Analiza kiralnih lijekova kapilarnom elektroforezom

Sertić, Miranda; Nigović, Biljana; Jug, Mario

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2010, 66, 467 - 476**

Journal article, Published version
Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:396520

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

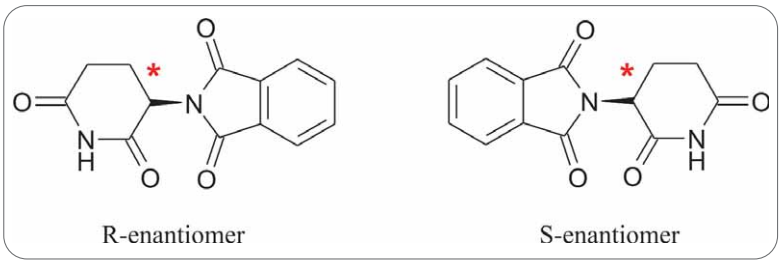
Analiza kiralnih lijekova kapilarnom elektroforezom

MIRANDA SERTIĆ, BILJANA NIGOVIĆ, MARIO JUG
Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

KIRALNI LIJEKOVI

Najpoznatiji primjer kiralnog lijeka je talidomid. Nakon *Talidomidske katastrofe* 60-tih godina prošloga stoljeća velika se pozornost počela posvećivati, kako nuspojavama lijekova i primjeni lijekova u trudnoći, tako i enantiomernoj čistoći lijeka. Talidomid je bio propisivan tisućama trudnica kao bezopasan sedativ za ublažavanje jutarnjih mučnina od kraja 1950-tih. Nažalost, tek je 1961. australski ginekolog McBride povezao primjenu talidomida i poremećenog ili potpunog nedostatka razvoja ekstremiteta, povećanu učestalost malformacija srca, urinarnog trakta i drugih organa.. Rođeno je više od 10 000 deformirane djece širom svijeta (1).

Nakon toga je utvrđeno da je zapravo teratogen samo S-enantiomer talidomida, dok je R-enantiomer djelotvoran sedativ, siguran za primjenu. Naime, talidomid je kiralna molekula, ima asimetričan ugljik na koji su vezana četiri različita supstituenta usmjerena u vrhove tetraedra. Molekule koje se odnose kao predmet i zrcalna slika nazivaju se enantiomerima. Na slici 1. prikazani su R- i S-enantiomeri talidomida.



Slika 1. R- i S-enantiomer talidomida

Enantiomeri imaju ista fizikalna i kemijska svojstva u akiralnom okruženju, osim što zakreću ravninu polarizacije svjetlosti valne duljine D-linije natrijeva spektra (λ = 589,3 nm) u suprotnom smjeru. No, u kiralnoj sredini, kakva je i ljudski organizam, enantiomeri pokazuju drukčije kemijske i farmakološke učinke. R i S enantiomer mogu se razlikovati u bioraspoloživosti, metabolizmu, izlučivanju, selektivnosti za receptore, enzime i

proteine uključene u prijenos i metabolizam, zatim u farmakološkoj učinkovitosti te toksičnosti (2). Ako se koristi samo jedan enantiomer jednostavnije je pratiti farmakokinetiku lijeka, terapijske indikacije, farmakološki profil, a smanjene su i interakcije između lijekova. Vrlo je često samo jedan od enantiomera nositelj farmakološke aktivnosti, dok je drugi inaktivan ili čak može uzrokovati neželjene nuspojave. Korištenje enantiomerno čistog lijeka omogućuje primjenu manje doze lijeka, smanjena je toksičnost i jednostavnije je praćenje djelovanja lijeka. Stoga danas priprava enantiomerno čistih spojeva dobiva na sve većoj važnosti u farmaceutskoj industriji (3). Postoje također slučajevi gdje je za terapijski učinak potrebna upravo racemična smjesa, a primjena samo jednog enantiomera ne mora biti učinkovita ili sigurna za primjenu. No, to se utvrđuje odgovarajućim kliničkim studijama.

Američka agencija za hranu i lijekove (*Food and Drug Administration*, FDA) 1997. godine donijela je stajalište da je enantiomerno čisti lijek potpuno novi lijek, čak i u slučaju da je na tržištu već postojao kao racemat. Sada je preko 50% lijekova prisutnih na tržištu kiralne strukture, a otprilike polovica kiralnih lijekova na tržištu su čisti enantiomeri (4). No, bilježi se trajan rast proizvodnje i upotrebe čistih enantiomera u svijetu. Dva su osnovna načina dobivanja enantiomerno čistih lijekova. Prvi je kiralna rezolucija – razdvajanje i izolacija enantiomera iz racemične smjese. Tu je tehniku već Luis Pasteur sredinom 19. stoljeća znao primijeniti za razdvajanje enantiomera vinske kiseline. Drugi način dobivanja enantiomerno čistoga lijeka je asimetrična sinteza primjenom različitih tehnika. Mogu se rabiti kiralne početne sirovine, kiralna kataliza ili u novije vrijeme enantioselektivni enzimi (biokataliza).

U skladu sa svim navedenim, postoji sve veća potreba za razvojem novih analitičkih metoda koje mogu razdvojiti, identificirati i odrediti sadržaj pojedinog enantiomera u ljekovitom obliku. Prema smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (*International Conference on Harmonization*, ICH) specifikacija lijekova treba sadržavati točan način određivanja enantiomernog sastava, te je potrebno određivanje enantiomerne čistoće kiralnih lijekova. Svi bi kiralni lijekovi također trebali imati kliničko ispitivanje za svaki enantiomer. Posebne monografije za racemat i za svaki enantiomer nalaze se za pojedine lijekove već u 4. izdanju Europske farmakopeje, dok u 6. izdanju postoji čitav niz lijekova sa zasebnim monografijama (mliječna kiselina, kamfor, metionin, metotreksat) (5,6).

ANALIZA KIRALNIH LIJEKOVA

Najčešće tehnike za analizu enantiomera su polarimetrija, cirkularni dikroizam, rendgenska difrakcija (kristalografija) te kiralna kromatografija. Polarimetrijom se određuje kut i smjer zakretanja ravnine polarizacije svjetlosti valne duljine D-linije natrijeva spektra (λ = 589,3 nm) te specifično optičko zakretanje. Cirkularnim dikroizmom omogućuje se detekcija i kvantitativno određivanje kiralnih spojeva. Tehnika ima široku primjenu u analitici lijekova za određivanje optičke čistoće lijekova, kao i za određivanje sekundarne strukture proteinskih lijekova, konformacijsku analizu nukleinskih kiselina te proučavanje interakcija lijekova s proteinima. Polarimetrija i cirkularni dikroizam rabe se za

identifikaciju enantiomera kao i za određivanje optičke čistoće kiralnih lijekova. Rendgenskom strukturnom analizom određuje se trodimenzionalna struktura molekule difrakcijom rendgenskih zraka na monokristalu, dajući uvid u vrstu i prostorni raspored atoma, duljine i vrste kemijskih veza, te konfiguraciju i konformaciju molekule, čime se postiže nedvojbena identifikacija određenog enantiomera (3).

Za ispitivanje enantiomerne čistoće prvenstveno se primjenjuju separacijske metode poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), plinske kromatografije (GC) i kapilarne elektroforeze (CE). Separacijskim se tehnikama može točno odrediti sadržaj pojedinog enantiomera iz površine njihovih odijeljenih pikova, ali samo uz upotrebu standarda čistih enantiomera. Na uobičajenim se kolonama enantiomeri ne mogu odijeliti, jer imaju ista fizikalno-kemijska svojstva. Stoga se rabe kemijski modificirane kolone s kiralnom stacionarnom fazom. Enantiomeri s kiralnim selektorom na stacionarnoj fazi stvaraju različite nekovalentne interakcije, pa se različito zadržavaju na koloni, što omogućava njihovo razdvajanje.

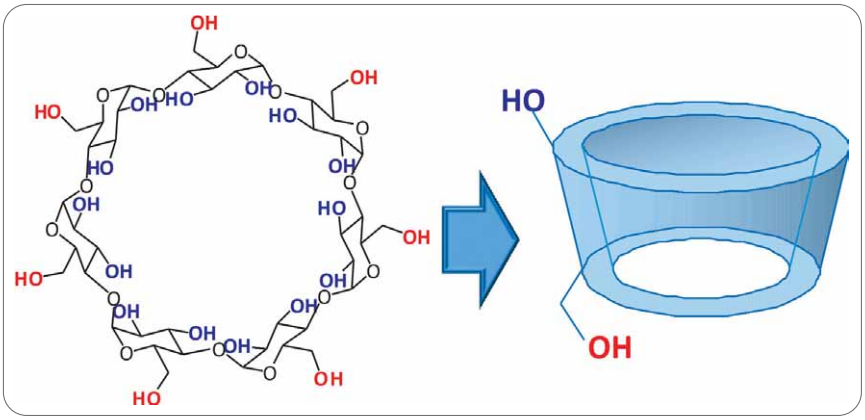
ANALIZA KIRALNIH LIJEKOVA KAPILARNOM ELEKTROFOREZOM

Kapilarna je elektroforeza (7) vrlo prikladna i jeftina tehnika za analizu kiralnih lijekova (8). Tehnika ima niz prednosti, poput jednostavnosti, kratkog vremena analize, visoke učinkovitosti, različitih mehanizama razdvajanja što omogućuje analizu svih vrsta analita te potrebne vrlo male količine uzoraka i otapala. S druge strane, glavni nedostaci tehnike su slabija preciznost (uslijed promjena u elektroosmotskom toku) i slabija osjetljivost. Pri analizi kiralnih lijekova problem je i cijena standarada čistih enantiomera, ali to je nedostatak i pri analizi HPLC tehnikom.

Nije potrebno nabavljati posebne kiralne kolone, već se enantiomeri u kapilarnoj elektroforezi mogu razdvojiti dodatkom kiralnog selektora u otopinu pufera. Ako enantiomeri stupaju u različite interakcije s dodanim kiralnim selektorom, razdvajanje će biti moguće. Postoji niz kapilarno elektroforetskih metoda za razdvajanje enantiomera, provjeru enantiomerne čistoće ili ispitivanje njihove stabilnosti. Kiralne kapilarno elektroforetske metode nalaze se i u farmakopejama. Primjerice u Američkoj farmakopeji (USP) postoji metoda za adrenalin bitartrat, dok se u Europskoj farmakopeji za provjeru enantiomerne čistoće ropivakaina rabi kapilarna elektroforeza. Najčešće upotrebljavani aditivi za razdvajanje enantiomera u kapilarnoj elektroforezi su ciklodekstrini zbog svoje komercijalne dostupnosti, niske cijene i UV-propusnosti (9–12).

Ciklodekstrini (CD) su ciklički oligosaharidi, sastavljeni od jedinica D-glukoze povezanih α(1,4)-glikozidnom vezom. Ovisno o broju glukopiranoznih jedinica, razlikujemo α-CD (6 glukoznih jedinica), β-CD (7 glukoznih jedinica), γ-CD (8 glukoznih jedinica). Ciklodekstrini s većim brojem glukopiranoznih jedinica ne koriste se u farmaceutskoj industriji, dok oni s pet ili manje glukopiranoznih jedinica ne mogu niti nastati zbog steričkih razloga. Dobivaju se iz škroba enzimskom razgradnjom. Razgradnjom pomoću enzima ciklodekstringlukoziltransferaze se dobiva smjesa α-, β-, γ-CD. Kontrolom uvjeta i sastava reakcijskog medija, moguće je usmjeriti sintezu prema jednom od derivata.

Ciklodekstrini imaju oblik krnjeg stošca s centralnom šupljinom (slika 2). Šupljina je hidrofobna, dok je vanjski dio molekule hidrofilan što omogućuje dobru topljivost ciklodekstrina u vodi. Lipofilni karakter šupljine omogućuje stvaranje inkluzijskih kompleksa s hidrofobnim molekulama (molekularno inkapsuliranje).



Slika 2. Shematski prikaz strukture β-ciklodekstrina.
Primarne hidroksilne skupine označene su crvenom, a sekundarne plavom bojom

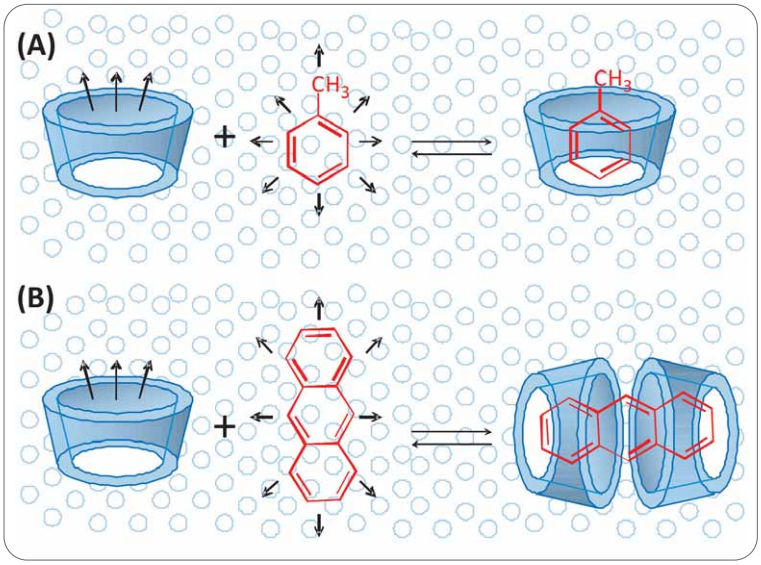
Sada postoji i čitav niz derivata ciklodekstrina dobivenih kemijskom modifikacijom. Većina komercijalno dostupnih derivata je nasumično supstituirana, pa je najčešće riječ o smjesi različitih izomera (utječe na robusnost metode). No, sada postoje i kemijski čisti izomeri, koji su naravno skuplji.

Ciklodekstrini se primjenjuju u modifikaciji fizikalnih svojstava lijekova, primjerice za fiksaciju aroma i lakohlapljivih tvari, prevođenje tekućina i plinova u krutine, modifikaciju neugodnih okusa i mirisa, poboljšanje stabilnosti te izbjegavanja interakcija (13,14). Upotreba ciklodekstrina u terapijskim sustavima kontroliranog oslobađanja ljekovite tvari također je detaljno opisana (15).

Osim u tehnologiji, ciklodekstrini imaju značajno mjesto i u farmaceutskoj analitici, posebice za analizu kiralnih lijekova. Naime, upravo zbog mogućnosti da stvaraju komplekse s molekulom lijeka, pri čemu se mijenjaju fizikalna i kemijska svojstva, poput topljivosti, kemijske reaktivnosti, spektroskopskih i elektrokemijskih svojstava, ciklodekstrini se koriste u brojnim analitičkim tehnikama (kromatografija, elektroforeza, spektroskopija, elektrokemija i analitički senzori).

Zbog velikog broja dostupnih ciklodekstrina, moguće je osigurati selektivnost i optimirati metodu za razdvajanje nabijenih i neutralnih enantiomera. Inkluzijski kompleksi nastaju uklapanjem lipofilne molekule, ili češće samo dijela molekule u centralnu šupljinu ciklodekstrina (slika 3A), pri čemu se oslobađaju entalpijom bogate molekule vode, što energetski stabilizira sustav. Sekundarno, kompleks se dodatno stabilizira nastajanjem

vodikovih veza ili dipol-dipol veza s hidroksilnim skupinama ili polarnim supstituentima ciklodekstrina. Ako su sami ciklodekstrini nabijeni, dolazi i do ionskih interakcija. Pri tome nastajanje inkluzijskog kompleksa ovisi o geometriji i polarnosti molekule, tj. inkluzijski kompleksi nastat će samo s molekulama ili njihovim dijelovima koji su kompatibilni s veličinom centralne šupljine molekule ciklodekstrina i koji su manje polarnosti u odnosu na vodu. Najčešće nastaju kompleksi molarnog omjera lijek:ciklodekstrin 1:1, a moguće je i nastajanje kompleksa višega reda, u kojima je jedna molekula lijeka ukloplje na u centralne šupljine 2 molekule ciklodekstrina (slika 3B).



Slika 3. Shematski prikaz nastajanja inkluzijskog kompleksa stehiometrije 1:1 (A) i 1:2 (B)

Dodani u otopinu pufera ciklodekstrini stvaraju kompleks s enantiomerima lijeka, a nastali kompleksi putuju brže ili sporije. Ako jedan enantiomer stupa u jače interakcije s ciklodekstrinom od drugoga, doći će do razdvajanja smjese enantiomera lijeka. Budući da su ciklodekstrini kiralne molekule, vezanjem s enantiomerima lijeka nastaju dijastereomerni kompleksi. Nastali kompleksi se razlikuju u konstanti vezanja, naboju i veličini. Razdvajanje enantiomera bit će moguće ako postoji razlika ili u pokretljivosti ili u konstanti nastajanja kompleksa. Ciklodekstrini se ne koriste samo za kiralne analize. Dodatak ciklodekstrina u otopinu pufera može pomoći u razdvajanju dva analita iste elektroforetske pokretljivosti, primjerice cis- i trans-izomera. Naime, zbog svog različitog oblika ovi će analiti stupati u različite interakcije sa ciklodekstrinima te zbog toga putovati različitom brzinom, iako bi zbog iste elektroforetske pokretljivosti koeluirali.

Neki od komercijalno dostupnih ciklodekstrina prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Komercijalno dostupni ciklodekstrini

	Derivat	Supstituent
Nativni ciklodekstrini	α-ciklodekstrin	H
	β-ciklodekstrin	H
	γ-ciklodekstrin	H
Neutralni derivati ciklodekstrina	Metil-α-ciklodekstrin	CH_3
	Metil-β-ciklodekstrin	CH_3
	Heptakis-2,6-dimetil-β-ciklodekstrin	CH_3
	Heptakis-2,3,6-trimetil-β-ciklodekstrin	CH_3
	Hidroksipropil-α-ciklodekstrin	$CH_2CH_2CH_2OH$
	Hidroksipropil-β-ciklodekstrin	$CH_2CH_2CH_2OH$
	Hidroksipropil-γ–ciklodekstrin	$CH_2CH_2CH_2OH$
Negativno nabijeni derivati ciklodekstrina	Karboksimetil-β-ciklodekstrin	CH_2COONa
	Sulfatirani α-ciklodekstrin	SO_3Na
	Sulfatirani β-ciklodekstrin	SO_3Na
	Sulfatirani γ–ciklodekstrin	SO_3Na
	Sulfobutil-β-ciklodekstrin	$CH_2CH_2CH_2CH_2SO_3Na$
	Heptakis-6-sulfo-β-ciklodekstrin	SO_3Na
	Heptakis-(2,3-diacetil-6-sulfo)-β-ciklodekstrin	CH_3CO, SO_3Na
	Heptakis-(2,3-dimetil-6-sulfo)-β-ciklodekstrin	CH_3, SO_3Na
Pozitivno nabijeni derivati ciklodekstrina	2-hidroksi-3-trimetilamoniopropil-β-ciklodekstrin	$CH_2CH(OH)CH_2N(CH_3)_3Cl$
	6-monodeoksi-6-monoamino-β-ciklodekstrin	NH_2

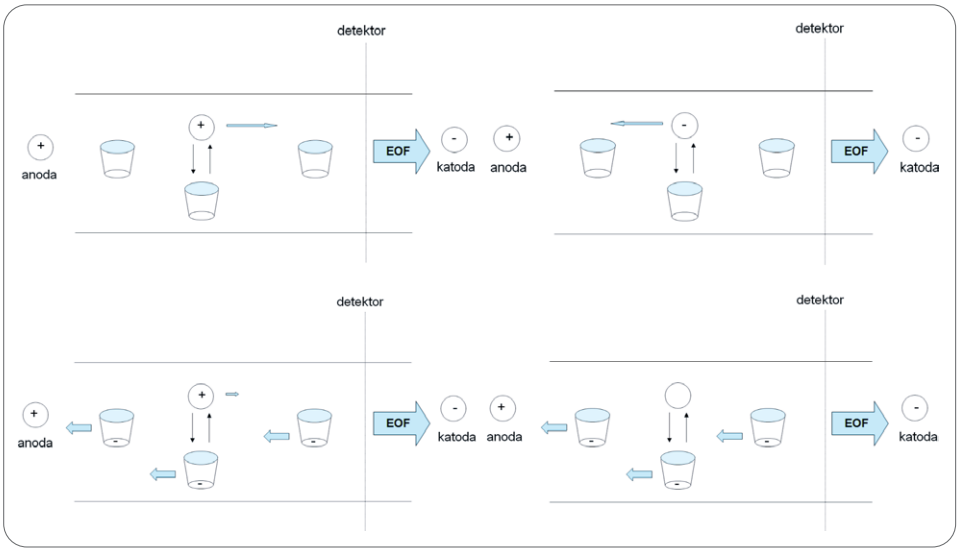
Ciklodekstrini djeluju u kapilarnoj elektroforezi kao pseudostacionarna kromatografska faza. Obzirom na naboj analita i ciklodekstrina mogu se koristiti različiti mehanizmi razdvajanja. Ako je analit bazična molekula koristi se kiseli pH elektrolitske otopine. U kiselom će pH mediju molekule analita biti protonirane i putovati će prema katodi, odnosno detektoru. Neutralni ciklodekstrin ne posjeduje naboj te putuje zajedno s elektroosmotskim tokom. U jako niskom pH elektroosmotski tok je vrlo slab, pa enantiomer koji se jače veže u kompleks s ciklodekstrinom putuje sporije od enantiomera koji stvara slabije komplekse. Osim naboja, na migraciju utječe i činjenica da je promjer kompleksa analita i ciklodekstrina mnogo veći nego promjer slobodnoga enantiomera, zbog čega je elektroforetska pokretljivost kompleksa mnogo manja pa je time i vrijeme migracije puno sporije.

Kiseli se analiti mogu analizirati i u bazičnom mediju. Tada su molekule analita negativno nabijene, pa putuju u suprotnom smjeru, prema anodi, no zahvaljujući snažnom elektroosmotskom toku u bazičnom mediju, analiti ipak putuju do katode i detektora. U tom slučaju brže putuje onaj enantiomer koji se snažnije veže s ciklodekstrinom, jer su

oni nošeni snažnim elektroosmotskim tokom, dok slobodni enantiomer zbog naboja putuje u suprotnom smjeru od detektora.

Nabijeni kiralni selektori i sami imaju elektroforetsku pokretljivost, pa nude mogućnost dodatnih utjecaja na optimizaciju razdvajanja. Također, korištenjem pozitivno ili negativno nabijenih ciklodekstrina moguće je analizirati i neutralne molekule enantiomera.

Negativno nabijeni kiralni selektori u kiselom pH putuju u suprotnom smjeru od detektora, prema anodi. Bazični analiti bi putovali prema katodi. Stoga bi u ovom slučaju do detektora kasnije dolazio enantiomer koji se snažnije veže za ciklodekstrin, jer zbog naboja ciklodekstrina putuje u suprotnom smjeru, prema anodi, no nošeni elektroosmotskim tokom ipak putuju do detektora i katode. Prednost kiralnih selektora koji imaju suprotan naboj od naboja analita je u obrnutoj pokretljivosti, što omogućuje primjenu ciklodekstrina u niskim koncentracijama.



Slika 4. Različiti separacijski mehanizmi u kiralnoj kapilarnoj elektroforezi

Negativno nabijeni ciklodekstrini mogu se koristiti i u lužnatom pH, za razdvajanje neutralnih ili bazičnih analita. U lužnatom pH, bazične molekule elektroosmotski tok nosi prema katodi. Negativno nabijeni kiralni selektori putuju prema anodi, u smjeru suprotnom od detektora pa enantiomer koji se snažnije veže u kompleks s negativno nabijenim ciklodekstrinom izlazi kasnije.

Osim ciklodekstrina postoje i drugi kiralni selektori, ali se rjeđe rabe bilo zbog njihove cijene, dostupnosti, širine primjenjivosti, itd. Makrociklički glikopeptidi, primjerice vankomicin i teikoplanin, se upotrebljavaju za razdvajanje enantiomera kiselih analita.

Za aminokiseline se najčešće rabe ligandi koji stvaraju Cu^{2+}– komplekse s aminokiselinama. Primjenjuju se još i linearni polisaharidi, žučne soli ili aminokiselinski derivati.

Enantioselektivne kapilarnoelektroforetske metode rabe se osim u farmaceutskoj analitici i u industriji kozmetike, hrane i kemikalija te u forenzičke i ekološke svrhe. U farmaceutskoj je analitici najčešća primjena za određivanje stereokemijske čistoće, posebice kada je potrebno odrediti sadržaj u prisutstvu velike količine ostalih stereoizomera. Većina metoda može bez problema detektirati onečišćenja prisutna u količini od 0,1%. Neki primjeri određivanja kiralnih lijekova kapilarnom elektroforezom uz dodatak ciklodekstrina dani su u tablici 2. Osim toga, kiralne kapilarnoelektroforetske metode primjenjuju se i u bioanalitičkim ispitivanjima lijeka i drugih analita u biološkim tekućinama, poput urina ili plazme (tablica 3.)

Tablica 2. Primjeri kiralne kapilarne elektroforeze u analitici lijekova

Lijek	Kiralni selektor	Elektrolit	LOD/napomena
Butorfanol	S-γ-CD (0,02%)	Tris/fosfat pH 2,5	0,05% (+)-enantiomera
Cetirizin	HDAS-β-CD (75 mM)	Trietanolamin/ fosfat pH 2,5	0,87% (S)-enantiomera
Deprenil	HDAS-β-CD (1,5 mg/mL) TM-β-CD (150 mg/mL)	Trietanolamin/ fosfat pH 3,0	0,1% (S)-enantiomera
Escitalopram	β-CD (0,5 mg/mL) S-β-CD (22 mg/mL)	Natrijev fosfat pH 3,0	0,02% (R)-enantiomera
Etomidat	α-CD (30 mg/mL) S-β-CD (4,6 mg/mL)	Kalijev fosfat pH 2,1	0,02% (S)-enantiomera
Fentokonazol	TM-β-CD (20 mM)	Natrijev fosfat pH 3,0	0,02% enantiomer onečišćenja
Galantamin	γ-CD (20 mg/mL)	Natrijev fosfat pH 3,0	0,04% enantiomer onečišćenja
Levofloksacin	HP-β-CD (60 mM)	Natrijev fosfat pH 2,3	10^{-8} M (+)-enantiomer
Melagatran	DM-β-CD (30 mM)	Natrijev fosfat pH 1,8	0,013-0,015% enantiomer onečišćenja
Metildopa	SB-β-CD (3,2 mM)	Natrijev fosfat pH 2,4	0,05% (R)-enantiomera
Metotreksat	HP-β-CD (15 mM)	Natrijev borat pH 9,3	0,12% (L)-enantiomera
Moksifloksacin	S-γ-CD (5%)	Trietilamin/ fosfat pH 2,5	0,03% (R,R)-enantiomera
Rivastigmin	S-β-CD (7 mM)	Natrijev fosfat pH 2,5	0,1% (R)-enantiomera
Ropivakain	DM-β-CD (13,3 mg/mL)	Natrijev fosfat pH 3,0	0,05% (R)-enantiomera
(S)-Timolol	HDMS-β-CD (30 mM)	Mravlja kiselina/MeOH	0,03% (R)-enantiomera

*HDAS-β-CD, heptakis-(2,3)-diacetil-6-sulfo-β-CD; HDMS-β-CD, heptakis-(2,3-dimetil-6-sulfo)-β-CD; S-γ–CD, sulfatirani γ–CD; S-β-CD, sulfatirani β-CD; TM-β-CD, 2,3,6-trimetil-β-CD; DM-β-CD, 2,6-dimetil-β-CD; DM-β-CD, 2,6-dimetil-β-CD; HP-β-CD, hidroksipropil-β-CD; SB-β-CD, sulfobutil-β-CD

Tablica 3. Primjeri određivanja kiralnih lijekova kapilarnom elektroforezom u biološkim uzorcima

Analit	Matriks	Kiralni selektor	Elektrolit
Albendazol sulfoksid	Plazma, slina	S-β-CD (3%)	Tris/fosfat, pH 7,0
Ibuprofen	Plazma	S-β-CD (2%)	Trietanolamin/fosfat, pH 2,6
Levofloksacin	Urin	HP-β-CD (60 mM)	Natrijev fosfat, pH 2,3
Metakvalon	Urin	HP-β-CD (50 mM)	Kalijev fosfat, pH 2,5
Mianserin	Plazma	HP-β-CD (2 mM)	Trietilamin/fosfat, pH 3,0
Terbutalin	Urin	HP-β-CD (10 mM)	Natrijev fosfat, pH 2,5
Vesamikol	Plazma	S-β-CD (128 μM)	Natrijev fosfat, pH 5,0
Varfarin	Plazma	S-β-CD (5%)	Trietilamin/fosfat, pH 2,5

Chiral Drug Analysis by Capillary Electrophoresis

by **M. Sertić, B. Nigović, M. Jug**

Abstract

The importance of enantiomer purity control was perceived in 1960s after the *Thalidomide disaster*. Enantiomers can show different pharmacological efficiency, bioavailability and therapeutic indications. Very often only one enantiomer is active, while the other can have no activity whatsoever, or can even be toxic.

Therefore, methods that enable separation and purity evaluation of enantiomers are very important. Most often used techniques are polarimetry, circular dichroism, roentgen diffraction and chiral chromatography. Separation techniques frequently used are high performance liquid chromatography, gas chromatography and capillary electrophoresis. Capillary electrophoresis is a very fast and cheap technique. The most often used chiral separators in capillary electrophoresis are ciclodextrins. They are cyclic oligosaharyds, composed of α-D-glucopyranoside units bound together in a ring. Topologically cyclodextrins are represented as toroids with the larger and the smaller openings of the toroid exposing to the solvent secondary and primary hydroxyl groups respectively. The exterior of the toroid is hydrophilic making it water soluble, while the interior is relatively hydrophobic. This enables the cyclodextrin to form inclusion complexes with drug molecules. One of the enantiomers forms stronger interactions with cyclodextrin then the other cyclodextrin, which ensures enantiomer separation.

Enantioselective capillary electrophoretic method using cyclodextrins are used in pharmaceutical analysis, cosmetic and food industry, in forensic science and in environmental protection. In pharmaceutical analysis they are used for determination of stereochemical purity, especially when it is necessary to quantify one of the enanitomers in the presence of large quantity of other stereoisomers.

Literatura – References

1. *W. G. Mcbride*, The Lancet **7216** (1961) 1358.
2. *J. McConathy, M. J. Owens*, J. Clin Psychiatry **5** (2003) 70–73.
3. *B. Nigović*, Analitika lijekova, interna skripta FBF. http://www.pharma.hr/Odsjek Kolegij.aspx?mhID=3&mvID=126&id=43, datum pristupa: 12.05.2010.
4. *A. J. Hutt*, CNS Spectrums **7** (2001) 14–22.
5. European Pharmacopoeia 4th ed., Council of Europe, Strasbourg 2002.
6. European Pharmacopoeia 6th ed., Council of Europe, Strasbourg 2007.
7. *M. Damić, B. Nigović*, Farm. Glas. **66** (2010).
8. *B. Chankvetadze*, Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis, John Wiley & Sons, Chichester, 1997.
9. *S. Fanali*, J. Chromatogr. A **875** (2000) 89–122.
10. *U. Schmitt, S. K. Branck, U. Holzgrabe*, J. Sep. Sci. **25** (2002) 959–974.
11. *Z. Juwancz et al.*, Electrophoresis **29** (2008) 1701–1712.
12. *G. K. E. Scriba*, J. Sep. Sci. **31** (2008) 1991–2011.
13. *Z. H. Oi, C. Z. Sikorski*, Pharm. Tech. Eur. **13** (2001) 17–27.
14. *K. H. Froming, J. Szjetli*, Cyclodextrin in pharmacy, Kluwer Academic Publisher, Dordecht, Boston, London 1997.
15. *M. Jug, M. Bećirević-Laćan*, Farm. Glas. **58** (2002).

Primljeno 5. srpnja 2010.