1998).
98. Foret F., Fanali S., Osscini L., Boček P.: *J. Microcol. Sep.* 1, 190 (1990).
99. Schmid M.G., Gübitz G.: *Enantiomer* 1, 3 (1996).
100. Gassmann E., Kuo J. E., Zare R. N.: *Science* 230, 813 (1985).
101. Fanali S., Osscini L., Foret F., Boček P.: *J. Microcol. Sep.* 1, 190 (1989).
102. Gozel P., Gassmann E., Michelsen H., Zare R. N.: *Anal. Chem.* 59, 44 (1987).
103. Cohen A. S., Paulus A., Karger B. L.: *Chromatographia* 24, 15 (1987).
104. Mosher R. A.: *Electrophoresis* 11, 765 (1990).
105. Desiderio C., Aturki Z., Fanali S.: *Electrophoresis* 15, 864 (1994).
106. Snopek J., Jelínek I., Smolková-Keulemansová E.: *J. Chromatogr.* 438, 211 (1988).
107. Dobashi A., Ono T., Hara S., Jamaguchi J.: *Anal. Chem.* 61, 1984 (1989).
108. Armstrong D. W., Nair U. B.: *Electrophoresis* 18, 2331 (1997).
109. Ingelse B. A., Reijenga J. C., Classens H. A., Everaerts F. M., Flieger M.: *J. High. Resolut. Chromatogr.* 19, 225 (1996).
110. Sinibaldi M., Vinci M., Federici F., Flieger M.: *Biomed. Chromatogr.* 11, 307 (1997).
111. Stalcup A. M., Gahm K. H.: *J. Microcol. Sep.* 8, 145 (1996).
112. Sun P., Landman A., Hartwick R. A.: *J. Microcol. Sep.* 6, 403 (1994).
113. Terabe S., Shibata M., Miyashita Y.: *J. Chromatogr.* 480, 403 (1989).
114. Nishi H., Fukuyama T., Matsuo M., Terabe S.: *J. Microcol. Sep.* 1, 234 (1989).
115. Nishi H., Fukuyama T., Matsuo M., Terabe S.: *Anal. Chim. Acta* 236, 281 (1990).
116. Cole R. O., Sepaniak M. J., Hinze W. L.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 13, 579 (1990).
117. Nishi H., Fukuyama T., Matsuo M., Terabe S.: *J. Chromatogr.* 515, 233 (1990).

118. Dobashi A., Ono T., Hara S., Jamaguchi J.: *J. Chromatogr.* **480**, 413 (1989).
119. Otsuka K., Kashihara M., Kawaguchi R., Koike R., Hisamitsu T., Terabe S.: *J. Chromatogr.* **652**, 253 (1993).
120. Otsuka K., Terabe S.: *Electrophoresis* **11**, 982 (1990).
121. Otsuka K., Kawahara J., Tatekawa K., Terabe S.: *J. Chromatogr.* **559**, 209 (1991).
122. Mazzeo J. R., Grover E. R., Swartz M. E., Petersen J. S.: *J. Chromatogr.* **680**, 125 (1994).
123. Tickle D. C., Okafo G. N., Camilleri P., Jones R. F. D., Kirby A. J.: *Anal. Chem.* **66**, 4121 (1994).
124. Otsuka K., Terabe S.: *J. Chromatogr.* **515**, 221 (1990).
125. Ishihama Y., Terabe S.: *J. Liq. Chromatogr.* **16**, 933 (1990).
126. Ueda T., Kitamura F., Mitchell R., Metcalf R., Kuwana T., Nakamoto A.: *Anal. Chem.* **63**, 2979 (1991).
127. Ueda T., Mitchell R., Kitamura F., Metcalf T., Kuwana T., Nakamoto A.: *J. Chromatogr.* **593**, 265 (1992).
128. Nishi H., Fukuyama T., Terabe S.: *J. Chromatogr.* **553**, 503 (1991).
129. Ševčík J., Lemr K., Stránský Z., Večeřa T., Hlaváč J.: *Chirality* **9**, 162 (1997).
130. Soini H., Riekkola M. L., Novotný M.: *J. Chromatogr.* **608**, 265 (1992).
131. Okafo G. N., Bintz C., Clarke S. E., Camilleri P.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 1189.
132. Okafo G. N., Camilleri P.: *J. Microcol. Sep.* **5**, 149 (1993).
133. Terabe S., Miyashita Y., Ishihama Y., Shibata O.: *J. Chromatogr.* **636**, 47 (1993).
134. Aiken J. H., Huie C. W.: *Chromatographia* **35**, 448 (1993).
135. Sun P., Barker G. E., Mariano G. J., Hartwick R. A.: *Electrophoresis* **15**, 793 (1994).
136. Terabe S., Yashima T., Tanaka N., Araki M.: *Anal. Chem.* **60**, 1673 (1988).
137. Foret F., Boček P.: *Electrophoresis* **11**, 661 (1990).
138. Altria K. D., Clark B. J., Filbey S. D., Kelly M. A., Rudd D. R.: *Electrophoresis* **16**, 2143 (1995).
139. Rogan M. M., Altria K. D., Goodal D. M.: *Chromatographia* **38**, 723 (1994).
140. Fanali S., Aturki Z.: *J. Chromatogr.* **694**, 297 (1995).
141. Altria K. D., Goodal D. M., Rogan M. M.: *Chromatographia* **34**, 19 (1992).
142. Quang C., Khaledi M. G.: *Anal. Chem.* **65**, 3354 (1993).
143. Jelínek I., Snopek J., Smolková-Keulemansová E.: *J. Chromatogr.* **557**, 215 (1991).
144. Fanali S.: *J. Chromatogr.* **545**, 437 (1991).
145. Wan H., Blomberg L.G.: *Electrophoresis* **18**, 943 (1997).
146. Gilar M., Uhrová M., Tesařová E.: *J. Chromatogr. B* **681**, 133 (1996).
147. Schmitt T., Engelhardt. J.: *J. Chromatogr.* **697**, 561 (1995).
148. Guttman A., Cooke N.: *J. Chromatogr.* **680**, 157 (1994).
149. Ward T. J.: *LC-GC Int.* **9**, 428 (1996).
150. Wren S. A. C., Rowe R. C.: *J. Chromatogr.* **603**, 235 (1992).
151. Wren S. A. C., Rowe R. C.: *J. Chromatogr.* **609**, 363 (1992).
152. Wren S. A. C., Rowe R. C.: *J. Chromatogr.* **635**, 113 (1993).
153. Wren S. A. C.: *J. Chromatogr.* **636**, 57 (1993).
154. Wren S. A. C., Rowe R. C., Payne R.: *Electrophoresis*, **15**, 774 (1994).
155. Wren S. A. C.: *Electrophoresis* **16**, 2127 (1995).
156. Rawjee Y. Y., Staerk D. U., Vigh G.: *J. Chromatogr.* **635**, 291 (1993).
157. Rawjee Y. Y., Williams R. L., Vigh G.: *J. Chromatogr.* **652**, 233 (1993).
158. Rawjee Y. Y., Vigh G.: *Anal. Chem.* **66**, 619 (1994).
159. Rawjee Y. Y., Williams R. L., Vigh G.: *J. Chromatogr.* **680**, 599 (1994).
160. Rawjee Y. Y., Williams R. L., Buckingham L. A., Vigh G.: *J. Chromatogr.* **688**, 273 (1994).
161. Rawjee Y. Y., Williams R. L., Vigh G.: *Anal. Chem.* **66**, 3777 (1994).
162. Guttman A.: *Electrophoresis* **16**, 1900 (1995).
163. Guttman A.: *LC-GC Int.* **9**, 88 (1996).
164. Alvira E., Garcia J. I., Mayoral J. A.: *Chem. Phys.* **240**, 101 (1999).
165. Chankvetadze B., Blaschke G.: *Electrophoresis*, **20**, 2592 (1999).
166. Gasper M. P., Berthod A., Nair U., Armstrong D. W.: *Anal. Chem.* **68**, 2501 (1996).
167. Rundlett K. L., Armstrong D. W.: *Electrophoresis* **18**, 2194 (1997).

J. Ševčík^{a,b}, E. Tesařová^c, and Z. Stránský^{a,b} (^a*Department of Analytical Chemistry, Palacký University, Olomouc*, ^b*Laboratory of Bioanalytical Research, Palacký University, Olomouc*, ^c*Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **Separation of Chiral Compounds by Capillary Electrophoresis**

The article gives an overview of the state of the art of capillary electrophoresis in the field of chiral separations. The review covers basic principles of separation of enantiomers by electromigration methods. Various separation modes, various chiral selectors, and separation mechanisms responsible for chiral recognition are shown. Factors affecting the resolution, such as concentration of chiral selector(s), electrolyte composition, its concentration, pH, ionic strength, and addition of organic modifiers, are discussed. Possibilities to use mathematical or semiempirical approaches for optimization of the separation system are demonstrated on examples of the most frequently used chiral selectors – cyclodextrins.