



Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΠΡΟΣΘΕΤΩΝ ΣΤΗΝ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΜΕ ΤΗΝ
ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΥΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΑΡΙΑ ΜΑΥΡΟΥΔΗ

2015



Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΕΡΓΙΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΠΡΟΣΘΕΤΩΝ ΣΤΗΝ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΜΕ ΤΗΝ
ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΥΣ**

ΜΑΡΙΑ ΜΑΥΡΟΥΔΗ

**Διατριβή η οποία υποβλήθηκε προς απόκτηση διδακτορικού
τίτλου σπουδών στο Πανεπιστήμιο Κύπρου**

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2015

ΜΑΡΙΑ ΜΑΥΡΟΥΔΗ

Σελίδα Εγκυρότητας

Υποψήφια Διδάκτορας: **Μαρία Μαυρουδή**

Τίτλος Διατριβής: “Αξιολόγηση της Συνεργειακής Δράσης Ιοντικών Υγρών και Άλλων Προσθέτων για την Ανάπτυξη Μεθόδων Διαχωρισμού με την Τεχνική της Ηλεκτροφόρησης Τριχοειδούς”

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για απόκτηση Διδακτορικού διπλώματος στο Τμήμα Χημείας και εγκρίθηκε στις 03 Δεκεμβρίου 2015 από τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής.

Εξεταστική Επιτροπή:

Ερευνητικός Σύμβουλος: Επίκουρη Καθηγήτρια Κωνσταντίνα Καπνίση-Χριστοδούλου,
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου

Υπογραφή:

**ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ
ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Μέλος Επιτροπής:

Επίκουρη Καθηγήτρια Ευτυχία Πινακουλάκη (Πρόεδρος),
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου

Υπογραφή:

**ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ
ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Μέλος Επιτροπής:

Καθηγητής Κώστας Σ. Πατρίκιος (Εσωτερικό Μέλος),
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου

Υπογραφή:

**ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ
ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Μέλος Επιτροπής:

Καθηγήτρια Αναστασία-Στέλλα Ζώτου (Εξωτερικό Μέλος),
Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Υπογραφή:

**ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ
ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Μέλος Επιτροπής:

Καθηγητής Μιχαήλ Κουμπάρης (Εξωτερικό Μέλος),
Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Υπογραφή:

**ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ
ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Υπεύθυνη δήλωση

Η παρούσα διατριβή υποβάλλεται προς συμπλήρωση των απαιτήσεων για απονομή Διδακτορικού Τίτλου του Πανεπιστημίου Κύπρου. Είναι προϊόν πρωτότυπης εργασίας αποκλειστικά δικής μου, εκτός των περιπτώσεων που ρητώς αναφέρονται μέσω βιβλιογραφικών αναφορών, σημειώσεων ή και άλλων δηλώσεων.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου, υπό την επίβλεψη της Δρ. Κωνσταντίνας Καπνίση-Χριστοδούλου (Σεπτέμβριος 2011 - Δεκέμβριος 2015).

Η σύνθεση των ιουλινών έγινε από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Grzegorz Bazylak στο Τμήμα Φαρμακευτικής του Nicolaus Copernicus University at Bydgoszcz (Poland).

Μαρία Μαυρουδή

.....

Περίληψη

Η ανάπτυξη και η αξιολόγηση της συνεργιστικής δράσης ιοντικών υγρών (Ionic Liquids, *ILs*) και άλλων πρόσθετων για διαχωρισμούς στην ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς (Capillary Electrophoresis, *CE*) αποτελεί το ερευνητικό αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η χρήση των *ILs* επικεντρώθηκε σε διαχωρισμούς ενώσεων με φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Αρχικά, επιχειρήθηκε η εφαρμογή κάποιων χειρόμορφων ιοντικών υγρών (Chiral Ionic Liquids, *CILs*) μέσα στον ηλεκτρολύτη υποβάθρου (Background Electrolyte, *BGE*) ως τα μοναδικά πρόσθετα ή σε συνδυασμό με άλλα πρόσθετα, με στόχο την επίτευξη διαχωρισμού ενώσεων που ανήκουν στην ίδια οικογένεια φαρμάκων. Έπειτα, έγινε χρήση των *ILs* σε συνδυασμό με χειρόμορφους επιλογείς (Chiral Selectors, *CSs*), με στόχο τη βελτίωση των χειρόμορφων διαχωρισμών διάφορων φαρμακευτικών ενώσεων.

Η παρούσα διατριβή χωρίζεται σε δύο βασικά μέρη. Στο πρώτο μέρος, το οποίο αφορά στο μη εναντιομερή διαχωρισμό πέντε 2-αρυλοπροπιονικών οξέων (μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, *NSAIDs*), μελετήθηκε αρχικά η εφαρμογή της μικυλλιακής ηλεκτροκινητικής ηλεκτροχρωματογραφίας τριχοειδούς (Micellar Electrokinetic Chromatography, *MEKC*), χρησιμοποιώντας ως τασιενεργή ουσία το δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, *SDS*). Έπειτα, μελετήθηκε η ικανότητα κάποιων *CILs* να διαχωρίσουν πέντε *NSAIDs* (indoprofen, carprofen, ketoprofen, flurbiprofen και ibuprofen), χρησιμοποιώντας την ηλεκτροκινητική χρωματογραφία τριχοειδούς (Capillary Electrokinetic Chromatography, *EKC*). Συγκεκριμένα, τρία *ILs*, τα οποία έχουν ως βάση τους εστέρες των αμινοξέων (Amino Acid Ester-based Ionic Liquids, *AAILs*), συντέθηκαν και προστέθηκαν μέσα στον *BGE* για το σκοπό αυτό. Για την αξιολόγηση των δύο τεχνικών της *CE*, μελετήθηκαν οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν την εκλεκτικότητα, όπως για παράδειγμα η συγκέντρωση του *SDS* και του *AAIL*, η διαμόρφωση του *AAIL*, η θερμοκρασία της στήλης, το pH του *BGE* και το συνεργιστικό φαινόμενο μεταξύ του *SDS* και του *AAIL*. Επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός και των πέντε *NSAIDs* χρησιμοποιώντας 40 mM γαλακτικού *τριτ*-βουτυλεστέρα της *L*-αλανίνης (*L*-Alanine *tert*-butyl ester Lactate, *L-AlaC₄Lac*), 100 mM τρισ(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιο (tris-(hydroxymethyl)aminomethane, *Tris*)/10 mM δεκαϋδρικό τετραβορικό νάτριο (Sodium tetraborate decahydrate, *Borate*) με τιμή pH ίση με 8, θερμοκρασία της στήλης 35 °C και δυναμικό 30 kV. Επίσης, η επαναληψιμότητα και για τις δύο βέλτιστες μεθόδους που αναπτύχθηκαν με χρήση του *SDS* και του *L-AlaC₄Lac*

ως προσθέτων στο ρυθμιστικό διάλυμα, αξιολογήθηκε υπολογίζοντας τη σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, *RSD*) των χρόνων μετανάστευσης της ηλεκτροωσμωτικής ροής (Electroosmotic Flow, *EOF*) και των κορυφών των αναλυτών. Στην περίπτωση χρήσης του AAIL ως το μόνο πρόσθετο στον BGE, η επαναληψιμότητα αποδείχθηκε εξαιρετική, αφού όλες οι τιμές της *RSD* ήταν μικρότερες ή πολύ κοντά στο 1,3%. Να σημειωθεί ότι αυτή είναι η πρώτη φορά που μελετήθηκε η ικανότητα των AAILs, ως των μόνων πρόσθετων στον BGE για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό των NSAIDs.

Στο δεύτερο μέρος, το AAIL L-AlaC₄Lac προστέθηκε στο BGE μαζί με άλλους CSs, όπως είναι οι κυκλοδεξτρίνες (Cyclodextrins, *CDs*), και πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του AAIL στο χειρόμορφο διαχωρισμό, καθώς και μελέτη της πιθανής συνεργιστικής τους δράσης. Ο συνδυασμός του L-AlaC₄Lac με την τριμεθυλωμένη β-κυκλοδεξτρίνη (Trimethyl-beta-Cyclodextrin, *TM-β-CD*) βελτίωσε σημαντικά τον εναντιομερή διαχωρισμό επτά NSAIDs (ibuprofen, flurbiprofen, ketoprofen, carprofen, indoprofen, naproxen και fenoprofen). Με την προσθήκη του AAIL στον BGE παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας (Resolution, *R_s*), αλλά και της αποδοτικότητας (Efficiency, *N*) των δύο κορυφών, για όλους τους αναλύτες. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι, δεν έχει προηγουμένως διερευνηθεί η εναντιοεκλεκτικότητα του δυαδικού συστήματος TM-β-CD/L-AlaC₄Lac και δεν έχει εκτιμηθεί η συνεργιστική τους δράση.

Μια άλλη μελέτη επικεντρώθηκε στη συνεργιστική δράση του L-AlaC₄Lac με παράγωγα της β-κυκλοδεξτρίνης (beta-Cyclodextrin, *β-CD*) για τον εναντιομερή διαχωρισμό άλλων φαρμακευτικών ουσιών (warfarin και coumachlor) στην CE. Ως εκ τούτου, στη συγκεκριμένη μελέτη, εξετάστηκαν τρία συνολικά παράγωγα της β-CD (β-CD, TM-β-CD και υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (Hydroxypropyl-beta-CD, *HP-β-CD*) ως CSs, για την εκτίμηση του συνεργιστικού φαινομένου του L-AlaC₄Lac και με άλλα παράγωγα της β-CD. Παρόλο που το δυαδικό σύστημα β-CD/L-AlaC₄Lac δεν έδειξε καμία εναντιοεκλεκτικότητα ως προς τις υπό μελέτη φαρμακευτικές ενώσεις, η χρήση των δυαδικών συστημάτων TM-β-CD/L-AlaC₄Lac και HP-β-CD/L-AlaC₄Lac βελτίωσε σημαντικά το χειρόμορφο διαχωρισμό ως προς τη διαχωριστική ικανότητα και την αποδοτικότητα.

Στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΔΙΑΚΡΑΤΙΚΕΣ/KY-POY/0713, και σε συνεργασία με το ερευνητικό εργαστήριο της καθηγήτριας Raluca-Ioana Stefan-van Staden (Laboratory of Electrochemistry and PATLAB Bucharest, Romania), εξετάστηκαν νέοι

πιθανοί χειρόμορφοι επιλογείς (ινουλίνες (inulins, *INs*)), οι οποίοι θα μπορούσαν να λειτουργήσουν συνεργειακά με το AAIL. Τα δυαδικά συστήματα που προέκυψαν εφαρμόστηκαν στην CE και μελετήθηκε η ικανότητα επίτευξης χειρόμορφων διαχωρισμών. Παρόλο που ο βασικός στόχος του συγκεκριμένου προγράμματος ήταν ο εναντιομερής διαχωρισμός της θυροξίνης (Thyroxine, *T4*), η οποία είναι μια βασική ορμόνη για τη ρύθμιση του μεταβολισμού στον οργανισμό, η ικανότητα των *INs* να δράσουν ως *CSs* μελετήθηκε, χρησιμοποιώντας και διάφορους άλλους χειρόμορφους αναλύτες. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μέχρι τώρα έδειξαν ότι η *IN* και τα παράγωγά της δεν μπόρεσαν να λειτουργήσουν ως *CSs* στην CE, για κανέναν από τους αναλύτες που εξετάστηκαν. Επιπρόσθετα, ο χειρόμορφος διαχωρισμός της *T4* δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας τα δυαδικά συστήματα που μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή και έτσι παραμένει μια πρόκληση για το Εργαστήριο της Ενόργανης Ανάλυσης.

Abstract

The development and evaluation of the synergistic effect of ionic liquids (*ILs*) and other additives for separations in capillary electrophoresis (*CE*) constitutes the research objective of the present doctoral thesis. The use of *ILs* was focused on separations of compounds with pharmaceutical interest. Initially an attempt was made to apply chiral ionic liquids (*CILs*) into the background electrolyte (*BGE*) as the only additive or in combination with other additives, in order to achieve separations of compounds that belong to the same family of pharmaceuticals by use of *CE*. Then, *ILs* were used in combination with chiral selectors (*CSs*), in order to improve chiral separations of various pharmaceutical compounds in *CE*.

The present thesis is divided into two main parts. In the first part, which involves the non-chiral separation of five 2-aryl-propionic acids (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, *NSAIDs*), micellar electrokinetic chromatography capillary (*MEKC*) was applied by using the surfactant sodium dodecyl sulfate (*SDS*). Next, the ability of some *CILs* to separate five *NSAIDs* (indoprofen, carprofen, ketoprofen, flurbiprofen and ibuprofen) was studied by using electrokinetic chromatography (*EKC*). In particular, three *ILs*, based on amino acid esters (*AAILs*), were synthesized and added into the *BGE*. For the evaluation of these two *CE* techniques, different parameters that affect selectivity, were studied, such as *SDS* and *AAIL* concentrations, *AAIL* configuration, column temperature, *BGE* pH and the synergistic effect between the *SDS* and the *AAIL*. Baseline separation of the five *NSAIDs* was achieved by using 40 mM L-Alanine *tert* butyl ester Lactate (*L-AlaC₄Lac*), 100 mM Tris-(hydroxymethyl) aminomethane (*Tris*)/10 mM Sodium tetraborate decahydrate (*Borate*) with a pH value of 8, a column temperature of 35 °C and an applied voltage of 30 kV. In addition, the *repeatability* for both optimum methods which were developed by use of *SDS* and *L-AlaC₄Lac* as buffer additives, was evaluated by calculating the relative standard deviation (*RSD*) of the elution times of electroosmotic flow (*EOF*) and the peaks of analytes. When *AAIL* was used as the sole additive, *repeatability* was excellent since all %-*RSD* values were closed to or lower than 1.3%.

In the second part, the *AAIL* *L-AlaC₄Lac* was added into the *BGE* with other *CSs*, such as cyclodextrins (*CDs*), and the effect of *AAIL* on the chiral separation, and the possible synergistic effect were evaluated. The combination of *L-AlaC₄Lac* with trimethyl-beta-cyclodextrin (*TM-β-CD*) significantly improved the enantioseparation of seven *NSAIDs*

(ibuprofen, flurbiprofen, ketoprofen, carprofen, indoprofen, naproxen, and fenoprofen). The addition of the AAIL into the BGE improved resolution (R_s) and efficiency (N) of both peaks for all analytes. It is worth to note here that this is the first time that the enantioselectivity of the binary system TM- β -CD/L-AlaC₄Lac is investigated.

Another study was focused on the synergistic effect of L-AlaC₄Lac with the derivatives of beta-cyclodextrin (β -CD) for the enantioseparation of other pharmaceutical compounds (warfarin and coumachlor) in CE. Therefore, in this study, three β -CD derivatives (β -CD, TM- β -CD and Hydroxypropyl- β -CD (HP- β -CD)) were evaluated as CSs, in order to study the synergistic effect of L-AlaC₄Lac with the other β -CD derivatives. Although the binary system of β -CD/L-AlaC₄Lac did not demonstrate any enantioselectivity for the pharmaceutical compounds under study, the use of the binary systems TM- β -CD/L-AlaC₄Lac and HP- β -CD/L-AlaC₄Lac improved the chiral separations in regard to resolution and efficiency.

Within the framework of the research program BILATERAL/CY-RO/0713, and in collaboration with the research laboratory of Professor Raluca-Ioana Stefan-van Staden (Laboratory of Electrochemistry and PATLAB Bucharest, Romania), new potential chiral selectors (inulins (INs)) were examined, which could act synergistically with the AAIL. The resulting binary systems were applied to CE and their chiral separation ability was studied. Even though the main objective of the particular program was the enantiomeric separation of thyroxine (T₄), which is a key hormone for the regulation of metabolism in the body, the chiral separation ability of INs was evaluated by use of different chiral analytes.

The results that have, so far, been obtained, demonstrated that IN and its derivatives could not act as CSs in CE, for any of the analytes under study. Additionally, the baseline separation of T₄ could not be achieved by use of the binary systems that were studied in the present PhD thesis. Therefore, the enantioseparation of T₄ remains a challenge for the Instrumental Analysis Laboratory.

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου και με βοήθησαν, ο καθένας με το δικό του ξεχωριστό τρόπο, όλο αυτό το διάστημα για την πραγματοποίηση ενός πολύ σημαντικού προσωπικού μου στόχου, όπως αυτός των διδακτορικών σπουδών. Η αγάπη, η παρουσία, και η υποστήριξη των ανθρώπων αυτών, αποτέλεσαν την κινητήρια δύναμη για την υλοποίηση του συγκεκριμένου στόχου.

Οι πρώτες ευχαριστίες ανήκουν στην ερευνητική μου σύμβουλο Δρ. Κωνσταντίνα Καπνίση-Χριστοδούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου, για την ευκαιρία που μου έδωσε προσφέροντάς μου τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τις διδακτορικές μου σπουδές στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης. Θέλω επίσης να την ευχαριστήσω για την πολύ σημαντική καθοδήγησή της στην πραγματοποίηση της παρούσας έρευνας, για τη συνεχή της ενθάρρυνση και την αμέριστη συμπαράστασή της, τόσο σε ακαδημαϊκό, όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Επιπλέον, την ευχαριστώ θερμά για την προθυμία της να συμμεριστεί ότι κι αν με απασχολούσε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της εσωτερικής εξεταστικής μου επιτροπής, τον Καθηγητή Δρ. Κώστα Σ. Πατρίκιο, και την Επίκουρη Καθηγήτρια Δρ. Ευτυχία Πινακουλάκη του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου, για την πολύτιμή τους συμμετοχή στις επιτροπές αξιολόγησης της ερευνητικής μου διατριβής, καθώς επίσης και τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Δρ. Αναστασία-Στέλλα Ζώτου του Τμήματος Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και τον Καθηγητή Δρ. Μιχαήλ Κουμπάρη του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για την αποδοχή τους να συμμετάσχουν ως εξωτερικά μέλη της εξεταστικής επιτροπής και για τις χρήσιμες υποδείξεις τους σχετικά με την επιμέλεια του τελικού κειμένου της διατριβής.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Πανεπιστήμιο Κύπρου και το Ίδρυμα Προώθησης Έρευνας για την οικονομική στήριξη κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συμφοιτητές μου στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης, τη Χριστιάνα Γεωργίου, το Γιάννη Σταύρου, το Μιχάλη Κωνσταντίνου, τη Δέσπω Τσιουπή, το Χριστόφορο Χατζηστασή και την Αθηνά Νικολάου. Τους ευχαριστώ για την άψογη

συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια, τις πολύτιμες συμβουλές τους, για τη στήριξή τους και για όλες τις ωραίες στιγμές που μοιραστήκαμε.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω τις φίλες μου, Ηρώ, Μαρία και Χρυσοβαλάντω, για την ανοχή και την πολύπλευρη συμπαράσταση που επέδειξαν στα άγχη και τις φοβίες μου, όλο αυτό το διάστημα.

Τις πιο πολλές ευχαριστίες τις οφείλω στην οικογένειά μου. Αρχικά, τους ευχαριστώ για τη ψυχική και οικονομική υποστήριξη. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη μητέρα μου, Άννα, για τις ηθικές αξίες που μου δίδαξε στη ζωή μου και που με έμαθε να αντιμετωπίζω τη ζωή με αισιοδοξία και να χαμογελώ ακόμα και στα πιο δύσκολα. Ευχαριστώ τον πατέρα μου, Χρίστο, που πάντα βρίσκεται στο πλευρό μου και με στηρίζει σε ό,τι και να κάνω, που μου δίνει δύναμη όταν τη χρειάζομαι και που πιστεύει σε εμένα περισσότερο από εμένα την ίδια. Ευχαριστώ τα αδέρφια μου, Δάκη, Άντρια και Κατερίνα, που ξέρω ότι θα βρίσκονται πάντα δίπλα μου σε ό,τι κι αν τους χρειαστώ.

Στους γονείς μου, Χρίστο και Άννα,

Περιεχόμενα

Σελίδα Εγκυρότητας	i
Υπεύθυνη Δήλωση	ii
Περίληψη	iii
Abstract	vi
Ευχαριστίες	viii
Αφιέρωση	x
Περιεχόμενα	xi
Κατάλογος Σχημάτων	xv
Κατάλογος Πινάκων	xxi
Πίνακας Συντμήσεων και Συμβόλων	xxii
1 Εισαγωγή	01
2 Θεωρητικό Υπόβαθρο	05
2.1. Φαρμακευτική Ανάλυση	05
2.2. Χειρομορφία	06
2.2.1. Χειρόμορφα Φάρμακα	09
2.2.2. Χειρόμορφοι Διαχωρισμοί	12
2.3. Χειρόμορφοι Επιλογείς (Chiral Selectors, CSs)	14
2.3.1. Κυκλοδεξτρίνες (Cyclodextrins, CDs)	14
2.3.1.1. Χρήση των CDs σε Χειρόμορφους Διαχωρισμούς στην CE	16
2.3.2. Κυκλοφρουκτάνες (Cyclofructans, CFs)	18
2.3.3. Επιφανειοδραστικές Ουσίες	20
2.3.4. Αντιβιοτικά	21
2.3.5. Όλιγο-και πολυ-σακχαρίτες	21
2.3.5.1. Ινουλίνη ως CS	22
2.4. Ιοντικά Υγρά (Ionic Liquids, ILs)	23
2.4.1. Χαρακτηριστικά και Ιδιότητες	23

2.4.2. Εφαρμογές	25
2.4.2.1. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση – IIs στη Χρωματογραφία και Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδούς	26
2.4.2.2. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση – CILs στη Χρωματογραφία και Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδούς	29
2.5. Ηλεκτροφόρηση	38
2.5.1. Γενικά – Κατηγορίες Ηλεκτροφόρησης	38
2.5.2. Οργανολογία και Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδούς	40
2.5.3. Μέθοδοι Ανίχνευσης στην CE	42
2.5.4. Βασικές Αρχές της CE	44
2.5.5. Μέθοδοι CE	49
2.5.5.1. Ηλεκτροφόρηση Ζώνης Τριχοειδούς (CZE)	50
2.5.5.2. Ηλεκτροκινητική Χρωματογραφία (EKC)	50
2.5.5.3. Ηλεκτροχρωματογραφία Τριχοειδούς Πληρωμένης στήλης (p-CEC)	51
2.5.5.4. Ηλεκτροχρωματογραφία Τριχοειδούς Ανοικτού Σωλήνα (OT-CEC)	53
2.5.5.5. Ισοταχοφόρηση Τριχοειδούς (CITP)	53
2.5.5.6. Ισοηλεκτρική Εστίαση Τριχοειδούς (CIEF)	53
2.5.5.7. Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδούς Πηκτής (CGE)	54
3 Πειραματικό Μέρος	55
3.1. Οργανολογία CE-UV	55
3.1.1. Στήλη	55
3.1.2. Ανιχνευτής UV-Vis	56
3.1.3. Τροφοδοτικό Υψηλής Τάσης	56
3.1.4. Θερμοστάτης	57
3.1.5. Αυτόματος Δειγματολήπτης	57
3.1.6. Έγχυση Δείγματος	57
3.2. Πειραματικό Μέρος για τη «Χρήση Τασιενεργών Ουσιών και AAILs για το μη Εναντιομερή Διαχωρισμό Πέντε NSAIDs»	58
3.3. Πειραματικό Μέρος για τη «Συνεργιστική Δράση του L-AlaC ₄ Lac με την TM-β-CD για τον Εναντιομερή Διαχωρισμό Επτά NSAIDs»	61

3.4. Πειραματικό Μέρος για τη «Συνεργιστική Δράση του L-AlaC ₄ Lac με Τρία Παράγωγα της β-CD για το Χειρόμορφο Διαχωρισμό Δύο Κουμαρινικών Παραγώγων»	62
3.5. Πειραματικό Μέρος για τη «Χρήση Διάφορων Δυαδικών Συστημάτων για το Διαχωρισμό των Εναντιομερών της T4»	64
3.6. Ανάλυση και Αξιολόγηση των Αποτελεσμάτων	65
4 Αποτελέσματα και Συζήτηση	68
4.1. Χρήση Τασιενεργών Ουσιών και των AAILs για το μη Εναντιομερή Διαχωρισμό Πέντε NSAIDs	68
4.1.1. Επίδραση του Είδους του BGE	69
4.1.2. Μελέτες με το SDS	72
4.1.2.1. Επίδραση της Συγκέντρωσης του SDS	72
4.1.2.2. Επίδραση της Θερμοκρασίας	73
4.1.3. Μελέτες με το AAIL	74
4.1.3.1. Επίδραση της Διαμόρφωσης του AAIL	74
4.1.3.2. Επίδραση της Συγκέντρωσης του L-AlaC ₄ Lac	75
4.1.3.3. Επίδραση της Θερμοκρασίας	78
4.1.3.4. Επίδραση της Εφαρμοζόμενης Τάσης	79
4.1.3.5. Επίδραση του pH	80
4.1.4. Αξιολόγηση των Μεθόδων MEKC και EKC	82
4.1.5. Αξιολόγηση της Συνεργιστικής Δράσης των Δύο Πρόσθετων	84
4.1.6. Συμπεράσματα	85
4.2. Μελέτη της Συνεργιστικής δράσης του L-AlaC ₄ Lac με την TM-β-CD για τον Εναντιομερή Διαχωρισμό επτά NSAIDs	86
4.2.1. Αξιολόγηση της Συνεργιστικής Δράσης	87
4.2.2. Επίδραση της Συγκέντρωσης της TM-β-CD	88
4.2.3. Επίδραση της Συγκέντρωσης του L-AlaC ₄ Lac	89
4.2.4. Επίδραση του pH	97
4.2.5. Αξιολόγηση της Μεθόδου	99
4.2.6. Συμπεράσματα	101
4.3. Μελέτη της Συνεργιστικής Δράσης του L-AlaC ₄ Lac με Τρία Παράγωγα της	

β-CD για το Χειρόμορφο Διαχωρισμό Δυο Κουμαρινικών Παραγώγων	101
4.3.1. Συμπεράσματα	108
4.4. Χρήση Διάφορων Συστημάτων για την Ανάπτυξη μιας Νέας Αναλυτικής Μεθόδου για το Διαχωρισμό των Εναντιομερών της T4	109
4.4.1. Επίδραση του Είδους του BGE	110
4.4.2. Χρήση των CDs για το Διαχωρισμό των Εναντιομερών της T4	110
4.4.3. Χρήση των INs για το Διαχωρισμό των Εναντιομερών της T4	113
4.4.4. Συμπεράσματα	114
5 Γενικά συμπεράσματα	115
6 Μελλοντική εργασία	117
7 Βιβλιογραφία	118

Κατάλογος Σχημάτων	Σελ.
Σχήμα 2.1. Τρόποι αναγραφής των εναντιομερών.	07
Σχήμα 2.2. Διαμορφώσεις S και R.	07
Σχήμα 2.3. Παράδειγμα όπου υπάρχουν υποκαταστάτες ίσης προτεραιότητας.	08
Σχήμα 2.4. Παραδείγματα όπου συμμετέχουν διπλοί ή τριπλοί δεσμοί.	08
Σχήμα 2.5. Στερεοϊσομερείς δομές της 2,3,4-τριδροξυβουτανάλης.	09
Σχήμα 2.6. Στερεοχημικές δομές των εναντιομερών της θαλιδομίδης και μετατροπή του ενός στο άλλο.	10
Σχήμα 2.7. Το μοντέλο τριών σημείων αλληλεπίδρασης. (α) Εναντιομερές 1, το οποίο φέρει τρεις ομάδες που ταιριάζουν ακριβώς σε τρία σημεία του CS. (β) Εναντιομερές 2, στο οποίο μετά από πιθανές περιστροφές, μόνο δύο ομάδες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με δύο σημεία του CS.	13
Σχήμα 2.8. Δομές και διαστάσεις των τριών φυσικών CDs.	15
Σχήμα 2.9. Δομές των συμπλόκων κετοπροφαίνιου/TM-CD όπως προέκυψαν από τα φάσματα 1D ROESY. (α) Κετοπροφαίνιο/TM-α-CD, (β) Κετοπροφαίνιο/TM-β-CD και (γ) Κετοπροφαίνιο/TM-γ-CD [79].	18
Σχήμα 2.10. Δομές των CFs. Για n=1 CF-6, n=2 CF-7 και n=8 CF-8.	19
Σχήμα 2.11. Δομή της IN.	23
Σχήμα 2.12. Τα πιο συνήθη κατιόντα/ανιόντα που αποτελούν τα ILs και η ανάλογη διαλυτότητα τους στο νερό με βάση το ανιόν που περιέχουν.	24
Σχήμα 2.13. Χρωματογραφήματα των εφεδρινών με πρόσθετο στην κινητή φάση: (α) 5,2 mM και (β) 62,4 mM TEA, (γ) 0 mM, (δ) 2,6 mM, (ε) 5,2 mM, (στ) 20,8 mM και (η) 62,4 mM [BMIM][BF ₄] σε pH 3,0 [27].	29

Σχήμα 2.14.	Μηχανισμός χειρόμορφου διαχωρισμού αρνητικά φορτισμένου αναλύτη με τη χρήση CD και IL μέσα σε μια στήλη της CE.	30
Σχήμα 2.15.	Χειρόμορφοι διαχωρισμοί της φαινυλαλανίνης, ιστιδίνης, τρυπτοφάνης και τυροσίνης στην HPLC. Κινητή φάση: 1 mM [C ₆ MIM][L-Pro], 0,5 mM Cu(OAc) ₂ και MeOH (15%, v/v) σε νερό (pH 5,8) [160].	33
Σχήμα 2.16.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν κατά το χειρόμορφο διαχωρισμό του φλουρβιπροφαίνιου. BGE: (α) 50 mM χολικό νάτριο, (β) 20 mM S-[CHTA][NTf ₂] + 30 mM χολικό νάτριο, (γ) 20 mM S-[CHTA][NTf ₂] + 30 mM χολικό νάτριο + 10 mM OTG [164].	36
Σχήμα 2.17.	Ταυτόχρονος διαχωρισμός 2-αρυλοπροπιονικών οξέων κατά την απουσία (A) και παρουσία (B) του L-UCLB. Συνθήκες: 5 mM NaOAc, 2,63 mM HOAc (pH 5,0) + 35 mM TM-β-CD (A), και 35 mM TM-β-CD + 1,5 mM L-UCLB (B). 1,1' = R-, S-ιβουπροφαίνιο; 2,2' = R-, S-φαινοπροφαίνιο; 3,3' = R-, S-ινδοπροφαίνιο; 4,4' = R-, S-σουπροφαίνιο; 5,5' = R-, S-κετοπροφαίνιο [168].	37
Σχήμα 2.18.	Ηλεκτροφερογράμματα του εναντιομερούς διαχωρισμού των (α) NEF, (β) CIT και (γ) DUL σε διάφορα συστήματα διαχωρισμού. (α) 2,5% γλυκογόνο, (β) 2,5% γλυκογόνο + 60 mM TMA-OH, (c) 2,5% γλυκογόνο + 60 mM TMA-L-Asp, (d) 2,5% γλυκογόνο + 60 mM TMA-L-Arg [36].	39
Σχήμα 2.19.	Σχηματική διάταξη του βασικού συστήματος CE.	41
Σχήμα 2.20.	Σχηματική διάταξη φασματοφωτομετρικού ανιχνευτή UV-Vis συστοιχίας φωτοδιόδων.	43
Σχήμα 2.21.	Απεικόνιση της διπλοστοιβάδας που σχηματίζεται στο τοίχωμα του τριχοειδούς σωλήνα.	46
Σχήμα 2.22.	Απεικόνιση της σειράς μετανάστευσης των αναλυτών λόγω της EOF.	48
Σχήμα 2.23.	Προφίλ ροών (α) παρουσία της EOF και (β) σε ροή προκαλούμενη από εφαρμογή πίεσης.	49

Σχήμα 2.24.	Σχηματική απεικόνιση μικυλλίου.	52
Σχήμα 3.1.	Σύστημα PrinCE CE.	55
Σχήμα 3.2.	Δομή του μονομερούς του επιφανειοδραστικού SDS.	58
Σχήμα 3.3.	Δομές αναλυτών που μελετήθηκαν στο μη εναντιομερή διαχωρισμό.	60
Σχήμα 3.4.	Αντιπροσωπευτική σύνθεση των AAILs.	60
Σχήμα 3.5.	Δομές των AAILs.	60
Σχήμα 3.6.	Δομή του CS, TM-β-CD.	61
Σχήμα 3.7.	Δομές των επιπλέον αναλυτών που μελετήθηκαν στον εναντιομερή διαχωρισμό.	61
Σχήμα 3.8.	Δομή του CS, HP-β-CD.	63
Σχήμα 3.9.	Δομές των CSs σε 3-D μορφή.	63
Σχήμα 3.10.	Δομές των κουμαρινικών παραγώγων.	64
Σχήμα 3.11.	Δομή της T4.	64
Σχήμα 3.12.	Γραφική απεικόνιση των μεγεθών t_R και w που χρησιμοποιούνται κατά τον υπολογισμό της R_s .	66
Σχήμα 4.1.	Επίδραση της συγκέντρωσης του SDS στο διαχωρισμό πέντε NSAIDs. <u>Κορυφές</u> : (1) INDO, (2) CAR, (3) KET, (4) FLU και (5) IBU. <u>Συνθήκες</u> : BGE 100 mM Tris/10 mM τετραβορικό νάτριο pH 8,0, V = 30 kV, T = 20 °C, έγχυση δείγματος: 30 mbar για 3 s, λ = 200 nm	73
Σχήμα 4.2.	Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης στο διαχωρισμό πέντε NSAIDs χρησιμοποιώντας ως μοναδικό πρόσθετο στο BGE 10 mM SDS. <u>Κορυφές</u> : (1) INDO, (2) CAR, (3) KET, (4) FLU και (5) IBU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.1.	74

- Σχήμα 4.3.** Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac στο διαχωρισμό πέντε NSAIDs. Κορυφές: (1) INDO, (2) CAR, (3) KET, (4) FLU και (5) IBU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.1 (T = 35 °C). 76
- Σχήμα 4.4.** Τιμές R_s που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεντρώσεις του L-AlaC₄Lac. Κορυφές: (1) INDO, (2) CAR, (3) KET, (4) FLU και (5) IBU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.3. 77
- Σχήμα 4.5.** Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac στην αποδοτικότητα. Κορυφές: (1) INDO, (2) CAR, (3) KET, (4) FLU και (5) IBU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.3. 78
- Σχήμα 4.6.** Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης στο διαχωρισμό πέντε NSAIDs χρησιμοποιώντας ως μοναδικό πρόσθετο στο BGE 40 mM L-AlaC₄Lac. Κορυφές: (1) INDO, (2) CAR, (3) KET, (4) FLU και (5) IBU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.1. 79
- Σχήμα 4.7.** Επίδραση του pH του BGE στο διαχωρισμό πέντε NSAIDs χρησιμοποιώντας ως μοναδικό πρόσθετο στο BGE 40 mM L-AlaC₄Lac. Κορυφές: (1) INDO, (2) CAR, (3) KET, (4) FLU και (5) IBU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.3. 81
- Σχήμα 4.8.** Επίδραση του συνεργιστικού φαινομένου 10 mM SDS / 40 mM L-AlaC₄Lac στο διαχωρισμό πέντε NSAIDs. Κορυφές: (1) INDO, (2) CAR, (3) KET, (4) FLU και (5) IBU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.1. 84
- Σχήμα 4.9.** Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας (A) 30 mM TM-β-CD και (B) 30 mM TM-β-CD/15 mM L-AlaC₄Lac για το διαχωρισμό της IBU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4. 93
- Σχήμα 4.10.** Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας (A) 35 mM TM-β-CD και (B) 35 mM TM-β-CD/20 mM L-AlaC₄Lac για το διαχωρισμό της FLU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4. 93

Σχήμα 4.11.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας (A) 35 mM TM-β-CD και (B) 35 mM TM-β-CD/20 mM L-AlaC ₄ Lac για το διαχωρισμό της KET. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4.	94
Σχήμα 4.12.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας (A) 10 mM TM-β-CD και (B) 10 mM TM-β-CD/20 mM L-AlaC ₄ Lac για το διαχωρισμό της CAR. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4.	94
Σχήμα 4.13.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας (A) 20 mM TM-β-CD και (B) 20 mM TM-β-CD/15 mM L-AlaC ₄ Lac για το διαχωρισμό της INDO. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4.	95
Σχήμα 4.14.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας (A) 25 mM TM-β-CD και (B) 25 mM TM-β-CD/15 mM L-AlaC ₄ Lac για το διαχωρισμό της NAP. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4.	95
Σχήμα 4.15.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας (A) 20 mM TM-β-CD και (B) 20 mM TM-β-CD/20 mM L-AlaC ₄ Lac για το διαχωρισμό της FEN. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4.	96
Σχήμα 4.16.	Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC ₄ Lac στη διαχωριστική ικανότητα για το διαχωρισμό των: (α) IBU, με 30 mM TM-β-CD (β) FLU και KET, με 35 mM TM-β-CD (γ) CAR, με 10 mM TM-β-CD και (δ) INDO και FEN, με 20 mM TM-β-CD. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.9.	97
Σχήμα 4.17.	Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC ₄ Lac στην αποδοτικότητα για το NAP. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.9.	99
Σχήμα 4.18.	Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC ₄ Lac στο διαχωρισμό της WAR. <u>Συνθήκες</u> : BGE 5 mM Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH 5, 30 kV, 20 °C.	103
Σχήμα 4.19.	Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC ₄ Lac στο διαχωρισμό της WAR. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.18.	104

Σχήμα 4.20.	Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC ₄ Lac στο διαχωρισμό της WAR. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.18.	104
Σχήμα 4.21.	Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC ₄ Lac στο διαχωρισμό της WAR. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.18.	105
Σχήμα 4.22.	Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC ₄ Lac στο διαχωρισμό της COU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.18.	106
Σχήμα 4.23.	Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC ₄ Lac στο διαχωρισμό της COU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.18.	106
Σχήμα 4.24.	Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC ₄ Lac στο διαχωρισμό της COU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.18.	107
Σχήμα 4.25.	Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC ₄ Lac στο διαχωρισμό της COU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.18.	107
Σχήμα 4.26.	Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC ₄ Lac στο διαχωρισμό της COU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.18.	108
Σχήμα 4.27.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν με χρήση 3% HP-β-CD σε συνδυασμό με συγκεντρώσεις 20 mM και 60 mM του L-AlaC ₄ Lac.	110
Σχήμα 4.28.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν με χρήση 6% HP-β-CD ή/και σε συνδυασμό με συγκεντρώση 40 mM του L-AlaC ₄ Lac.	111
Σχήμα 4.29.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν με χρήση 3% S-β-CD σε συνδυασμό με συγκεντρώσεις 20 mM και 60 mM του L-AlaC ₄ Lac εφαρμόζοντας δυναμικό 20 kV.	112
Σχήμα 4.30.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν με χρήση 6% TM-β-CD.	113

Κατάλογος Πινάκων		Σελ.
Πίνακας 2.1.	Βασικότερες μέθοδοι CE και η αρχή στην οποία βασίζεται ο διαχωρισμός.	49
Πίνακας 4.1.	Είδος, συγκέντρωση, pH και εύρος σταθερότητας pH των BGE που μελετήθηκαν.	71
Πίνακας 4.2.	Τιμές R_s για τρεις διαμορφώσεις του κατιόντος του AAIL.	75
Πίνακας 4.3.	Επαναληψιμότητα χρόνων μετανάστευσης και αποδοτικότητα χρησιμοποιώντας ως μόνο πρόσθετο το SDS ή το L-AlaC ₄ Lac για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό των NSAIDs. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.1 και 4.3.	83
Πίνακας 4.4.	Ηλεκτροοσμωτική ευκινησία (μEOF) και διαχωριστική ικανότητα (R_s) που λήφθηκαν για τα IBU, FLU, KET, CAR, INDO, NAP και FEN. Συνθήκες: BGE 5 mM Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH 5, V = 30 kV, T = 20 °C, έγχυση δείγματος = 30 mbar για 3 s. Το BGE περιέχει διάφορες συγκεντρώσεις του CS (TM-β-CD) και του πρόσθετου (L-AlaC ₄ Lac).	91
Πίνακας 4.5.	Τιμές της αποδοτικότητας και για τα δύο εναντιομερή (N ₁ και N ₂) που λήφθηκαν για την KET, CAR, INDO, NAP και FEN. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4.	92
Πίνακας 4.6.	Επίδραση του pH στο χειρόμορφο διαχωρισμό των επτά NSAIDs. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4 και 4.7 (στο βέλτιστο σύστημα του κάθε αναλύτη).	98
Πίνακας 4.7	Επαναληψιμότητα των χρόνων μετανάστευσης και αποδοτικότητας των βέλτιστων μεθόδων διαχωρισμού για κάθε αναλύτη. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4.	100

Πίνακας Συντμήσεων και Συμβόλων

[BMIM][BF₄]	1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, τετραφθοροβορικό 1-βουτυλο-3-μεθυλιμιδαζόλιο
[DMP][NTf₂]	(+)-N,N-dimethylephedrinium-bis(trifluoromethanesulfon)imide
[EMIM][L-lactate]	1-ethyl-3-methylimidazolium L-lactate, 1-αιθυλο-3-μεθυλιμιδαζόλιο L-γαλακτικού
[HPTMA-β-CD][BF₄]	6-O-2-hydroxypropyltrimethylammonium-β-CD tetrafluoroborate
AAILs	Amino Acid Ester-based Ionic Liquids, εστέρες των αμινοξέων
APIs	Active Pharmaceutical Ingredients, ενεργά φαρμακευτικά συστατικά
BGE	Background Electrolyte, ηλεκτρολύτης υποβάθρου
Borate	Sodium tetraborate decahydrate, δεκαϋδρικό τετραβορικό νάτριο
CAR	Carprofen, καρπροφαίνιο
CDs	Cyclodextrins, κυκλοδεξτρίνες
CE	Capillary Electrophoresis, ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς
CFs	Cyclofructans, κυκλοφρουκτάνες
CGE	Capillary Gel Electrophoresis, ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς πηκτής
CIEF	Capillary Isoelectric Focusing, ισηλεκτρική εστίαση τριχοειδούς
CILs	Chiral Ionic Liquids, χειρόμορφα ιοντικά υγρά
CIT	Citalopram, σιταλοπράμη
CITP	Capillary Isotachophoresis, ισοταχοφόρηση τριχοειδούς
CLEC	Chiral Ligand Exchange Chromatography, χρωματογραφία ανταλλαγής χειρόμορφου υποκαταστάτη
CMC	Critical Micellar Concentration, κρίσιμη μυκλλητική συγκέντρωση

CM-CD	Carboxymethyl CD, καρβοξυμεθυλική κυκλοδεξτρίνη
CMIM	1-alkyl-3-methylimidazolium, 1-αλκυλο-3-μεθυλιμιδαζόλιο
COU	Coumachlor, κουμαχλώρ
CSPs	Chiral Stationary Phases, χειρόμορφες στατικές φάσεις
CSs	Chiral Selectors, χειρόμορφοι επιλογείς
CZE	Capillary Zone Electrophoresis, ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς
DUL	Duloxetine, ντουλοξετίνη
EKC	Electrokinetic Chromatography, ηλεκτροκινητική χρωματογραφία
EOF	Electroosmotic Flow, ηλεκτροωσμωτική ροή
FEN	Fenoprofen, φαινοπροφαίνιο
FLU	Flurbiprofen, φλουρβιπροφαίνιο
GC	Gas Chromatography, αεριοχρωματογραφία
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης
HP-β-CD	Hydroxypropyl-beta-CD, υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη
IBU	Ibuprofen, ιβουπροφαίνιο
ILs	Ionic Liquids, ιοντικά υγρά
INDO	Indoprofen, ινδοπροφαίνιο
INs	Inulins, ινουλίνες
IR	Infrared Spectroscopy, φασματοσκοπία υπέρυθρου
KET	Ketoprofen, κετοπροφαίνιο
L-AlaC₄Cl	L-alanine tert-butyl ester hydrochloride, γλωρίδιο του τριτ βουτυλικού εστέρα της L-αλανίνης

L-AlaC₄Lac	L-Alanine tert butyl ester Lactate, λακτικός τριτ βουτυλεστέρας της L-αλανίνης
L-Lys	L-Lysine, L-λυσίνη
LOD	Limit of Detection, όριο ανίχνευσης
L-Pro	L-Proline, L-προλίνη
L-UCLB	N-udecenoxy-carbonyl-L-leucinol bromide
MEKC	Micellar ElectroKinetic Chromatography, μικυλλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία
MS	Mass spectrometry, φασματομετρία μαζών
M-γ-CD	Methyl-γ-CD, μεθυλιωμένη-γ- κυκλοδεξτρίνη
N	Efficiency, αποδοτικότητα
NACE	Non-Aqueous Capillary Electrophoresis, μη-υδατική ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς
NAP	Naproxen, ναπροξένιο
NEF	Nefopam, νεφοπάμη
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
NSAIDs	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα
OT-CEC	Open tubular-CEC, ηλεκτροχρωματογραφία τριχοειδούς ανοικτού σωλήνα
OTG	1-S-octyl-β-D-thioglucoopyranoside, 1-S-οκτυλ-β-D-θειογλυκοπυρανοζίτη
p-CEC	Packed Capillary Electrochromatography, ηλεκτροχρωματογραφία τριχοειδούς πληρωμένης στήλης
rac-AlaC₄Lac	rac-Alanine tert butyl ester lactate, γαλακτικός τριτ-βουτυλεστέρας της rac-αλανίνης
R_s	Resolution, διαχωριστική ικανότητα

RSD	Relative Standard Deviation, σχετική τυπική απόκλιση
S-[CHTA][NTf₂]	S-[3-(chloro-2-hydroxypropyl)trimethylammonium] [bis((trifluoromethyl)sulfonyl)amide]
S-CD	Sulfated CD, θειϊκή κυκλοδεξτρίνη
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, δωδέκυλο θειϊκό νάτριο
TEA	Triethylamine, τριαιθυλαμίνη
TMA-L-Arg	Tetramethylammonium-L-arginine, τετραμεθυλαμμωνιακό της L-αργινίνης
TMA-L-Asp	TMA-L-aspartic acid, τετραμεθυλαμμωνιακό του L-ασπαρτικού οξέος
TM-β-CD	Trimethyl-beta-Cyclodextrin, τριμεθυλιωμένη-β-κυκλοδεξτρίνη
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethane, τρिस(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιο
UV-Vis	Ultraviolet-Visible, υπεριώδες-ορατό
WAR	Warfarin, βαρφαρίνη
β-CD	beta-Cyclodextrin, β-κυκλοδεξτρίνη
T4	Thyroxine, θυροξίνη

1 Εισαγωγή

Η ενόργανη χημική ανάλυση είναι σημαντική σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας, με κυριότερο ίσως τον τομέα της φαρμακοβιομηχανίας. Η ανάπτυξη και η αξιολόγηση νέων βελτιωμένων μεθόδων διαχωρισμού φαρμακευτικών ουσιών παρουσιάζει συνεχή αυξανόμενη ζήτηση, τόσο από τη βιομηχανία φαρμάκων, όσο και από την επιστημονική κοινότητα. Η σημαντικότητα ανάπτυξης νέων μεθόδων διαχωρισμού οφείλεται στο γεγονός ότι πολλές φαρμακευτικές ενώσεις προέρχονται από φυσικές πηγές, οι οποίες αποτελούνται και από άλλα συστατικά, αλλά και στο ότι τα περισσότερα φάρμακα περιέχουν χειρόμορφες ουσίες. Ως εκ τούτου, πολλά εναντιομερή των χειρόμορφων ουσιών διαφέρουν ως προς τη μεταξύ τους φαρμακολογική και τοξικολογική δραστηριότητα, με αποτέλεσμα να κρίνεται αναγκαίος ο ποιοτικός έλεγχος των διάφορων φαρμακευτικών σκευασμάτων με αποτελεσματικές, εναντιοεκλεκτικές και ευαίσθητες μεθόδους διαχωρισμού.

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί αποτελούνται από χειρόμορφα οργανικά μόρια, όπως είναι τα αμινοξέα, τα σάκχαρα και τα νουκλεϊκά οξέα. Στη φύση, τέτοιες οργανικές ενώσεις απαντώνται, συνήθως, μόνο στη μια από τις δύο εναντιομερείς μορφές. Συνεπώς, οι ζωντανοί οργανισμοί εμφανίζουν διαφορετική βιολογική απόκριση σε κάθε ένα από τα εναντιομερή μιας φαρμακευτικής δραστικής ουσίας. Στις μέρες μας, πέραν του 50% των φαρμακευτικών σκευασμάτων που χρησιμοποιούνται είναι χειρόμορφα και περίπου το 90% αυτών διατίθενται στην αγορά ως ισομοριακά μίγματα των δύο εναντιομερών [1]. Παρά το γεγονός ότι τα δύο εναντιομερή έχουν την ίδια χημική δομή, τα περισσότερα ισομερή των χειρόμορφων φαρμάκων εμφανίζουν αξιοσημείωτες διαφορές στις βιολογικές τους δραστηριότητες, όπως στη φαρμακολογία, στην τοξικολογία, στη φαρμακοκινητική, στο μεταβολισμό τους κ.λ.π. [1]. Ως εκ τούτου, είναι σημαντική η προώθηση του χειρόμορφου διαχωρισμού για την ανάλυση διάφορων φαρμάκων που διατίθενται στο εμπόριο στη ρακεμική τους μορφή, προκειμένου να εξαλειφθεί το ανεπιθύμητο εναντιομερές, έχοντας πλέον τη βέλτιστη θεραπεία και το σωστό θεραπευτικό έλεγχο για τον ασθενή [1, 2]. Σε μια έρευνα που δημοσιεύτηκε το 2012 από τους Global Industry Analysts, υπολογίζεται ότι, μέχρι το 2017, η παγκόσμια αγορά χειρόμορφων τεχνολογιών και προϊόντων θα αγγίξει τα \$5.1 δισεκατομμύρια λόγω της αυξημένης ανάγκης που υπάρχει σε εναντιομερώς καθαρές χημικές ουσίες [3]. Από το 1992, ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, *FDA*) απαιτεί οπτική καθαρότητα για χειρόμορφα μόρια, των οποίων τα εναντιομερή τους παρουσιάζουν διαφορετική ποιοτική και ποσοτική

φαρμακολογική ή τοξικολογική δράση [4-6]. Συνεπώς, κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη και η αξιολόγηση νέων βελτιωμένων μεθόδων διαχωρισμού για την επίτευξη εναντιομερικής καθαρότητας στον τομέα της φαρμακευτικής ανάλυσης.

Οι κυριότερες ενόργανες τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούνται σήμερα για τον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο των φαρμακευτικών σκευασμάτων είναι οι χρωματογραφικές και ηλεκτροφορητικές. Μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί πολλές αναλυτικές τεχνικές, όπως η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, *HPLC*) και η αεριοχρωματογραφία (Gas Chromatography, *GC*) για εναντιομερείς διαχωρισμούς χειρόμορφων φαρμάκων [7-11]. Πρόσφατα, η χρήση της ηλεκτροφόρησης τριχοειδούς (Capillary Electrophoresis, *CE*) έχει εξαπλωθεί γρήγορα σε ένα ευρύ φάσμα της αναλυτικής επιστήμης, όπως οι χειρόμορφοι διαχωρισμοί, λόγω του ότι παρέχει απλότητα, υψηλή απόδοση και χαμηλό κόστος, καθώς και μεγάλη ευελιξία στην επιλογή του τύπου των χειρόμορφων επιλογέων [12, 13].

Ο όρος ηλεκτροφόρηση σχετίζεται με όλες τις τεχνικές διαχωρισμού, οι οποίες βασίζονται στην κατανομή φορτισμένων αναλυτών σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα ανάλογα με την ηλεκτροφορητική τους ευκινησία. Η *CE* είναι η ενόργανη προσέγγιση της ηλεκτροφόρησης, όπου ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ως κινητήριας δύναμης στα άκρα ενός τριχοειδούς σωλήνα. Η EOF αποτελεί μια από τις θεμελιώδεις λειτουργίες της *CE*. Ο διαχωρισμός οφείλεται στις διαφορετικές ταχύτητες όδευσης που αποκτούν τα ιόντα κατά μήκος της στήλης, οι οποίες εξαρτώνται από το φορτίο και το μέγεθος των ιοντικών σωματιδίων. Για την επίτευξη χειρόμορφων διαχωρισμών στην *CE*, χρησιμοποιείται συνήθως κάποιος *CS* ή κάποιο πρόσθετο μέσα στον *BGE*. Οι κυριότεροι *CSs* που χρησιμοποιούνται είναι οι *CDs*, οι όλιγο- και πολυσακχαρίτες, τα μακροκυκλικά αντιβιοτικά και τα επιφανειοδραστικά πολυμερή. Επίσης, χειρόμορφοι διαχωρισμοί μπορούν να πραγματοποιηθούν εισάγοντας χειρόμορφες στατικές φάσεις (Chiral Stationary Phases, *CSPs*) μέσα στη στήλη [14-16].

Πρόσφατα, τα *ILs* χρησιμοποιήθηκαν ως στατικές φάσεις στην *GC* και *HPLC*, και ως πρόσθετα μέσα στην κινητή φάση και στον *BGE* στην *HPLC* και στην *CE*, αντίστοιχα, για βελτίωση των διαχωρισμών [11, 14, 17-26]. Αρχικά, τα *ILs* χρησιμοποιήθηκαν ως στατικές φάσεις στην *GC*, παρέχοντας πολύ καλά αποτελέσματα για διαχωρισμούς τόσο πολικών, όσο και μη πολικών ουσιών [17, 26]. Έπειτα, τα *ILs* χρησιμοποιήθηκαν στην *HPLC*, είτε ως

στατικές φάσεις, είτε ως πρόσθετα στις κινητές φάσεις, βελτιώνοντας τους διαχωρισμούς, μειώνοντας το φαινόμενο ουράς (tailing) και τη διεύρυνση των κορυφών και επιδρώντας στην αποδοτικότητα και στη διαχωριστική ικανότητα [27, 28]. Η χρήση των ILs επεκτάθηκε και στην CE, είτε ως στατικές φάσεις, είτε ως πρόσθετα του ρυθμιστικού διαλύματος, για τη βελτίωση των διαχωρισμών [29-39]. Η παρούσα διδακτορική έρευνα επικεντρώνεται στη χρήση των ILs ως προσθέτων στην CE για την ανάπτυξη και αξιολόγηση της δράσης τους σε διαχωρισμούς διάφορων φαρμακευτικών ενώσεων.

Ως πρωταρχικός στόχος της διδακτορικής διατριβής ετέθη η χρήση ILs, τα οποία προέρχονται από εστέρες αμινοξέων και χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα στον BGE για τη μελέτη της δυνατότητάς τους να λειτουργήσουν ως τα μόνα πρόσθετα, είτε σε συνδυασμό με μικκύλια για την αξιολόγηση της συνεργιστικής τους δράσης στο διαχωρισμό πέντε NSAIDs. Στο πρώτο στάδιο αξιολογήθηκε η ικανότητα των AAILs να διαχωρίσουν ενώσεις που ανήκουν στην ίδια οικογένεια φαρμάκων και ο ρόλος που παίζει η διαμόρφωση του AAIL στο μη εναντιομερή διαχωρισμό. Έπειτα, μελετήθηκε η πιθανή συνεργιστική δράση που μπορεί να αναπτύσσεται μεταξύ του AAIL και μιας επιφανειοδραστικής ουσίας, του SDS, στο διαχωρισμό των πέντε NSAIDs.

Η πρωτοτυπία του πρώτου μέρους έγκειται στο ότι είναι η πρώτη φορά που χρησιμοποιούνται τα συγκεκριμένα AAILs ως πρόσθετα στον BGE για τη βελτίωση του μη εναντιομερούς διαχωρισμού πέντε NSAIDs. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, εξετάστηκε η χρήση τους στην CE, εξετάζοντας παράγοντες που πιθανόν να επηρεάζουν την εκλεκτικότητά τους, όπως ο τύπος του BGE, η διαμόρφωση και η συγκέντρωση του AAIL, η θερμοκρασία της στήλης, το εφαρμοζόμενο δυναμικό, το pH του BGE και η πιθανή συνεργιστική τους δράση με μια τασιενεργή ουσία, όπως είναι το SDS. Η συγκεκριμένη μελέτη μπορεί να δώσει στοιχεία για την ανάπτυξη νέων μεθόδων για πλήρεις, αποδοτικότερους, επαναλήψιμους και γρήγορους διαχωρισμούς στη φαρμακευτική ανάλυση.

Ο δεύτερος στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η ανάπτυξη και η αξιολόγηση μιας νέας αναλυτικής μεθόδου για τον εναντιομερή διαχωρισμό επτά NSAIDs. Σε αυτή τη μελέτη, ένα AAIL, το L-AlaC₄Lac και ένας CS (TM-β-CD) προσθέτονταν στον BGE για την αξιολόγηση της ύπαρξης συνεργιστικού φαινομένου. Η προσθήκη του L-AlaC₄Lac μέσα στον BGE, στον οποίο περιέχεται ένας CS, υπολογίζεται ότι θα βελτιώσει

τη διαχωριστική ικανότητα και την αποδοτικότητα των εναντιομερών διαχωρισμών. Η πρωτοτυπία αυτού του στόχου έγκειται στο ότι είναι η πρώτη φορά που αξιολογήθηκε το συγκεκριμένο δυαδικό σύστημα (L-AlaC₄Lac/TM-β-CD) ως προς την εναντιοεκλεκτικότητά του σε χειρόμορφους διαχωρισμούς φαρμακευτικών ουσιών.

Ένας άλλος στόχος της διδακτορικής διατριβής επικεντρώθηκε στη συνεργιστική δράση του L-AlaC₄Lac με παράγωγα της β-CD για τον εναντιομερή διαχωρισμό και άλλων φαρμακευτικών ουσιών στην CE. Ως εκ τούτου, η πρωτοτυπία της συγκεκριμένης μελέτης έγκειται στο γεγονός ότι το συγκεκριμένο AAIL χρησιμοποιήθηκε, για πρώτη φορά, σε συνδυασμό με διάφορα παράγωγα της β-CD για την αξιολόγηση του συνεργειακού φαινομένου που πιθανόν να υπάρχει μεταξύ των δύο χειρόμορφων μορίων, για τον εναντιομερή διαχωρισμό της warfarin και της coumachlor. Η συγκεκριμένη μελέτη μπορεί να δώσει στοιχεία για την ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων για αποδοτικότερους εναντιομερείς διαχωρισμούς.

Στο τελευταίο μέρος, μέσα στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΔΙΑΚΡΑΤΙΚΕΣ/KY-POY/0713, και σε συνεργασία με το ερευνητικό εργαστήριο της καθηγήτριας Raluca-Ioana Stefan-van Staden, χρησιμοποιούνται οι INs ως νέοι πιθανοί CSs και εξετάζεται η πιθανή συνέργειά τους με το AAIL. Παρόλ' αυτά, ο βασικός στόχος του συγκεκριμένου προγράμματος ήταν ο εναντιομερής διαχωρισμός της θυροξίνης, η οποία είναι μια βασική ορμόνη για τη ρύθμιση του μεταβολισμού στον οργανισμό. Η T4 απαντάται σε δύο εναντιομερείς μορφές, την L-T4 και την D-T4, οι οποίες έχουν διαφορετικές βιολογικές, φαρμακολογικές και θεραπευτικές δράσεις. Ως εκ τούτου, η πρωτοτυπία του στόχου αυτού είναι ο εναντιομερής διαχωρισμός της T4 με τη χρήση των INs μέσα στον BGE. Αξίζει να σημειωθεί ότι η χρήση των IN μέσα στον BGE για χειρόμορφους διαχωρισμούς μελετάται πρώτη φορά.

2 Θεωρητικό Υπόβαθρο

2.1 Φαρμακευτική Ανάλυση

Η χημική ανάλυση είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ανακάλυψη των φαρμάκων. Τα φαρμακευτικά προϊόντα είναι μια μεγάλη και ποικίλη ομάδα ενώσεων που αποσκοπούν στην πρόληψη, τη θεραπεία ασθενειών και τη βελτίωση της υγείας των ζωντανών οργανισμών. Χιλιάδες τόνοι φαρμακευτικά δραστικών ουσιών χρησιμοποιούνται ετησίως για τους σκοπούς αυτούς. Ως εκ τούτου, τα τελευταία κυρίως χρόνια, το ενδιαφέρον στράφηκε προς την απόρριψη, την παρουσία και τις πιθανές επιπτώσεις των φαρμακευτικών ουσιών στο περιβάλλον. Οι φαρμακευτικές ουσίες μπορούν να μολύνουν το υδάτινο περιβάλλον μέσω εκροών που μπορούν να προκύψουν από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων ή, στην περίπτωση των κτηνιατρικών φαρμάκων, απευθείας μέσω της εκκένωσης υγρής κοπριάς [40]. Επίσης, λόγω του ότι αρκετές φαρμακευτικές ενώσεις παρουσιάζουν χαμηλή βιοαποικοδόμηση, μέσω της απέκκρισής τους από τους ζωντανούς οργανισμούς, καταλήγουν στα λύματα, τα οποία μετά από διάφορες επεξεργασίες καταλήγουν στο περιβάλλον μέσω της γεωργίας, όπου χρησιμοποιείται το επεξεργασμένο αυτό νερό στο πότισμα των καλλιεργειών. Επίσης, το αχρησιμοποίητο μέρος του φαρμάκου, μπορεί να αποτελέσει πηγή μόλυνσης των λυμάτων. Μέσα από μελέτες που έγιναν, φάνηκε ότι ο τύπος και οι συγκεντρώσεις των φαρμακευτικών ουσιών που εμφανίζονται στο περιβάλλον ποικίλλουν ανάλογα με την κατανάλωση και τους τρόπους χρήσης τους στην κάθε περιοχή-χώρα [41]. Έτσι, οι φαρμακευτικές ουσίες μπορούν να προκαλέσουν περιβαλλοντική μόλυνση, αφού μεγάλες ποσότητες εισέρχονται στο υδάτινο περιβάλλον, ως αποτέλεσμα της αύξησης στην κατανάλωσή τους, τόσο από την ανθρώπινη, όσο και από την κτηνιατρική χρήση.

Επίσης, ο φαρμακευτικός έλεγχος για τη διασφάλιση της ποιότητας είναι απαραίτητος, ώστε να παρέχεται η υψηλότερη αποτελεσματικότητα και ασφάλεια στους ασθενείς, λόγω του ότι ένα μεγάλο ποσοστό φαρμάκων, δυστυχώς, είναι, είτε πλαστά, είτε υποβαθμισμένα. Συγκεκριμένα, δεν περιέχουν ή μπορεί να περιέχουν λανθασμένα ενεργά φαρμακευτικά συστατικά (Active Pharmaceutical Ingredients, *APIs*). Ως εκ τούτου, για τους πιο πάνω λόγους είναι απαραίτητο να ελέγχεται η ποιότητα των επεξεργασμένων λυμάτων πριν καταλήξουν στη γεωργία και των φαρμακευτικών σκευασμάτων μέσω ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης [42].

2.2 Χειρομορφία

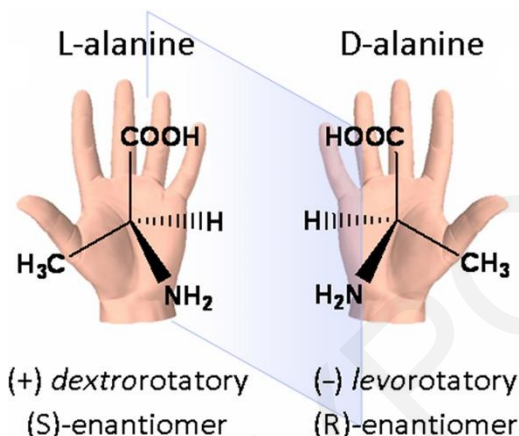
Η μοριακή χειρομορφία ανακαλύφθηκε το 1848 από τον Γάλλο χημικό, Louis Pasteur. Ο Louis Pasteur μελέτησε τους κρυστάλλους του τρυγικού εναμμώνιου νατρίου και παρατήρησε ότι τέτοιες χειρόμορφες ενώσεις υπάρχουν ως ζεύγος ουσιών και έχουν σχέση ειδώλου-αντικειμένου, δηλαδή δεν ταυτίζονται, και σχετίζονται μεταξύ τους όπως το δεξί με το αριστερό χέρι [43]. Η χειρομορφία αποτελεί ένα είδος στερεοϊσομέρειας και τέτοια στερεοϊσομερή καλούνται εναντιομερή. Έχουν τις ίδιες φυσικές ιδιότητες και διαφέρουν ως προς τη φορά που στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός, και αυτός είναι και ο λόγος που τέτοιες ενώσεις καλούνται και οπτικώς ενεργές.

Ένα χειρόμορφο μόριο και το εναντιομερές του έχουν τις ίδιες χημικές και φυσικές ιδιότητες. Επίσης, γνωρίζουμε ότι πολλά βιολογικά μόρια, όπως το DNA, τα αμινοξέα και τα σάκχαρα, είναι χειρόμορφα μόρια. Ακόμη, είναι αρκετά ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα χέρια μας φαίνονται να εξυπηρετούν τον ίδιο σκοπό. Παρόλ' αυτά, οι περισσότεροι άνθρωποι είναι σε θέση να χρησιμοποιούν μόνο ένα από τα χέρια τους για να γράψουν. Παρομοίως, αυτό συμβαίνει και με τα χειρόμορφα βιολογικά μόρια και τις αλληλεπιδράσεις. Όπως το αριστερό χέρι δεν ταιριάζει σωστά σε δεξιό γάντι, έτσι το ένα εναντιομερές του μορίου δεν μπορεί να λειτουργήσει με τον ίδιο τρόπο στο σώμα μας. Αυτό σημαίνει ότι τα εναντιομερή έχουν ιδιότητες που τα καθιστούν μοναδικά. Μια από αυτές τις ιδιότητες είναι ότι δεν μπορούν να έχουν ένα επίπεδο συμμετρίας και έτσι ένα ασύμμετρο μόριο δεν μπορεί να διαιρεθεί σε δύο μισά κατοπτρικά.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα εναντιομερή είναι πολύ παρόμοια μεταξύ τους αφού έχουν ακριβώς τον ίδιο χημικό τύπο. Το μόνο πράγμα που προφανώς διαφέρει είναι η διάταξή τους στο χώρο. Ως αποτέλεσμα αυτής της ομοιότητας, είναι πολύ δύσκολο να γίνει διάκριση του ενός εναντιομερούς μορίου από το άλλο όταν συγκρίνονται τις ιδιότητες, όπως σημείο βρασμού, σημείο τήξης και πυκνότητα. Ωστόσο, μπορούμε να τα διαφοροποιήσουμε από την οπτική τους δραστηριότητα. Όταν ένα επίπεδο πολωμένου φωτός περνά μέσα από το ένα από τα δύο εναντιομερή ενός χειρόμορφου μορίου, τότε το μόριο περιστρέφει το φως σε μια ορισμένη κατεύθυνση. Όταν το ίδιο επίπεδο πολωμένου φωτός περνά μέσα από το άλλο εναντιομερές, αυτό το εναντιομερές περιστρέφει το φως κατά το ίδιο ποσό, αλλά προς την αντίθετη κατεύθυνση. Αν ένα εναντιομερές περιστρέφει το φως προς τα αριστερά, το άλλο θα το περιστρέφει προς τα δεξιά. Σε γενικές γραμμές, μόρια που περιστρέφουν το φως

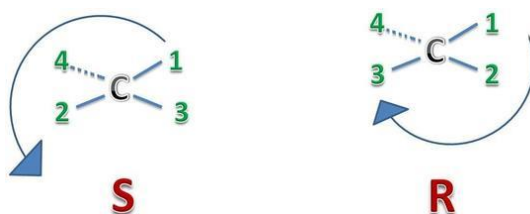
σε διάφορες κατευθύνσεις ονομάζονται οπτικά ισομερή. Αυτά που στρέφουν το πολωμένο φως δεξιόστροφα αναγράφονται ως (+) και αυτά που το στρέφουν αριστερόστροφα ως (-).

Επίσης, κάποιες φορές γίνεται αναφορά στα D- (*dextro*) και L- (*levo*) εναντιομερή (Σχήμα 2.1). Αυτός ο τρόπος αναγραφής των εναντιομερών, συνήθως, χρησιμοποιείται από βιοχημικούς για την περιγραφή, κυρίως, της στερεοχημικής διαμόρφωσης των σακχάρων και των αμινοξέων.



Σχήμα 2.1. Τρόποι αναγραφής των εναντιομερών.

Ο πιο διαδεδομένος τρόπος ονοματολογίας όμως, ο οποίος προτείνεται από την IUPAC, είναι η μέθοδος Cahn-Ingold-Prelog [44]. Τα εναντιομερή κατηγοριοποιούνται σε R- (*rectus* → Latin = δεξιά) και S- (*sinister* → Latin = αριστερά) (Σχήμα 2.2). Πρέπει να τονιστεί ότι, αυτός ο τρόπος δε σχετίζεται με τη φορά στροφής του πολωμένου φωτός, αλλά βασίζεται στον καθορισμό της δομικής διαμόρφωσης των εναντιομερών. Το πιο συνηθισμένο παράδειγμα χειρόμορφων ενώσεων είναι αυτό όπου ένα άτομο άνθρακα είναι συνδεδεμένο με τέσσερις διαφορετικούς υποκαταστάτες. Για τον ορισμό του εναντιομερούς με τη μέθοδο Cahn-Ingold-Prelog ακολουθούνται τρεις κανόνες:

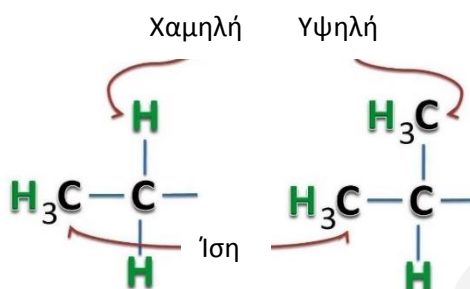


Σχήμα 2.2. Διαμορφώσεις S και R.

Κανόνας 1: Εάν όλα τα άτομα που είναι συνδεδεμένα στο άτομο του άνθρακα είναι διαφορετικά (χειρόμορφο ή στερεογονικό κέντρο), τότε η σειρά προτεραιότητας

καθορίζεται από τον ατομικό αριθμό του κάθε στοιχείου. Όποιο έχει τον υψηλότερο ατομικό αριθμό κατατάσσεται πρώτο.

Κανόνας 2: Εάν δεν είναι δυνατός ο καθορισμός της προτεραιότητας από τον πιο πάνω κανόνα, τότε η σύγκριση γίνεται με τα δεύτερα σε σειρά συνδεδεμένα άτομα κάθε υποκαταστάτη (κ.ο.κ) (**Σχήμα 2.3**).



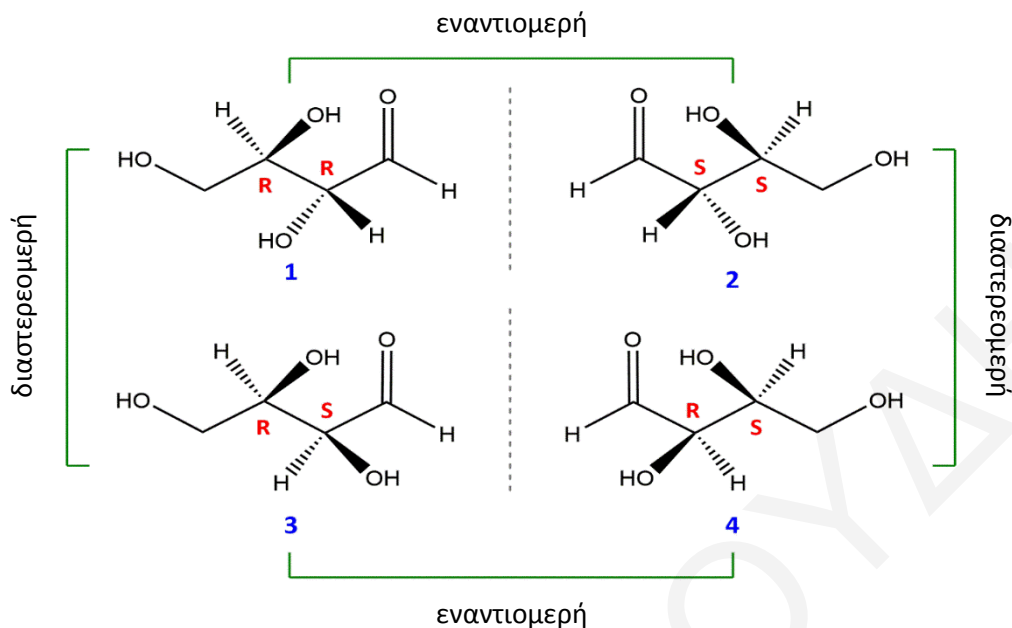
Σχήμα 2.3. Παράδειγμα όπου υπάρχουν υποκαταστάτες ίσης προτεραιότητας.

Κανόνας 3: Εάν είναι αναγκαίο να καθοριστεί η σειρά σε περιπτώσεις όπου συμμετέχουν διπλοί ή τριπλοί δεσμοί, τότε θεωρείται ότι τα άτομα αυτά είναι ισοδύναμα με ίσο αριθμό ατόμων με απλό δεσμό (**Σχήμα 2.4**) [44, 45].



Σχήμα 2.4. Παραδείγματα όπου συμμετέχουν διπλοί ή τριπλοί δεσμοί.

Όταν ένα μόριο περιέχει περισσότερα από ένα χειρόμορφα κέντρα τότε υπάρχουν περισσότερα από δύο πιθανά στερεοϊσομερή, με τέσσερις διαφορετικές δομές και συνεπώς η ταυτοποίηση τους είναι πολύπλοκη και δύσκολη. Για παράδειγμα, η 2,3,4-τριυδροξυβουτανάλη έχει τις πιο κάτω 4 δομές (**Σχήμα 2.5**). Οι δομές 1 (D-ερυθρόζη) και 2 (L-ερυθρόζη) έχουν τη σχέση ειδώλου-αντικειμένου και για το λόγο αυτό είναι εναντιομερή και οπτικώς ενεργά. Το ίδιο ισχύει και για τις δομές 3 (D-θρεόζη) και 4 (L-θρεόζη). Παρόλ' αυτά, οι δομές 3 και 4 δεν είναι κατοπτρικά είδωλα των δομών 1 και 2, αλλά μόνο διαστερομερή. Επίσης, εκτός από τα ασύμμετρα άτομα άνθρακα, κάποιες χειρόμορφες ενώσεις μπορεί να έχουν αξονική, επίπεδη ή ελικοειδή χειρομορφία.



Σχήμα 2.5. Στερεοϊσομερείς δομές της 2,3,4-τριδροξυβουτανάλης.

2.2.1 Χειρόμορφα Φάρμακα

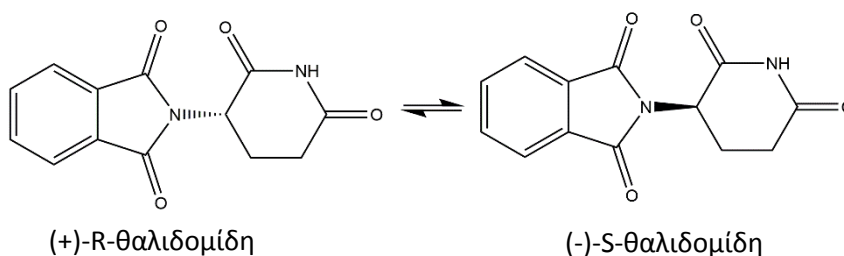
Οι περισσότερες φαρμακευτικές ουσίες αποτελούνται από ένα ή περισσότερα χειρόμορφα κέντρα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την οπτική ενεργότητα του φαρμάκου. Τα δύο εναντιομερή αλληλοεπιδρούν διαφορετικά με χειρόμορφους στόχους, όπως υποδοχείς, ένζυμα και ιοντικά κανάλια, με αποτέλεσμα να διαφέρουν ως προς τις φαρμακοκινητικές και τοξικολογικές τους ιδιότητες. Επίσης, στη φύση, τα περισσότερα μόρια βρίσκονται μόνο στη μια εναντιομερή τους μορφή. Συγκεκριμένα, τα αμινοξέα βρίσκονται στην L-μορφή, ενώ τα σάκχαρα στην D-μορφή. Έτσι, οι ζωντανοί οργανισμοί εμφανίζουν διαφορετική απόκριση σε ένα από τα εναντιομερή των χειρόμορφων ενώσεων.

Περίπου το 40% των συνθετικών φαρμακευτικών σκευασμάτων είναι χειρόμορφα. Σε πρόσφατη μελέτη που έχει δημοσιευτεί, βρέθηκε ότι οι παγκόσμιες πωλήσεις χειρόμορφων φαρμάκων το 2000 έφταναν τα \$133 δις και μέχρι το 2008 αυξήθηκαν στα \$200 δις [46]. Σε μια άλλη, πιο πρόσφατη μελέτη προβλέπεται ότι το 95% των φαρμάκων που θα βγουν στην αγορά μέχρι το 2020, θα είναι χειρόμορφες [47].

Παρόλο που τα εναντιομερή μιας χειρόμορφης ένωσης έχουν την ίδια χημική δομή, τα περισσότερα παρουσιάζουν διαφορετικές βιολογικές, φαρμακολογικές και τοξικές

ιδιότητες. Ωστόσο, πέρασε περίπου ένας αιώνας από την ανακάλυψη της χειρομορφίας μέχρι την κατανόηση του ρόλου που παίζει η χειρομορφία στη φαρμακευτική βιομηχανία, και κατά συνέπεια στους ζωντανούς οργανισμούς. Μέχρι τη δεκαετία του '80, ενώ ήταν γνωστό ότι τα εναντιομερή πολλές φορές εμφανίζουν διαφορετική δραστηριότητα, η στερεοεκλεκτικότητα των χειρόμορφων φαρμάκων ήταν ένα θέμα που δε λαμβανόταν υπόψη [48-50].

Το παράδειγμα σταθμός στον τομέα της φαρμακευτικής ανάλυσης και των χειρόμορφων φαρμακευτικών ουσιών είναι αυτό της θαλιδομίδης. Τη δεκαετία του '60, η θαλιδομίδη ήταν μια συνθετική φαρμακευτική ουσία, της οποίας το ρακεμικό της μίγμα χορηγείτο ως κατασταλτικό της ναυτίας στις εγκυμονούσες. Το φάρμακο αυτό όμως αποδείχθηκε ότι προκαλούσε τερατογενέσεις. Αρχικά, μέσα από μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια και κουνέλια, βρέθηκε ότι και τα δύο εναντιομερή της θαλιδομίδης δρούσαν τόσο τερατογενετικά, όσο και κατασταλτικά [51]. Στη συνέχεια, ανακαλύφθηκε ότι μόνο το ένα από τα δύο εναντιομερή ήταν αυτό που προκαλούσε τερατογενέσεις, ενώ το άλλο ήταν η δραστική μορφή. Πιο συγκεκριμένα, το S- εναντιομερές είναι τερατογόνο, ενώ το καθαρό R-εναντιομερές δρα ως κατασταλτικό, και έτσι μέχρι πρόσφατα, υπήρχε η εντύπωση ότι εάν το φαρμακευτικό σκεύασμα περιείχε μόνο το R-εναντιομερές της θαλιδομίδης, τότε το τραγικό αυτό γεγονός θα είχε αποφευχθεί [52]. Τελικά, ανακαλύφθηκε ότι τα εναντιομερή της θαλιδομίδης μετατρέπονται το ένα προς το άλλο (**Σχήμα 2.6**). Συγκεκριμένα, τα εναντιομερή της θαλιδομίδης υπόκεινται σε αυθόρμητη υδρόλυση, αλλά και γρήγορη χειρόμορφη αναστροφή σε φυσιολογικές τιμές pH [53, 54]. Άρα, μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό λαμβάνει χώρα ρακεμοποίηση και ως αποτέλεσμα παραγωγή του τερατογόνου S-εναντιομερούς. Παρόλο που στις μέρες μας δε χορηγείται ως κατασταλτικό, η θαλιδομίδη και κάποια παράγωγα της χρησιμοποιούνται κυρίως για τη θεραπεία ορισμένων καρκίνων (πολλαπλό μυέλωμα) και μιας επιπλοκής της λέπρας [55].



Σχήμα 2.6. Στερεοχημικές δομές των εναντιομερών της θαλιδομίδης και μετατροπή του ενός στο άλλο.

Μετά από αυτό το τραγικό γεγονός, αναπτύχθηκε σε μεγάλο βαθμό η μελέτη της σημασίας της στερεοεκλεκτικότητας στη φαρμακοδυναμική. Συνοπτικά, υπάρχουν τέσσερις διαφορετικοί πιθανοί τρόποι επίδρασης των εναντιομερών μιας φαρμακευτικής ουσίας [1, 56]. Οι τρόποι επίδρασης των δύο εναντιομερών μπορεί να είναι:

- i. Μόνο το ένα εναντιομερές να έχει φαρμακολογική δράση, ενώ το άλλο μπορεί να είναι μη-δραστικό ή να εμφανίζει τοξική δράση. Το περισσότερο δραστικό εναντιομερές ονομάζεται 'eutomer', ενώ το άλλο που είναι λιγότερο δραστικό ονομάζεται 'distomer'. Παράδειγμα: το S-indoprofen είναι φαρμακολογικά δραστικό, ενώ το R-εναντιομερές είναι μη-δραστικό [57]. Επίσης, το S-ibuprofen λειτουργεί ως αναστολέας της κυκλοοξυγενάσης (Cyclooxygenase, COX), ενώ το R-ibuprofen δεν είναι αναστολέας COX [58].
- ii. Και τα δύο εναντιομερή μπορεί να έχουν σχεδόν ταυτόσημη ποιοτική και ποσοτική φαρμακολογική δράση.
- iii. Τα δύο εναντιομερή δύναται να έχουν παρόμοιες φαρμακολογικές ιδιότητες, ωστόσο, διαφέρουν στη δραστηριότητα που εμφανίζουν. Παράδειγμα: η S-warfarin έχει περίπου πέντε φορές μεγαλύτερη αντιπηκτική δραστηριότητα από το R-εναντιομερές της [59].
- iv. Τα εναντιομερή μπορεί να παρουσιάζουν εντελώς διαφορετικές φαρμακολογικές ιδιότητες. Παράδειγμα: η L-T4 χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του υποθυρεοειδισμού, ενώ η D-T4 δεν παρουσιάζει δράση στο βασικό μεταβολισμό, αλλά η δράση της έχει να κάνει με τη μείωση της χοληστερόλης, των φωσφολιπιδίων και της απολιποπρωτεΐνης Β και όλων των λιπιδίων [60].

Ως εκ τούτου, η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA), από το 1992 απαιτούν όπως κάθε εναντιομερές μελετάται ξεχωριστά για τις φαρμακολογικές και μεταβολικές του οδούς, όπως και το να υπάρχει εναντιομερική/οπτική καθαρότητα για χειρόμορφα μόρια, των οποίων τα εναντιομερή τους παρουσιάζουν διαφορετική ποιοτική και ποσοτική φαρμακολογική ή τοξικολογική δράση [61].

Για τους παραπάνω λόγους, η ανάπτυξη μεθόδων χειρόμορφου διαχωρισμού είναι ένα θέμα που απασχολεί τη φαρμακευτική βιομηχανία. Λόγω της δραματικής αύξησης των χειρόμορφων φαρμακευτικών ουσιών που υπολογίζεται να παρατηρηθεί μέχρι το 2020, η

αναζήτηση νέων, καλύτερων και αποδοτικότερων μεθόδων χειρόμορφου διαχωρισμού ολοένα και αυξάνεται.

2.2.2 Χειρόμορφοι Διαχωρισμοί

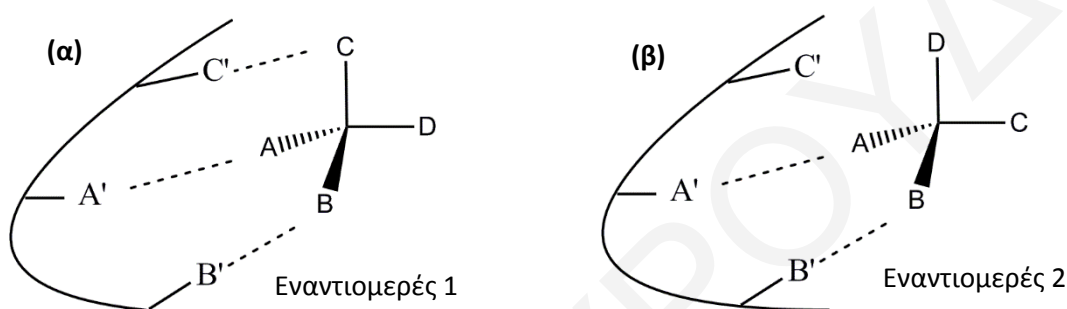
Οι μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην εναντιομερή ανάλυση, περιλαμβάνουν μη-χρωματογραφικές τεχνικές, όπως η πολωσιμετρία, ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance, *NMR*), η ισοτοπική αραίωση, η θερμοδομετρία και οι ανοσοχημικές τεχνικές, οι οποίες όμως έχουν ανάγκη από καθαρά δείγματα και έτσι δεν εμπλέκονται στο διαχωρισμό των εναντιομερών [62]. Έτσι, οι κυριότερες μέθοδοι διαχωρισμού που χρησιμοποιούνται τις τελευταίες δεκαετίες είναι οι χρωματογραφικές και οι ηλεκτροφορητικές. Η GC, η HPLC και η CE έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως με σκοπό τον εναντιομερή διαχωρισμό χειρόμορφων ενώσεων [63, 64].

Η εναντιοεκλεκτικότητα δημιουργείται από τις διάφορες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ του CS και των εναντιομερών. Όταν χρησιμοποιείται ένας CS, ο πρωταρχικός μηχανισμός συγκράτησης που δημιουργείται είναι η συμπλοκοποίηση με το CS. Η αλληλεπίδραση του CS με το ένα εναντιομερές της ουσίας προκαλεί την εκλεκτική συγκράτησή της σε χρωματογραφικά ή ηλεκτροφορητικά συστήματα. Έτσι, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός πολλών οπτικών ενεργών ισομερών [65, 66].

Το 1933, προτάθηκε ο ‘κανόνας των τριών σημείων’ (*three point rule*) από τους Easson και Stedman. Οι ερευνητές αυτοί πρότειναν έναν ελάχιστο αριθμό (τριών) αλληλεπιδράσεων που πρέπει να αναπτύσσονται μεταξύ του CS και του εναντιομερούς μορίου στόχου [67].

Δηλαδή, απαιτείται αναγνώριση του προσανατολισμού κατά μήκος των τριών αξόνων μέσα στο χώρο. Επομένως, τουλάχιστον τρία σημεία του επιλογέα πρέπει να αλληλεπιδρούν με τρία σημεία των εναντιομερών μορίων, τα οποία πρέπει να είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους, όπως είναι το δεξί γάντι με το δεξί χέρι ή το κλειδί με την κλειδαριά. Το ένα εναντιομερές μιας χειρόμορφης ένωσης θα πρέπει να μην πληρεί το μοντέλο των τριών σημείων σε αντίθεση με το άλλο εναντιομερές. Στο **Σχήμα 2.7** φαίνεται αυτή η διαφορά αλληλεπίδρασης δύο εναντιομερών μιας ένωσης με ένα CS. Στο **Σχήμα 2.7 (α)** παρουσιάζεται το ένα εναντιομερές, το οποίο συμπλοκοποιείται με το χειρόμορφο επιλογέα σε τρία σημεία. Αντίθετα, το άλλο εναντιομερές (**Σχήμα 2.7 (β)**) έχει μόνο δύο σημεία

αλληλεπίδρασης με τον επιλογέα. Όπως και να διαταχθεί ή περιστραφεί, μόνο με αυτά τα δύο σημεία μπορεί να συμπλοκοποιηθεί. Αν και αυτές οι αλληλεπιδράσεις αρχικά πίστευαν ότι θα πρέπει να είναι ελκτικές, μια πιο καινούρια θεωρία αναφέρει ότι οι απωστικές δυνάμεις (π.χ. στερεοχημικές παρεμποδίσεις) δρουν ως ένα άλλο είδος αλληλεπίδρασης. Μέχρι και δύο από τις τρεις αλληλεπιδράσεις μπορούν να είναι απωστικές, εάν η τρίτη αλληλεπίδραση είναι τόσο ισχυρή ώστε να σχηματιστεί ένα από τα δύο πιθανά σύμπλοκα εναντιομερούς αναλύτη-CS [68, 69].



Σχήμα 2.7. Το μοντέλο τριών σημείων αλληλεπίδρασης. (α) Εναντιομερές 1, το οποίο φέρει τρεις ομάδες που ταιριάζουν ακριβώς σε τρία σημεία του CS. (β) Εναντιομερές 2, στο οποίο μετά από πιθανές περιστροφές, μόνο δύο ομάδες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με δύο σημεία του CS.

Οι μοριακές αλληλεπιδράσεις που μπορεί να αναπτυχθούν μεταξύ των εναντιομερών και του CS είναι πολλές και η ισχύς τους διαφέρει ανάλογα με τον τύπο της αλληλεπίδρασης. Ο ισχυρότερος τύπος αλληλεπίδρασης είναι ηλεκτροστατικής φύσης. Ακολουθούν οι δεσμοί υδρογόνου, οι οποίοι αναπτύσσονται, συνήθως, μεταξύ ενός υδρογόνου μιας υδροξυλομάδας ή αμινομάδας και ενός ατόμου οξυγόνου ή αζώτου ή φθορίου. Οι στερεοχημικές παρεμποδίσεις είναι ένα ακόμα είδος αλληλεπίδρασης. Στην περίπτωση αυτή οι δυνάμεις είναι απωστικές. Λιγότερο ισχυρές είναι οι π-π αλληλεπιδράσεις. Για παράδειγμα, αρωματικά συστήματα, τα οποία περιέχουν υποκαταστάτες-δότες ηλεκτρονίων, έχουν την τάση να προσφέρουν τα π-ηλεκτρόνια τους σε άλλα συστήματα που είναι φτωχά σε ηλεκτρόνια. Έτσι, σε μια χειρόμορφη αναγνώριση τα π-ηλεκτρόνια μιας ομάδας δότη ηλεκτρονίων του εναντιομερούς αλληλεπιδρούν με τα π-ηλεκτρόνια μιας ομάδας δέκτη ηλεκτρονίων, και το αντίστροφο. Οι δυνάμεις ιόντος-διπόλου, ακολουθούν σε σειρά ισχύος, καθώς και οι διπόλου-διπόλου. Τέλος, οι λιγότερο ισχυρές αλληλεπιδράσεις είναι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις [69].

2.3 Χειρόμορφοι Επιλογείς (Chiral Selectors, CSs)

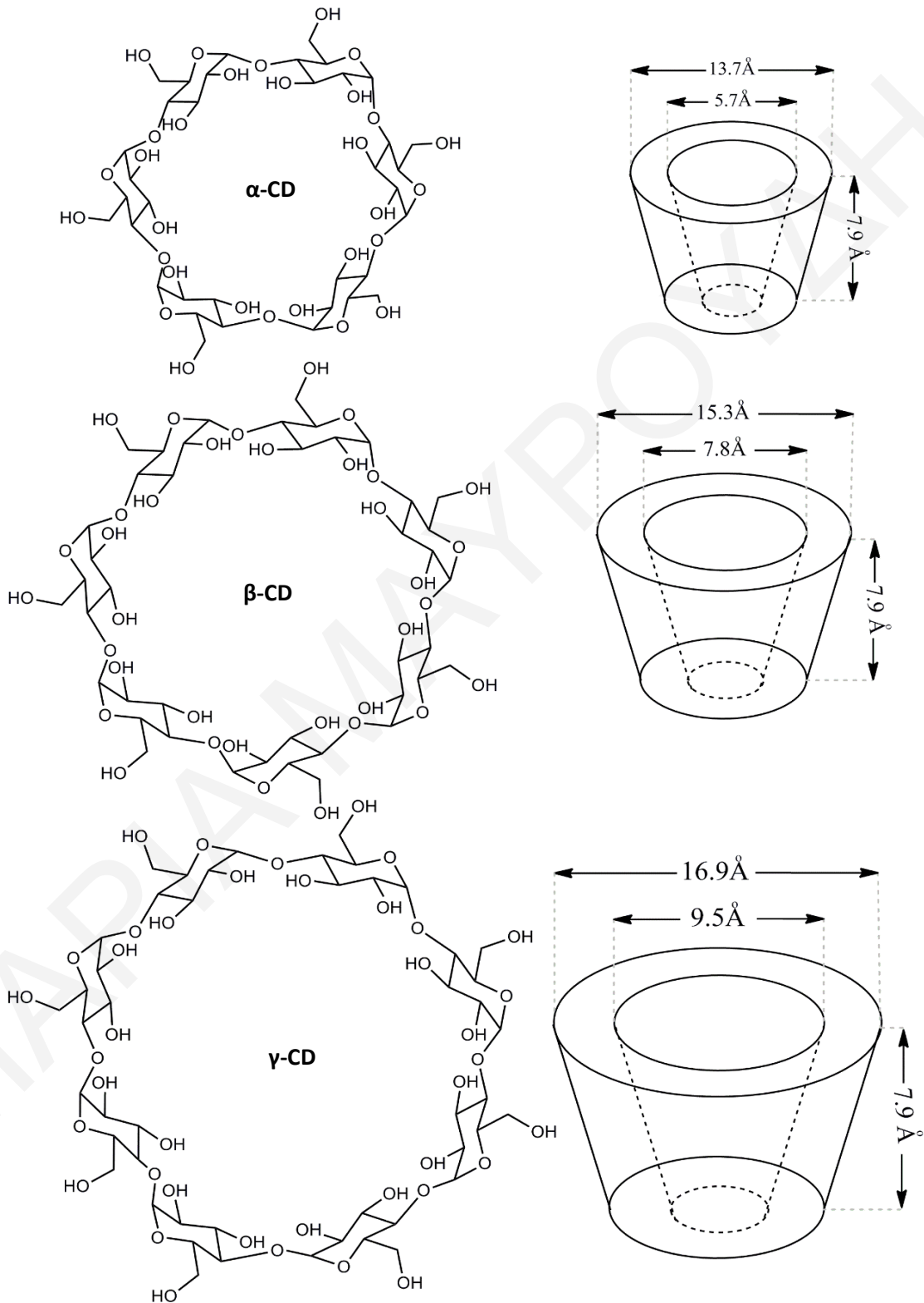
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για το διαχωρισμό χειρόμορφων ενώσεων. Προκειμένου να υπάρξει εναντιομερής διαχωρισμός είναι απαραίτητη η παρουσία ενός μορίου, το οποίο θα αλληλεπιδρά καλύτερα με το ένα από τα δύο εναντιομερή. Δηλαδή, με τη χρήση ενός τουλάχιστον CS δημιουργούνται αντιστρεπτά διαστεreoϊσομερή σύμπλοκα μεταξύ του κάθε εναντιομερούς ξεχωριστά με τον CS. Ο διαχωρισμός προκύπτει λόγω διαφορετικής κινητικότητας των σχηματιζόμενων διαστεreoϊσομερών συμπλόκων. Οι CSs μπορούν, είτε να είναι δεσμευμένοι πάνω στα τοιχώματα της στήλης (Chiral Stationary Phase, CSP), είτε να προστίθενται μέσα στην κινητή φάση. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί και προταθεί πάρα πολλοί τύποι CSs. Οι διάφοροι τύποι CSs που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι οι CDs, τα επιφανειοδραστικά μικρά μόρια και επιφανειοδραστικά πολυμερή, τα αντιβιοτικά και οι ολιγο- και πολυσακχαρίτες [14, 16].

2.3.1 Κυκλοδεξτρίνες (Cyclodextrins, CDs)

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι CSs είναι οι CDs, οι οποίες μπορεί να είναι ουδέτερες, φορτισμένες, μπορούν να συνδυαστούν μεταξύ τους ή να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με άλλα χειρόμορφα πρόσθετα. Επίσης, είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες, τόσο σε χρωματογραφικές, όσο και ηλεκτροφορητικές τεχνικές διαχωρισμού.

Οι CDs είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες αποτελούμενοι από μόρια α-D-γλυκοπυρανόζης που συνδέονται με α-1-4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Το σχήμα τους δεν είναι κυλινδρικό, αλλά προσομοιάζει το σχήμα κόλουρου κώνου γεγονός που οφείλεται στην έλλειψη ελεύθερης περιστροφής των δεσμών που συνδέουν τις μονάδες γλυκοπυρανόζης. Κάθε μονάδα γλυκοπυρανόζης έχει 3 υδροξυλομάδες. Δύο από αυτές είναι δευτεροταγείς και εντοπίζονται στον άνθρακα 2 και 3 και μια είναι πρωτοταγής στη θέση C-6. Οι υδροξυλομάδες αυτές καθιστούν υδρόφιλη την εξωτερική επιφάνεια των κυκλοδεξτρινών και είναι υπεύθυνες για την διαλυτότητά τους στο νερό. Οι πρωτοταγείς υδροξυλομάδες εντοπίζονται στο στενό άκρο του κώνου, ενώ οι δευτεροταγείς στο ευρύτερο άκρο. Το εσωτερικό των CDs είναι υδρόφοβο, λόγω της παρουσίας των αιθερικών οξυγόνων στο O-4 και των υδρογόνων που είναι προσαρτημένα στους άνθρακες C-3 και C-5, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια κοιλότητα για τον εγκλωβισμό υδρόφοβων μορίων. Οι CDs μπορούν

να αλληλεπιδράσουν με μόρια κατάλληλου μεγέθους για το σχηματισμό συμπλόκων έγκλεισης.



Σχήμα 2.8. Δομές και διαστάσεις των τριών φυσικών CDs.

Οι πιο γνωστές φυσικές CDs είναι οι α -, β -, γ - CD. Η α -CD αποτελείται από 6 μόρια γλυκοκυρανόζης, η β -CD από 7 και η γ -CD από 8, όπως απεικονίζονται στο **Σχήμα 2.8**. Διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον αριθμό των μονάδων γλυκοκυρανόζης στη δομή τους. Οι CDs διακρίνονται σε δύο ομάδες: τις φυσικές και τις παραγωγοποιημένες. Οι πιο κοινές φυσικές CDs είναι οι α -CD, β -CD, και γ -CD. Ο αριθμός των τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών που έχουν παραχθεί και μελετηθεί είναι μεγάλος. Οι τροποποιημένες CDs παράγονται με την αντίδραση χημικών μορίων με τις υδροξυλομάδες των κυκλοδεξτρινών. Οι υδροξυλομάδες στον C-6 έχουν την μεγαλύτερη ικανότητα αντίδρασης, ενώ οι υδροξυλομάδες στον C-3 έχουν την μικρότερη. Παρόλ' αυτά, μεταβάλλοντας τις συνθήκες της αντίδρασης, όπως το pH, τη θερμοκρασία και τα αντιδραστήρια, η αντίδραση παραγωγοποίησης κατευθύνεται προς μια συγκεκριμένη πορεία, ώστε να επιτευχθεί η εκλεκτική υποκατάσταση μιας συγκεκριμένης ομάδας. Οι τροποποιήσεις των CDs έχουν ως στόχο το σχηματισμό παραγώγων των CDs με επιπλέον σημεία αλληλεπίδρασης ή και διαφορετική πολικότητα. Θεικές CDs (Sulfated CDs, S-CDs), καρβοξυμεθυλικές CDs (Carboxymethyl CDs, CM-CDs), αλκυλικές και αρωματικές CDs έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως CSs στην HPLC και στην CE για το χειρόμορφο διαχωρισμό ουσιών [64, 70].

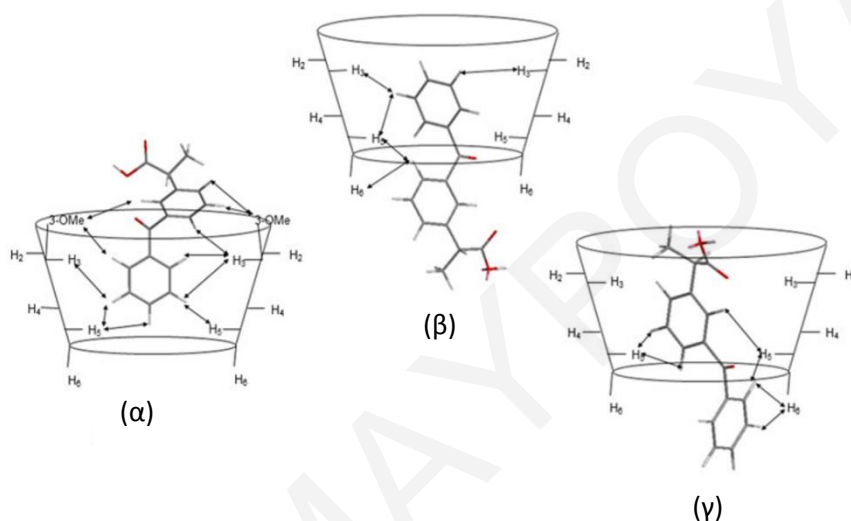
2.3.1.1 Χρήση των CDs σε Χειρόμορφους Διαχωρισμούς στην CE

Η β -CD χρησιμοποιείται πιο συχνά στους εναντιομερείς διαχωρισμούς στην CE, σε σχέση με τις άλλες φυσικές CDs, λόγω του μεγέθους της κοιλότητάς της, που επιτρέπει το σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού με τους περισσότερους αναλύτες [37, 71-75]. Οι Song *et al.* [71] πέτυχαν το χειρόμορφο διαχωρισμό και τον προσδιορισμό της DL-πενικιλλαμίνης, σε φαρμακευτικά σκευάσματα, χρησιμοποιώντας β -CD ως CS. Η ποσοτικοποίηση των πρότυπων D- και L-πενικιλλαμίνης πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων του φαρμάκου, σε τρεις τιμές pH (όξινο, ουδέτερο, βασικό). Τα όρια ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) βρέθηκαν να είναι 2,58 $\mu\text{g/ml}$ σε όξινο pH και 1,41 $\mu\text{g/ml}$ σε βασικό pH. Οι Sánchez-Hernández *et al.* [72] χρησιμοποίησαν διάφορες ουδέτερες CDs για να αναπτύξουν μια μέθοδο CE-ESI-MS² για τον προσδιορισμό εναντιομερών των αμινοξέων. Με τη χρήση δύο φυσικών CDs, τις β -CD και γ -CD, επιτεύχθηκε ο εναντιομερής διαχωρισμός 14 αμινοξέων με διαχωριστικές ικανότητες πάνω από 1,0 και LODs μεταξύ 0,02 και 0,8 μM . Η φυσική α -CD, σε συγκέντρωση 10 mM (pH 2) χρησιμοποιήθηκε για τον εναντιομερή διαχωρισμό της τριμπραμίνης, με εφαρμογή της

μεθόδου σε δείγματα αίματος και ούρων [76]. Όσον αφορά τη φυσική γ -CD, σε δημοσιεύσεις των τελευταίων ετών δεν έχει προσδιοριστεί ως ο βέλτιστος CS για εναντιομερείς διαχωρισμούς, και αυτό πιθανότατα να οφείλεται στο μεγάλο μέγεθος της κοιλότητάς της, το οποίο δεν επιτρέπει αποτελεσματικές στερεοεκλεκτικές αλληλεπιδράσεις με τους περισσότερους αναλύτες [14].

Παρά το γεγονός ότι οι φυσικές CDs αποδείχθηκαν ότι έχουν καλές εναντιοεκλεκτικές ικανότητες, οι εφαρμογές τους αυξήθηκαν περαιτέρω με τη σύνθεση διάφορων παραγώγων τους. Διάφορες ουδέτερες CDs έχουν εφαρμοστεί στην CE σε εναντιομερείς διαχωρισμούς ενώσεων, με την HP- β -CD να είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ουδέτερο παράγωγο των CDs. Οι El-Gizawy *et al.* [77] χρησιμοποίησαν 10 mM HP- β -CD για το διαχωρισμό των εναντιομερών της ερβουμίνης της περινδοπρίλης (perindopril erbumine). Έπειτα, η μέθοδος που αναπτύχθηκε, εφαρμόστηκε σε πρώτη ύλη και σε εμπορικά διαθέσιμα δισκία που περιείχαν ρακεμικό μίγμα ερβουμίνης της περινδοπρίλης, για τον προσδιορισμό της S-περινδοπρίλης. Σε μια άλλη μελέτη, διερευνήθηκε ο εναντιομερής διαχωρισμός του αντικαταθλιπτικού και βασικού φαρμάκου της ντουλοξετίνης με τη χρήση 15 ουδέτερων CDs ως CSs σε όξινα pHs στην CE [78]. Η HP- β -CD και η μεθυλιωμένη- γ -CD (Methyl- γ -CD, M- γ -CD) έδωσαν τους βέλτιστους διαχωρισμούς για τη ντουλοξετίνη με διαχωριστική ικανότητα 1,6 και στις δύο περιπτώσεις. Παρά το γεγονός ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στο χρόνο ανάλυσης, όταν χρησιμοποιήθηκε η HP- β -CD, αντί της M- γ -CD, η σειρά έκλουσης των εναντιομερών αντιστράφηκε. Όταν έγινε χρήση της HP- β -CD εκλούστηκε πρώτα το R-εναντιομερές, ενώ στην περίπτωση της M- γ -CD ήταν αυτό που εκλούστηκε δεύτερο. Αυτό εξηγήθηκε με το γεγονός ότι τα σύμπλοκα εναντιομερούς-CD που σχηματίστηκαν είχαν διαφορετικές ηλεκτροφορητικές ευκινήσεις. Τα μεθυλιωμένα παράγωγα των CDs, επίσης χρησιμοποιούνται συχνά στην CE. Μια μελέτη που διεξάχθηκε για τον εναντιομερή διαχωρισμό του κετοπροφαινίου, χρησιμοποίησε τρία παράγωγα των TM-CDs (TM- α -CD, TM- β -CD και TM- γ -CD) [79]. Παρατηρήθηκε ότι η σειρά έκλουσης των εναντιομερών του κετοπροφαινίου διαφοροποιείτο ανάλογα με το μέγεθος της κοιλότητας της CD. Ως εκ τούτου, με τις TM- α -CD και TM- β -CD το R-εναντιομερές εκλούστηκε πρώτο, ενώ όταν η TM- γ -CD χρησιμοποιήθηκε, η μετανάστευση των δύο εναντιομερών αναστράφηκε, με το S-εναντιομερές να εκλούεται πρώτο. Η αλλαγή στη δομή των συμπλόκων που δημιουργήθηκαν μεταξύ των εναντιομερών και των CSs επιβεβαιώθηκε με πειράματα NMR. Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 2.9 (α)**, όταν η

κετοπροφαίνη συμπλοκοποιήθηκε με την TM- α -CD, εισήλθε στην κοιλότητα από την ευρεία δευτεροταγή πλευρά της, με το ήμισυ του βενζολίου να βρίσκεται βαθιά μέσα στην κοιλότητα της CD, ενώ στη δεύτερη περίπτωση (**Σχήμα 2.9 (β)**) τα τμήματα του φαινυλίου και του αλκυλίου του κετοπροφαίνιου εισήλθαν στην κοιλότητα από την στενότερη πρωτοταγή πλευρά της TM- β -CD. Στην τρίτη και τελευταία περίπτωση, ο αναλύτης εισήλθε στην κοιλότητα της TM- γ -CD από την στενότερη πλευρά με τον βενζολικό δακτύλιο να βρίσκεται εκτός (**Σχήμα 2.9 (γ)**).

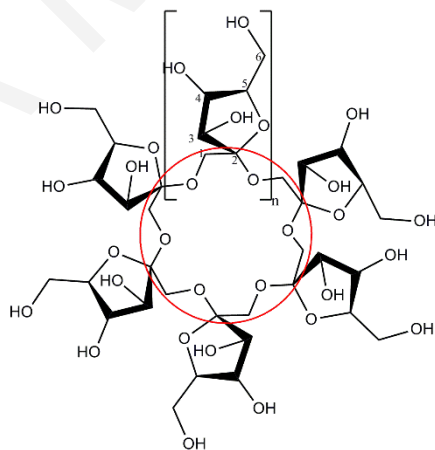


Σχήμα 2.9. Δομές των συμπλόκων κετοπροφαίνιου/TM-CD όπως προέκυψαν από τα φάσματα 1D ROESY. (α) Κετοπροφαίνιο/TM- α -CD, (β) Κετοπροφαίνιο/TM- β -CD και (γ) Κετοπροφαίνιο/TM- γ -CD [79].

2.3.2 Κυκλοφρουκτάνες (Cyclofructans, CFs)

Οι CFs είναι μια ομάδα μακροκυκλικών ολιγοσακχαριτών. Είναι προϊόντα της ενζυμικής “πέψης” (enzymatic digestion) της ιουλίνης από ένα εξωκυτταρικό ένζυμο (φρουκτανοτρανσφεράση) [80, 81]. Υπάρχουν δύο γενικά είδη εφαρμογής των CFs. Οι CFs έχουν χρησιμοποιηθεί ως CSs. Η πρώτη χρήση τους ως CSs έγινε το 1998 από τους Sawada *et al.*, διαχωρίζοντας τα εναντιομερή διάφορων αμινοξέων με τη χρήση της τεχνικής MS [82]. Παρόλ’ αυτά, δεν ακολούθησαν άλλες μελέτες εφαρμογής στους χειρόμορφους διαχωρισμούς. Μόλις πρόσφατα έχουν κατασκευαστεί στήλες HPLC που περιέχουν ως CSPs διάφορα παράγωγα CFs [83-90], ενώ στην CE ελάχιστες μελέτες έχουν δημοσιευτεί [91-94].

Οι CFs είναι ισομερή με τις CDs. Ωστόσο, σε αντίθεση με τις CDs, οι οποίες έχουν ένα κωνικό σχήμα, οι CFs σχηματίζουν μια δομή δίσκου με μια κεντρική εσοχή [95]. Επίσης, οι CFs αποτελούνται από μονάδες D-φρουκτοφουρανόζης, οι οποίες είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους μέσω β -2,1 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η διάταξη αυτή έχει ως αποτέλεσμα, στο μόριο των CFs να σχηματίζεται ένας σκελετός αιθέρα στέμματος. Λόγω αυτού, οι CFs παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με τους γνωστούς αιθέρες στέμματος. Πιο συγκεκριμένα, η κύρια δομή των CFs αποτελείται από ένα σκελετό αιθέρα-στέμματος και μονάδες D-φρουκτοφουρανόζης, οι οποίες είναι συνδεδεμένες πάνω στον αιθερικό δακτύλιο σχηματίζοντας μια σπειροειδή διευθέτηση. Ο αιθερικός δακτύλιος μπορεί να έχει συνδεδεμένες 6, 7, ή 8 μονάδες φρουκτοφουρανόζης, σχηματίζοντας έτσι το CF-6, CF-7 και CF-8, αντίστοιχα. Στο **Σχήμα 2.10** φαίνονται οι δομές των φυσικών CF-6, CF-7 και CF-8. Οι υδροξυλομάδες των μονάδων της φρουκτοφουρανόζης είναι διευθετημένες πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι αλκυλομάδες του δακτυλίου είναι κάτω από το επίπεδο. Έτσι, η πάνω πλευρά θεωρείται σχετικά υδρόφιλη, ενώ η κάτω υδρόφοβη. Στην CE, μόνο μερικές μελέτες έχουν δημοσιευτεί χρησιμοποιώντας CFs ως CSs, λόγω του ότι η χρήση τους στους εναντιομερείς διαχωρισμούς, περιορίζεται κυρίως για κατιοντικούς αναλύτες που έχουν ως λειτουργικές ομάδες αμίνες [91, 96].



Σχήμα 2.10. Δομές των CFs. Για $n=1$ CF-6, $n=2$ CF-7 και $n=8$ CF-8.

2.3.3 Επιφανειοδραστικές Ουσίες

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες είναι μόρια με υδρόφοβα και υδρόφιλα τμήματα, τα οποία σχηματίζουν μικκύλια μέσα σε υδατικά διαλύματα, όταν αυτά βρίσκονται πάνω από μια συγκεκριμένη συγκέντρωση (κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση, *critical micellar concentration*, *CMC*). Σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες της *CMC*, οι επιφανειοδραστικές ουσίες βρίσκονται διασκορπισμένες μέσα στο διάλυμα ως ξεχωριστά μόρια. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στον αμφίφιλο χαρακτήρα (πολική υδρόφιλη κεφαλή και υδρόφοβη ουρά) των μορίων αυτών. Τα επιφανειοδραστικά και επιφανειοδραστικά πολυμερή κυρίως χρησιμοποιούνται στην CE, σε μια τεχνική η οποία καλείται MEKC. Τα μικκύλια είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ψευδοστατική φάση στην MEKC. Ο μηχανισμός διαχωρισμού, με αυτή τη τεχνική της CE, βασίζεται στην ηλεκτροφορητική ευκινησία των φορτισμένων ειδών και στην κατανομή των αναλυτών μεταξύ της μικκυλιακής ψευδοστατικής και της κινητής φάσης, μέσω δεσμών υδρογόνου, δυνάμεων διπόλου-διπόλου και διασποράς.

Με τον όρο επιφανειοδραστικά πολυμερή γίνεται λόγος για πολυμερισμένα επιφανειοδραστικά, τα οποία έχουν συνδεδεμένες υδρογονανθρακικές ουρές. Τα πολυμερή αυτά έχουν δομές παρόμοιες με τα μικκύλια, αλλά χωρίς την προϋπόθεση ότι για το σχηματισμό των μικκυλίων θα πρέπει η συγκέντρωση να είναι μεγαλύτερη από την *CMC*. Οι Wang και Warner ήταν οι πρώτοι που εφάρμοσαν τα επιφανειοδραστικά πολυμερή αντί των συνηθισμένων μικκυλίων στη MEKC [97]. Μετά από αυτό, τα επιφανειοδραστικά πολυμερή χρησιμοποιήθηκαν σε μεγάλο βαθμό στη MEKC [98-101].

Πρόσφατα, οι Tsiouri *et al.* [102] ανέπτυξαν μια μέθοδο MEKC για το χειρόμορφο διαχωρισμό της (\pm)-hyperzine A. Επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός των εναντιομερών χρησιμοποιώντας 0,2% w/v του διπεπτιδικού επιφανειοδραστικού πολυμερούς πολυ(νατριούχου L-λευκινικού – L-βαλινικού N-ενδεκυλεστέρα) (poly (sodium N-undecyl L-valine – L-leucine), *poly-(L-L)-SULV*) ως το CS. Σε μια άλλη μελέτη από τους Hadjistani *et al.*, το ίδιο επιφανειοδραστικό πολυμερές προστέθηκε μέσα στον BGE σε συγκέντρωση 1% w/v και διαχώρισε πλήρως τα εναντιομερή του πιπεκολικού οξέος ($R_s = 2,80$) [75].

2.3.4 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά θεωρούνται μια σημαντική κατηγορία CSs και η χρήση τους στην CE έχει αναφερθεί εκτενώς. Μια σειρά από επιστημονικές μελέτες έχουν δημοσιευτεί, μέχρι στιγμής, αποδεικνύοντας τη σημαντικότητα της χρήσης των αντιβιοτικών ως CSs, τόσο στην HPLC, όσο και στην CE [103-105]. Διάφορες κατηγορίες αντιβιοτικών έχουν αναφερθεί, και σε αυτές περιλαμβάνονται οι ανσαμυκίνες, οι μακρολίδες, οι λινκοσαμίδες, οι αμινογλυκοσίδες και οι β-λακτάμες. Κάθε κατηγορία αντιβιοτικών μπορεί να έχει διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Τα γλυκοπεπτιδικά αποτελούνται από ένα τμήμα αγλυκόνης, η οποία έχει τρεις ή τέσσερις μακροκυκλικούς δακτυλίους που σχηματίζουν μια χαρακτηριστική δομή που μοιάζει με καλάθι. Πάνω στο τμήμα της αγλυκόνης επισυνάπτονται σακχαρίτες, οι οποίοι μπορούν να περιστρέφονται ελεύθερα.

Τα γλυκοπεπτιδικά αντιβιοτικά είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη κατηγορία αντιβιοτικών και έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως CSs στην CE. Η βανκομυκίνη, που ανήκει στην κατηγορία των γλυκοπεπτιδικών αντιβιοτικών, έχει χρησιμοποιηθεί από τους Wang *et al.* [106], για το διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των στερεοϊσομερών του φολικού οξέος. Στην προκειμένη μελέτη, για την αποφυγή των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινομάδων στη δομή της βανκομυκίνης και των σιλανομάδων που βρίσκονταν στα εσωτερικά τοιχώματα της στήλης του τριχοειδούς, χρησιμοποιήθηκε ως υλικό επικάλυψης ένα διάλυμα πολυ-(N, N - διμεθυλακρυλαμιδίου) (PDMA) για την ελαχιστοποίηση αυτών των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Μετά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου, εφαρμόστηκε σε ένα εμπορικό δείγμα φολικού ασβεστίου για τον προσδιορισμό και τον υπολογισμό της στερεοϊσομέρειας στο δείγμα. Διαπιστώθηκε ότι ένα ποσοστό 0,08% των στερεοϊσομερών περιλήφθηκε στο δείγμα του προϊόντος.

2.3.5 Όλιγο- και πολυ-σακχαρίτες

Ένας μεγάλος αριθμός ολιγο- και πολυ-σακχαριτών έχουν χρησιμοποιηθεί ως CSs στην HPLC και στην CE [107-109]. Οι χειρόμορφες μονάδες σακχάρων που περιέχουν, παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην εναντιομερική αναγνώριση και συνεπώς στην επίτευξη χειρόμορφων διαχωρισμών. Οι Francotte *et al.* παρατήρησαν ότι τα παράγωγα πολυσακχαριτών έχουν μεγαλύτερη εναντιοεκλεκτικότητα σε σχέση με τους μη-παραγωγοποιημένους πολυσακχαρίτες [110]. Τα κυριότερα παράγωγα είναι τα καρβαμικά,

τα οποία έχουν πολύ καλή εναντιοεκλεκτικότητα. Το υδρογόνο και το οξυγόνο του καρβαμικού εστέρα της κυτταρίνης, μέσω δεσμών υδρογόνου αλλά και διπόλου-διπόλου, αλληλεπιδρούν με τον αναλύτη επιτυγχάνοντας έτσι τον εναντιομερή του διαχωρισμό [111]. Γενικά, οι δεσμοί υδρογόνου, διπόλου-διπόλου και οι π-π αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποκαταστατών και των αναλυτών είναι οι κύριες αιτίες της εναντιοεκλεκτικής τους δράσης.

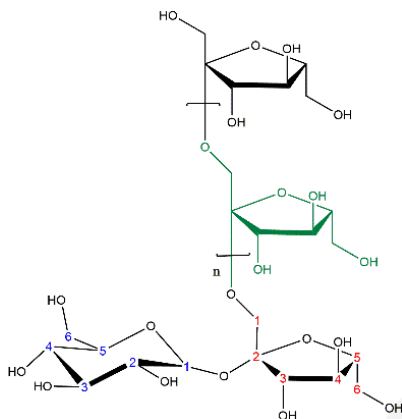
Στην HPLC, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα παράγωγα πολυσακχαριτών μεταξύ των οποίων παράγωγα κυτταρίνης, αμυλόζης, δεξτράνης, ινουλίνης, χιτίνης και χιτοζάνης. Τα παράγωγα των πολυσακχαριτών, συνήθως επικαλύπτονται πάνω σε πορώδη σωματίδια πυριτίας και χρησιμοποιούνται ως CSPs [111, 112]. Από τα παραπάνω παράγωγα των πολυσακχαριτών, αυτά της κυτταρίνης και της αμυλόζης έχουν δείξει ότι εμφανίζουν μεγαλύτερη εναντιοεκλεκτική ικανότητα.

Στην CE, η πρώτη φορά που χρησιμοποιήθηκαν υδατάνθρακες στους χειρόμορφους διαχωρισμούς, ήταν το 1992 από τους D'Hulst και Verbeke, οι οποίοι χρησιμοποίησαν μια σειρά από μαλτοδεξτρίνες ως CSs [113]. Όπως αναφέρουν, όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός πολυμερισμού τόσο μεγαλύτερη είναι η εναντιοεκλεκτικότητα. Μετά από αυτή τη μελέτη, πολλοί ιοντικοί αλλά και ουδέτεροι πολυσακχαρίτες χρησιμοποιήθηκαν στην CE [109, 114-116]. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι πολυσακχαρίτες είναι οι ιοντικοί πολυσακχαρίτες και συγκεκριμένα, η ηπαρίνη, θειική χονδροϊτίνη και θειική δεξτράνη [115, 116].

2.3.5.1 Ινουλίνη ως CS

Οι ινουλίνες (Inulins, *INs*) είναι μια ομάδα φυσικών πολυσακχαριτών που παράγονται από διάφορους τύπους φυτών. Ανήκουν σε μια κατηγορία των διαιτητικών ινών που είναι γνωστή ως φρουκτάνες. Η *IN* χρησιμοποιείται από ορισμένα φυτά, ως μέσο για την αποθήκευση ενέργειας και συνήθως βρίσκεται σε ρίζες ή ριζώματα. Τα περισσότερα φυτά που συνθέτουν και αποθηκεύουν *IN* δεν αποθηκεύουν άλλες μορφές υδατανθράκων, όπως το άμυλο. Η *IN* είναι τύπος φρουκτάνης, στον οποίο οι μονάδες σακχάρων συνδέονται με δεσμούς β(2→1) (Σχήμα 2.11). Λόγω των πολλών μονάδων σακχάρων που περιέχει στο μόριό της θα μπορούσε να προταθεί ως CS. Παρόλ' αυτά, η *IN* δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό για το σκοπό αυτό, πιθανότατα λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς της στο νερό, που έχει ως αποτέλεσμα, να γίνεται δυσκολότερη η επεξεργασία της. Στην CE, δεν έχει

δημοσιευτεί μέχρι σήμερα οποιαδήποτε μελέτη, στην οποία να έχει χρησιμοποιηθεί η IN ως CS. Έτσι, αποτελεί μια μεγάλη πρόκληση η ανάπτυξη νέων μεθόδων εναντιομερών διαχωρισμών με τη χρήση αυτού του CS.



Σχήμα 2.11. Δομή της IN.

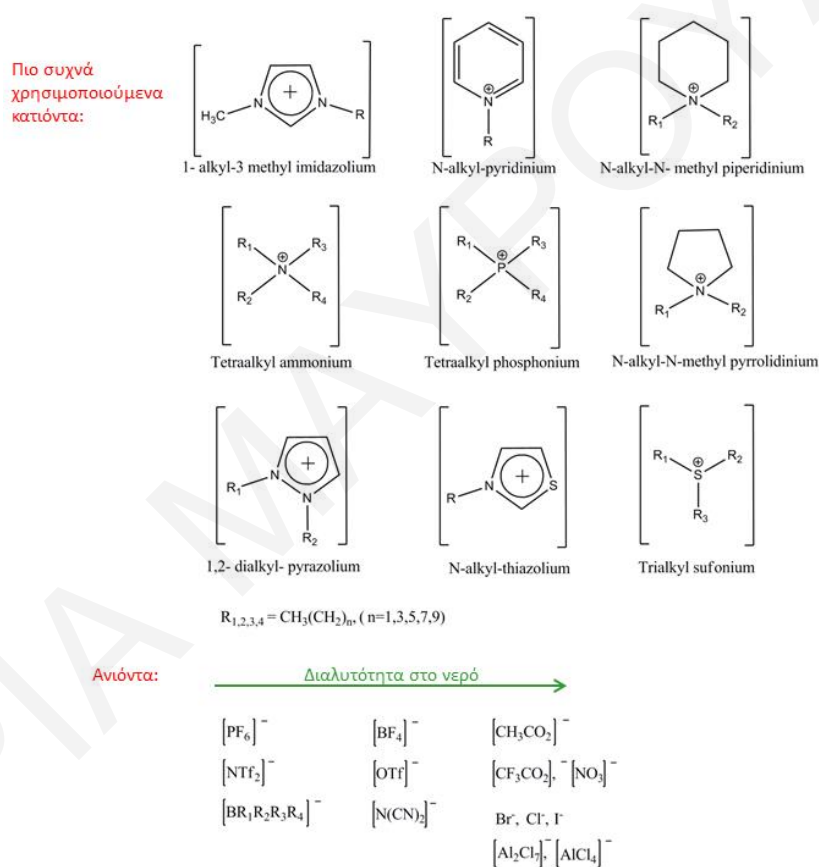
2.4 Ιοντικά Υγρά (Ionic Liquids, ILs)

Τα τελευταία χρόνια, τα ILs βρίσκουν πολλές εφαρμογές στο ευρύτερο επιστημονικό πεδίο. Ειδικότερα, η σύνθεση και οι εφαρμογές τους στον τομέα της Αναλυτικής Χημείας έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον. Για περισσότερο από μια δεκαετία, ένας μεγάλος αριθμός ILs έχει σχεδιαστεί και συντεθεί για τη χρήση τους σε εκχυλίσματα, στην GC, στην HPLC, στην CE, στην MS, στην φασματοσκοπία υπεριώδους, φθορισμού, Raman, NMR και στην ηλεκτροχημεία. Επιπρόσθετα, πολυάριθμες μελέτες έχουν δημοσιευτεί, επιβεβαιώνοντας τη σημαντικότητα της χρήσης των ILs. Μια από τις πιο σημαντικές χρήσεις τους είναι ως διαλυτικά μέσα, με σκοπό την ανάπτυξη πιο «πράσινων» μεθόδων (χημικές αντιδράσεις, απομόνωση, διαχωρισμός, ανίχνευση, ταυτοποίηση).

2.4.1 Χαρακτηριστικά και Ιδιότητες

Τα ILs είναι ιοντικές ουσίες με σημεία τήξεως από $-96\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ [117, 118]. Αποτελούνται από ιόντα, και στις περισσότερες περιπτώσεις από ένα οργανικό κατιόν και ένα οργανικό ή ανόργανο ανιόν. Γενικά, αποτελούνται από ογκώδη, μη συμμετρικά οργανικά κατιόντα, όπως ιμιδαζόλιο, πυρρόλιο, πυριδίνη, αμμώνιο ή φωσφόριο, καθώς και από διάφορα ανόργανα ή οργανικά ανιόντα, όπως τετραφθοροβορίδιο, οξικό ανιόν, ανιόν βρωμίου και χλωρίου.

Τα πιο γνωστά και ευρέως χρησιμοποιούμενα ILs είναι τα διϋποκατεστημένα αλκυλιμιδαζολικά άλατα (Σχήμα 2.12). Για τη σύνθεσή τους, συνήθως, πραγματοποιείται μια αλκυλίωση ενός μορίου, το οποίο, στη συνέχεια, θα αποτελεί το κατιόν του IL. Η αλκυλίωση λαμβάνει χώρα με ένα αλκυλαλογονίδιο, μέσω μιας SN2 αντίδρασης. Μετά από την αλκυλίωση, ακολουθεί εξουδετέρωση οξέος – βάσης ή αντίδραση μετάθεσης του άλατος αλογόνου με μια άλλη ομάδα. Η ομάδα αυτή μπορεί να είναι άλας μετάλλου της 1^{ης} ομάδας, ή αμμωνιακό άλας, ή άλας αργύρου. Το άλας επιλέγεται ανάλογα με το ανιόν που επιθυμείται να περιέχει το IL [119].



Σχήμα 2.12. Τα πιο συνήθη κατιόντα/ανιόντα που αποτελούν τα ILs και η ανάλογη διαλυτότητά τους στο νερό με βάση το ανιόν που περιέχουν.

Τα τελευταία χρόνια, τα ILs έχουν καταρτιστεί σε διάφορες εφαρμογές στον ευρύτερο τομέα, λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους. Σε αυτές περιλαμβάνονται, η θερμική σταθερότητα, που τα καθιστά μη εύφλεκτα, η μηδαμινή τάση ατμών, η δυνατότητα ανάμειξης με διάφορους διαλύτες, το μεγάλο εύρος στους συντελεστές ιξώδους των

διάφορων ILs και η χαμηλή τοξικότητά τους. Ορισμένες ιδιότητες εξαρτώνται κυρίως από το ανιόν, ενώ άλλες εξαρτώνται από το μήκος της αλυσίδας του αλκυλίου στο κατιόν, το σχήμα ή τη συμμετρία του [120, 121]. Έχουν ονομαστεί και ως ‘designer solvents’, προκειμένου να δείξουν τις πολλές διαφορές στις ιδιότητές τους που μπορούν να έχουν ανάλογα με την επιλογή του κατιόντος ή του ανιόντος του IL. Λόγω αυτής της ρυθμιζόμενης φύσης τους, αυξάνεται και η δυναμικότητά τους σε πολλές εφαρμογές [122-124].

2.4.2 Εφαρμογές

Εξαιτίας των πιο πάνω χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων των ILs, υπάρχει η δυνατότητα αλλαγής των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων τους, μέσω αλλαγής του ανιόντος, του κατιόντος του IL, ή του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται (υδατικό ή μη). Ως εκ τούτου, παρουσιάζουν πολύ μεγάλο ενδιαφέρον για εφαρμογές στο ευρύτερο επιστημονικό πεδίο.

Η χρήση των οργανικών διαλυτών για πολλές διαδικασίες (αντιδράσεις, οργανική σύνθεση κ.ά.) είναι απαραίτητη, ωστόσο αποτελούν σημαντικό πρόβλημα για την επίδραση που έχουν στο περιβάλλον. Έτσι, η ανάγκη για χρήση πράσινων μεθόδων οδήγησε αρκετούς επιστήμονες στη μελέτη των ILs ως «πράσινων» διαλυτών [124, 125]. Το ευρύ φάσμα ιδιοτήτων που έχουν και η ικανότητα ρύθμισης των ιδιοτήτων τους, αποτέλεσε το λόγο για τον οποίο έγιναν αρκετές έρευνες με στόχο την αντικατάσταση των πτητικών οργανικών ενώσεων (Volatile Organic Compounds, VOCs) και τη χρήση τους στη συνθετική χημεία, στην ηλεκτροχημεία, ακόμα και στην κατάλυση [126-128].

Τα ILs μπορούν, επίσης να χρησιμοποιηθούν στην εκχύλιση υγρού-υγρού για την απομάκρυνση παραγόντων ρύπανσης, εξαιτίας της μη διαλυτότητας κάποιων ILs στο νερό και την πολύ καλή διαλυτότητα πολλών οργανικών μορίων μέσα σ’ αυτά [129, 130]. Τα ILs βρίσκουν εφαρμογές και στις μεθόδους ανίχνευσης, και συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται ως υλικά μήτρας για το σύστημα MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, *MALDI*) [131].

Τα ILs έχουν επίσης προταθεί ως «πράσινοι» διαλύτες σε διάφορες χημικές αντιδράσεις και διεργασίες. Έχει αναφερθεί ότι αντιδράσεις, όπως η Friedel–Crafts και η Diels–Alder, παρουσιάζουν αύξηση της δραστηριότητας, καθώς και μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος όταν χρησιμοποιούνται συγκεκριμένα ILs ως «πράσινοι» διαλύτες [126, 132,

133]. Όμως, αξίζει να σημειωθεί ότι η περιβαλλοντική τους συμπεριφορά και η τοξικότητα τους δεν είναι απόλυτα γνωστή, ενώ δεν είναι όλα τα ILs που μπορούν να χαρακτηριστούν ως «πράσινα» [134]. Τα ILs έχουν προταθεί ως εναλλακτικοί διαλύτες για την επεξεργασία βιομάζας και συγκεκριμένα δυσδιάλυτων πολυσακχαριτών [135].

Πολύ σημαντική είναι, επίσης, η χρήση των ILs σε μεγάλο βαθμό στους τομείς της Αναλυτικής Χημείας και ειδικότερα στον τομέα των διαχωρισμών [136]. Τα τελευταία δέκα χρόνια, η εφαρμογή των ILs σε χρωματογραφικές μεθόδους έχει αποτελέσει σημαντικό αντικείμενο μελέτης. Τρεις από τις πιο σημαντικές είναι η GC, η HPLC και η CE. Τα ILs μπορούν να αποτελούν τη στατική φάση ή να είναι πρόσθετα της κινητής φάσης (HPLC και CE). Η δυνατότητα σύνθεσης των ILs επέτρεψε στους ερευνητές να παράξουν και να χρησιμοποιήσουν πολλά διαφορετικά ILs, μεταβάλλοντας τα κατιόντα και τα ανιόντα, παρατηρώντας τη διαφορετική τους συμπεριφορά στους διαχωρισμούς. Τα μοναδικά τους χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν και σε προηγούμενο υποκεφάλαιο, όπως η μικρή πτητικότητα, τα χαμηλά σημεία τήξεως και η σταθερότητα που παρουσιάζουν είναι μερικοί από τους λόγους που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης. Παρακάτω θα ακολουθήσει μια αναλυτικότερη βιβλιογραφική ανασκόπηση με ορισμένα παραδείγματα χρήσης τους σε διαχωρισμούς.

2.4.2.1 Βιβλιογραφική Ανασκόπηση-ILs στη Χρωματογραφία και Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδούς

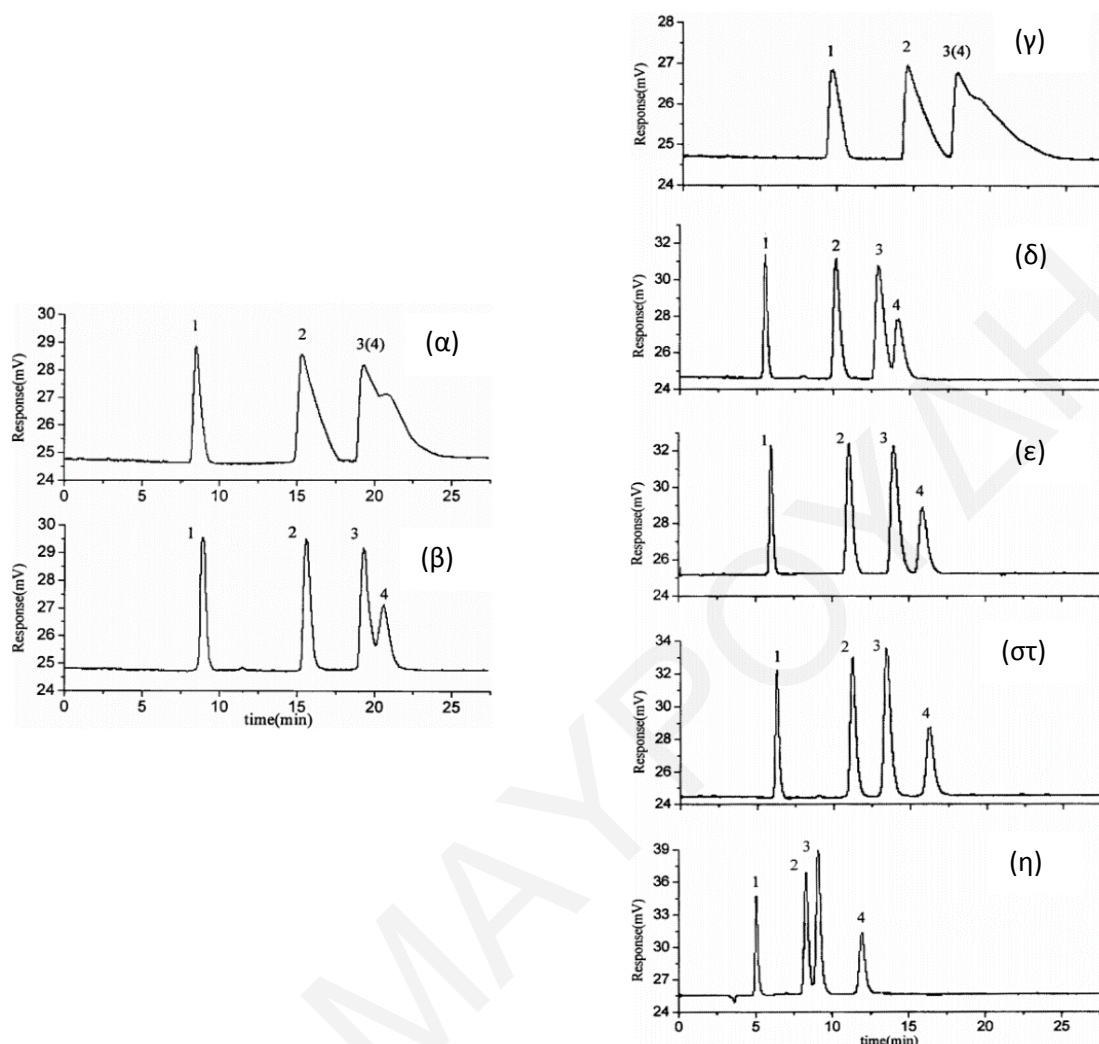
Τα πρώτα ILs που χρησιμοποιήθηκαν σε χρωματογραφική μέθοδο, ως στατικές φάσεις ήταν τα αλκυμιδαζολικά και συγκεκριμένα στην GC [17, 26]. Οι στατικές αυτές φάσεις έχουν τη δυνατότητα να λειτουργούν ως χαμηλής ή υψηλής πολικότητας στατικές φάσεις διαχωρίζοντας έτσι μη πολικές ή πολικές ουσίες, αντίστοιχα. Πολικοί αναλύτες μπορούν να αλληλεπιδρούν με πολικούς αναλύτες μέσω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, διπόλου-διπόλου και π-π αλληλεπιδράσεων, λόγω του αρωματικού χαρακτήρα του κατιόντος και του ανιόντος, ενώ μη πολικές ενώσεις μπορούν να αλληλεπιδρούν μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με τις αλκυλομάδες του ιμιδαζολικού κατιόντος. Μετά από αυτές τις μελέτες, κατασκευάστηκαν στήλες για την GC και χρησιμοποιήθηκαν ευρέως για την επίτευξη διαχωρισμών διάφορων ουσιών [137].

Σε σύντομο χρονικό διάστημα τα ILs χρησιμοποιήθηκαν και στην HPLC, λόγω των πολύ καλών αποτελεσμάτων που έδωσαν αρχικά στην GC. Στην HPLC, τα ILs χρησιμοποιούνται είτε ως στατική φάση είτε ως πρόσθετα στην κινητή φάση [138]. Η προσθήκη τους στην κινητή φάση έδειξε ότι έχουν σημαντική επίδραση στην αποδοτικότητα και στη διαχωριστική ικανότητα. Παρατηρήθηκε συγκεκριμένα ότι βελτιώνεται ο διαχωρισμός και μειώνεται το φαινόμενο ουράς (*tailing*), καθώς επίσης και η διεύρυνση κορυφών [27, 28]. Η βελτίωση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι τα ιμιδαζολικά κατιόντα του IL καλύπτουν τις ελεύθερες ομάδες σιλανόλης (-Si-O⁻) της στήλης, με αποτέλεσμα να εμποδίζουν τη δέσμευση βασικών ενώσεων (θετικά φορτισμένες σε χαμηλό pH). Συνεπώς, περιορίζουν το φαινόμενο *tailing* που θα προέκυπτε από μια τέτοια ισχυρή συγκράτηση [139]. Ταυτόχρονα, οι επιπλέον αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ αναλυτών και ILs (ηλεκτροστατικές, π-π, δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβες), δίνουν τη δυνατότητα για καλύτερους διαχωρισμούς. Στην περίπτωση όπου τα ILs χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα στην κινητή φάση, έχει παρατηρηθεί ότι η βελτίωση είναι μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρείται όταν χρησιμοποιούνται άλλα οργανικά πρόσθετα μέσα στην κινητή φάση. Συγκεκριμένα, σε μια μελέτη, κατά το μη-χειρόμορφο διαχωρισμό τεσσάρων εφεδρινών (norephedrine (1), ephedrine (2), pseudoephedrine (3), methylephedrine (4)), παρατηρήθηκε ότι, όταν στην κινητή φάση προστέθηκε το τετραφθοροβορικό 1-βουτυλο-3-μεθυλιμιδαζόλιο (1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, [BMIM][BF₄]), οι χρόνοι συγκράτησης ήταν μικρότεροι και οι κορυφές οξείες σε σύγκριση με αντίστοιχες κορυφές που λήφθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε το κοινώς χρησιμοποιούμενο πρόσθετο τριαιθυλαμίνη (Triethylamine, TEA) (Σχήμα 2.13) [27, 28].

Τα ILs χρησιμοποιήθηκαν και στην CE. Το γεγονός ότι είναι ιοντικές ενώσεις τα καθιστά ιδανικά ως ηλεκτρολύτες. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα της κινητής φάσης και ως στατικές φάσεις [29, 30, 120, 140]. Οι διαχωρισμοί, και σε αυτή την περίπτωση, ήταν καλύτεροι, έχοντας ως γνώμονα την αποδοτικότητα και τη διαχωριστική ικανότητα. Ο μηχανισμός δράσης των ILs μέσα στη στήλη είναι ο ίδιος με αυτόν στην HPLC, είτε είναι δεσμευμένα στη στήλη είτε είναι διαλυμένα μέσα στον BGE. Δηλαδή, τα κατιόντα ιμιδαζολίου δεσμεύονται πάνω στις αρνητικά φορτισμένες ομάδες σιλανόλης στο εσωτερικό του τριχοειδούς σωλήνα. Τότε, το συνολικό φορτίο της επιφάνειας τείνει να εκμηδενιστεί και γι' αυτό παρουσιάζεται μείωση στην EOF. Το λεπτό στρώμα που σχηματίζεται πάνω στην επιφάνεια της στήλης έχει ελαττωμένο, αν όχι και μηδενικό,

αρνητικό φορτίο. Ως εκ τούτου, η κίνηση των μορίων οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ηλεκτροφορητική ευκινησία και σε λιγότερο βαθμό στην ηλεκτροωσμωτική ευκινησία. Έτσι, κάθε φορά που προστίθεται IL, παρατηρείται μείωση στην EOF. Αυτό δίνει περισσότερο χρόνο στους αναλύτες να αλληλεπιδράσουν με τα ILs και έτσι παρατηρείται καλύτερη διαχωριστική ικανότητα [141-143]. Επίσης, όταν οι αναλύτες που μελετώνται είναι βασικοί (θετικά φορτισμένοι), όπως για παράδειγμα ουσίες που περιέχουν αμινομάδες, τότε, παρατηρείται δραματική βελτίωση της αποδοτικότητας των κορυφών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι θετικά φορτισμένοι αναλύτες αλληλεπιδρούν λιγότερο με τα αρνητικά φορτισμένα τοιχώματα της στήλης, τα οποία επικαλύπτονται από τα κατιόντα του IL, και έτσι οι κορυφές είναι λιγότερο διευρυμένες. Επιπρόσθετα, όταν οι αναλύτες είναι όξινοι (αρνητικά φορτισμένοι), όπως για παράδειγμα ενώσεις που περιέχουν καρβοξυλικά οξέα, παρατηρείται βελτίωση στη διαχωριστική ικανότητα. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στο ότι αυξάνονται κυρίως οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των αρνητικά φορτισμένων αναλυτών με τα κατιόντα του IL.

Η χρήση των ILs επεκτάθηκε και στη βελτίωση των χειρόμορφων διαχωρισμών. Διάφορα μη-χειρόμορφα ILs χρησιμοποιήθηκαν ως πρόσθετα, σε συνδυασμό με CSs (π.χ. CDs, επιφανειοδραστικά πολυμερή) [32, 33, 144]. Η προσθήκη των ILs μέσα στον BGE επηρεάζει κυρίως το χρόνο έκλουσης των αναλυτών, τη σειρά έκλουσης, καθώς και την αποδοτικότητα των κορυφών [144]. Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 2.14**, τα ILs βρίσκονται ελεύθερα μέσα στον BGE, με αποτέλεσμα να έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με τους αναλύτες, το CS και με τα τοιχώματα της αρνητικά φορτισμένης στήλης. Η επικάλυψη της αρνητικά φορτισμένης στήλης εμποδίζει τους θετικά φορτισμένους αναλύτες να αλληλεπιδρούν με τα τοιχώματα της στήλης, μειώνει την ευκινησία των αναλυτών μέσα σε αυτή, λόγω της μείωσης της EOF, δίνοντας έτσι περισσότερο χρόνο αλληλεπίδρασης με το CS. Επιπλέον, το IL μπορεί να αλληλεπιδρά με το CS σχηματίζοντας σύμπλοκα IL/CSs σε στοιχειομετρίες 1:1 ή 1:2, τα οποία ίσως να ευνοούν καλύτερα τους χειρόμορφους διαχωρισμούς [144, 145].

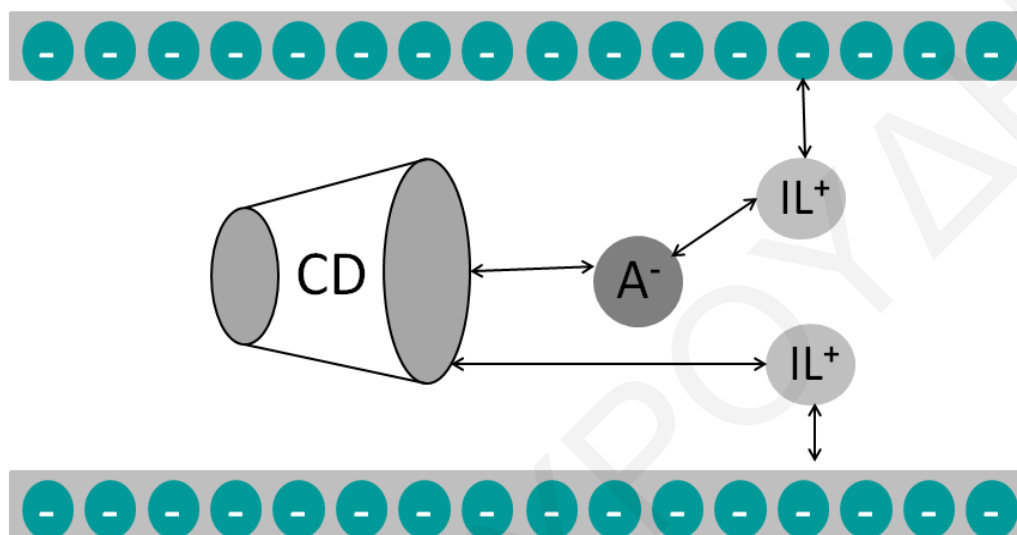


Σχήμα 2.13. Χρωματογραφήματα των εφεδρινών με πρόσθετο στην κινητή φάση: (α) 5,2 mM και (β) 62,4 mM TEA, (γ) 0 mM, (δ) 2,6 mM, (ε) 5,2 mM, (στ) 20,8 mM και (η) 62,4 mM [BMIM][BF₄] σε pH 3,0 [27].

2.4.2.2 Βιβλιογραφική Ανασκόπηση-CILs στη Χρωματογραφία και Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδούς

Τα CILs είναι μια υποκατηγορία των ILs, τα οποία έχουν ένα τουλάχιστον χειρόμορφο τμήμα. Συγκεκριμένα, το κατιόν, το ανιόν ή και τα δύο αυτά τμήματα μπορούν να είναι χειρόμορφα. Τα συγκεκριμένα ILs παρουσιάζουν αυξημένο ενδιαφέρον, εξαιτίας της ικανότητας που έχουν να διακρίνουν και να αλληλεπιδρούν διαφορετικά το ένα από τα δύο εναντιομερή ενός αναλύτη. Την τελευταία δεκαετία, υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον ως προς τη σύνθεση νέων CILs και εφαρμογή τους σε διάφορους τομείς, όπως τη χρήση

τους ως καταλύτες για την πραγματοποίηση ασύμμετρων αντιδράσεων [146-148], σε εκχυλίσεις [149], διαχωρισμούς με μεμβράνη [150], στις τεχνικές NMR [151-153], IR [154], φασματοσκοπία φθορισμού [151, 153, 155, 156], GC [11, 157-159], LC και CE [35, 37, 157, 160-170].



Σχήμα 2.14. Μηχανισμός χειρόμορφου διαχωρισμού αρνητικά φορτισμένου αναλύτη με τη χρήση CD και IL μέσα σε μια στήλη της CE.

Τα CILs έχουν πρόσφατα χρησιμοποιηθεί ως CSs, πρόσθετα στον BGE, και CSPs σε χρωματογραφικές και ηλεκτροφορητικές τεχνικές για την ανάλυση και διαχωρισμό χειρόμορφων ενώσεων. Θεωρούνται πολύ χρήσιμα στην εναντιομερή ανάλυση, λόγω του ότι συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των ILs με τις ιδιότητες χειρόμορφου τμήματος. Τα κυριότερα CILs που έχουν συντεθεί μπορεί να αποτελούνται από συνθετικά χειρόμορφα κατιόντα ή/και ανιόντα και από κάποια φυσικά-βιομόρια, όπως αμινοξέα, εστέρες αμινοξέων [25]. Πρόσφατα, μια νέα γενιά CILs που αποτελούνται από αμινοξέα και εστέρες αμινοξέων, συντέθηκε το 2005 από τους Tao et al. [171, 172]. Όπως αναφέρεται, η σύνθεση των συγκεκριμένων CILs τα καθιστά πιο «πράσινα» σε σύγκριση με τα κοινώς χρησιμοποιούμενα ILs, διότι ως πρόδρομα μόρια χρησιμοποιούνται «βιο-ανανεώσιμα υλικά» (*bio-renewable materials*), αντί συνθετικά χημικά μόρια [171]. Μέχρι τώρα, έχουν συντεθεί αρκετά CILs, των οποίων τα κατιόντα έχουν ως βάση αμινοξέα και εστέρες τους, όπως για παράδειγμα αλανίνη (Ala), μεθυλεστέρας της αλανίνης (AlaC₁), αιθυλεστέρας της αλανίνης (AlaC₂) και τερτ-βουτυλεστέρας της αλανίνης (AlaC₄) [151, 171, 172].

Σε μια πρόσφατη βιβλιογραφική μελέτη, το 2012 οι Payagala *et al.* [173] συνέταξαν μια βάση δεδομένων, στην οποία καταγράφηκαν οι δομές και οι φυσικές ιδιότητες 206 διαφορετικών CILs που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν κατά την περίοδο 2005-2012. Επίσης, διαφάνηκε ότι η έρευνα για ανάπτυξη νέων CILs ολοένα και αυξάνεται. Αυτό αποδεικνύει το πολύ μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον που κατέχουν τα CILs. Μέσα από μελέτες NMR και φασματοσκοπίας φθορισμού, έχει βρεθεί ότι αρκετά CILs εμφανίζουν εναντιομερική αναγνώριση ως προς κάποιες χειρόμορφες ενώσεις [153-155, 164].

Οι χειρόμορφοι διαχωρισμοί στη χρωματογραφία και στην ηλεκτροφόρηση, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, επιτυγχάνονται με τη χρήση διάφορων CSs [14, 101]. Ωστόσο, κάποια προβλήματα συνήθως περιορίζουν τη χρήση τους ως CSs. Μερικά από τα προβλήματα είναι η μικρή διαλυτότητά τους, η περίπλοκη διαδικασία σύνθεσης, το υψηλό κόστος και η μικρή αποδοτικότητα διαχωρισμού κορυφών [25]. Για το λόγο αυτό, αρκετές φορές απαιτείται η χρήση οργανικών πρόσθετων (οργανικοί τροποποιητές) μέσα στην κινητή φάση ή τον BGE, όπως για παράδειγμα οργανικοί διαλύτες, TEA και τριαιθανολαμίνη [174-176]. Η δυνατότητα χρήσης των CILs ως διαλυτών και ως CSs μπορεί να διορθώσει τέτοια προβλήματα, αποφεύγοντας ταυτόχρονα τη χρήση βλαβερών οργανικών διαλυτών [156].

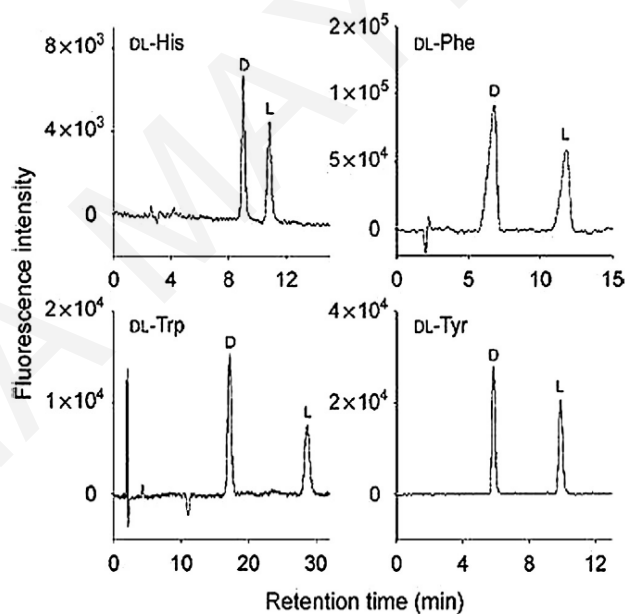
CILs στις χρωματογραφικές τεχνικές

Οι ερευνητικές μελέτες που έχουν δημοσιευτεί με τη χρήση των CILs στην GC είναι περιορισμένες. Η πρώτη μελέτη πραγματοποιήθηκε από τους Ding *et al.* [11], οι οποίοι χρησιμοποίησαν ως CSPs κάποια ILs που είχαν ως κατιόν το N,N-διμεθυλεφεδρίνιο (N,N-dimethylephedrinium) και παρουσίασαν την εναντιοεκλεκτικότητά τους ως προς μερικές αλκοόλες, διόλες, σουλφοξείδια, εποξειδία και ακετυλιωμένες αμίνες. Οι παράγοντες διαχωρισμού, α , κυμαίνονταν από 1,01 μέχρι 1,11. Σε μια προσπάθεια αντιστροφής της εναντιοεκλεκτικότητας και της σειράς έκλουσης, συντέθηκαν τρία διαφορετικά CILs, τα οποία διαφέρουν μόνο ως προς τη στερεοχημική τους διαμόρφωση: 1) [(1S,2R)-(+)-N,N-dimethylephedrinium] [NTf₂], 2) (1R,2S)-(+)-N,N-dimethylephedrinium][NTf₂], 3) [(1S,2S)-(+)-N,N-dimethylephedrinium] [NTf₂]. Η σειρά έκλουσης αντιστράφηκε όταν ως CSP χρησιμοποιήθηκε το (1S,2R)- αντί το (1R,2S)-διμεθυλεφεδρινικό CIL. Επιπρόσθετα, για τον επιτυχή διαχωρισμό των εναντιομερών μερικών αναλυτών παίζει ρόλο η

διαμόρφωση και των δυο στερεογονικών κέντρων, ενώ για κάποιους άλλους αναλύτες μόνο η διαμόρφωση του ενός στερεογονικού κέντρου. Οι Yuan *et al.* [157] εξέτασαν την εφαρμογή του CIL (R)-N,N,N-trimethyl-2-aminobutanol-bis(trifluoromethanesulfon)imidate στην GC, HPLC, και CE. Στην περίπτωση της GC, το CIL παρουσίασε σημαντική εναντιοεκλεκτικότητα ως προς τις αλκοόλες, αμίνες, κετόνες, εστέρες και αμινοξέα. Πέντε χρόνια αργότερα, οι Zhao *et al.* [177], από την ίδια ομάδα, χρησιμοποίησαν ως CSPs το ίδιο CIL σε συνδυασμό με νανοσωλήνες μονού τοιχώματος. Ο συνδυασμός αυτός διαχώρισε περισσότερους αναλύτες σε σύγκριση με τη στήλη που περιείχε ως CSP μόνο το CIL. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η βελτίωση αυτή οφείλεται πιθανότατα στην αύξηση του εμβαδού της επιφάνειας, το οποίο με τη σειρά του αυξάνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ CSP και αναλυτών. Το 2013, συντέθηκαν τα permethylated mono-6-deoxy-6-pyridin-1-ium και mono-6-deoxy-6-(1-vinyl-1H-imidazol-3-ium)-α- και -β-CD trifluoromethanesulfonate και αξιολογήθηκαν ως CSPs στην GC από τους Costa *et al.* [158]. Τα νέα CD-ILs παρουσίασαν πολύ καλή εναντιοεκλεκτική ικανότητα, και σε κάποιες περιπτώσεις, ο διαχωρισμός ήταν ακόμα καλύτερος και από την εμπορικά διαθέσιμη χειρόμορφη στήλη-CD. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι η σύνθεση του CD-IL ήταν απλή, ενός σταδίου και χωρίς τη χρήση διαλυτών.

Στην LC τα CIL, χρησιμοποιήθηκαν κυρίως ως χειρόμορφοι υποκαταστάτες (*chiral ligands*) [160, 178, 179], ενώ σε μικρότερο βαθμό ως CSPs [180, 181] και CSs [157]. Οι Yuan *et al.* ήταν οι μόνοι που μελέτησαν μέχρι πρόσφατα τη χρήση των CILs ως CSs στην HPLC [157]. Το CIL (R)-N,N,N-trimethyl-2-aminobutanol-bis(trifluoromethanesulfon)imidate προστέθηκε στην κινητή φάση και οι περισσότεροι υπό μελέτη χειρόμορφοι αναλύτες διαχωρίστηκαν επιτυχώς. Το 2010, κατασκευάστηκε η πρώτη CSP από CD-IL στην HPLC από τους Zhou *et al.* [181]. Συγκεκριμένα, τέσσερα νέα IL παραγωγοποιημένα με διάφορα παράγωγα της β-CD παρασκευάστηκαν και δεσμεύτηκαν πάνω σε πυριτία. Τα ILs αποτελούνταν από κατιόντα, όπως ιμιδαζολικά και 1,2,3-τριαζολικά παράγωγα κυκλοδεξτρίνης, ενώ τα ανιόντα ήταν το νιτρικό και το τοσυλικό. Και οι τέσσερις CSPs διαχώρισαν πλήρως τα εναντιομερή των αναλυτών και η τιμή της R_s ήταν, στις περισσότερες περιπτώσεις, πάνω από 1,5. Πρόσφατα, οι Kodali και Stalcup [180] χρησιμοποίησαν το χειρόμορφο 2-(1H-imidazol-1-yl)cyclohexanol, το οποίο δέσμευσαν χημικά πάνω στη στήλη, σχηματίζοντας έτσι ένα CIL πάνω στα τοιχώματα της στήλης, και το εξέτασαν ως CSPs.

Η πρώτη εφαρμογή των AAILs στους χειρόμορφους διαχωρισμούς ήταν στην HPLC το 2009 από τους Liu et al. [160]. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποίησαν διάφορα CILs, των οποίων το ανιόν ήταν το αμινοξύ L-προλίνη (L-proline, *L-Pro*), ενώ τα κατιόντα αποτελούνταν από το 1-αλκυλο-3-μεθυλιμιδαζόλιο (1-alkyl-3-methylimidazolium, *CMIM*). Τα συγκεκριμένα AAILs χρησιμοποιήθηκαν ως χειρόμορφοι υποκαταστάτες συμπλοκοποιημένοι με χαλκό (II) στην τεχνική χρωματογραφία ανταλλαγής χειρόμορφου υποκαταστάτη (Chiral ligand exchange chromatography, *CLEC*). Τα AAILs έδειξαν ότι μπορούν να δράσουν ως χειρόμορφοι υποκαταστάτες επιτυγχάνοντας χειρόμορφους διαχωρισμούς με αρκετά ψηλές τιμές R_s . Στο **Σχήμα 2.15** φαίνεται ο πλήρης διαχωρισμός των εναντιομερών τεσσάρων αμινοξέων όταν χρησιμοποιήθηκε το AAIL με το χαλκό (II) ως χειρόμορφος υποκαταστάτης. Ακολούθησαν κι άλλες μελέτες χρήσης παρόμοιων AAIL ως χειρόμορφοι υποκαταστάτες στην *CLEC* και κυρίως για το χειρόμορφο διαχωρισμό αμινοξέων [178, 179].



Σχήμα 2.15. Χειρόμορφοι διαχωρισμοί της φαινυλαλανίνης, ιστιδίνης, τρυπτοφάνης και τυροσίνης στην HPLC. Κινητή φάση: 1 mM $[C_6MIM][L-Pro]$, 0,5 mM $Cu(OAc)_2$ και MeOH (15%, v/v) σε νερό (pH 5,8) [160].

CILs στις ηλεκτροφορητικές τεχνικές

Στην CE υπάρχουν περισσότερες μελέτες χρήσης των CILs σε σχέση με την HPLC και την GC. Ωστόσο, στις μελέτες αυτές τα CILs χρησιμοποιούνται κυρίως ως πρόσθετα στον BGE, ενώ σε μικρότερο βαθμό ως CSs και ως χειρόμορφοι υποκαταστάτες στην ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς ανταλλαγής χειρόμορφου υποκαταστάτη (Chiral ligand exchange capillary electrophoresis, *CLE-CE*).

Τα τελευταία πέντε χρόνια, έχει αναπτυχθεί η χρήση των AAILs στην τεχνική *CLE-CE* για το χειρόμορφο διαχωρισμό διάφορων ουσιών και κυρίως αμινοξέων. Τα CILs μπορεί να έχουν ένα αμινοξύ, είτε ως ανιόν, είτε ως κατιόν. Τα AAILs που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα σε αυτή την τεχνική είναι τα ακόλουθα: $[C_nMIM][L-Pro]$, $[C_nMIM][L-λυσίνη]$ ($[C_nMIM][L-Lys]$), $[L-Pro][CF_3COO]$, $[L-Pro][NO_3]$, $[L-Pro][BF_4]$, $[L-Pro]_2[SO_4]$, και $[1-ethylpyridinium][L-Lys]$ ($[Epy][L-Lys]$) [160, 161, 182]. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο διαχωρισμός ήταν καλύτερος από αυτόν που λήφθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε μόνο το αμινοξύ ως υποκαταστάτης στην τεχνική *CLE-CE* [25].

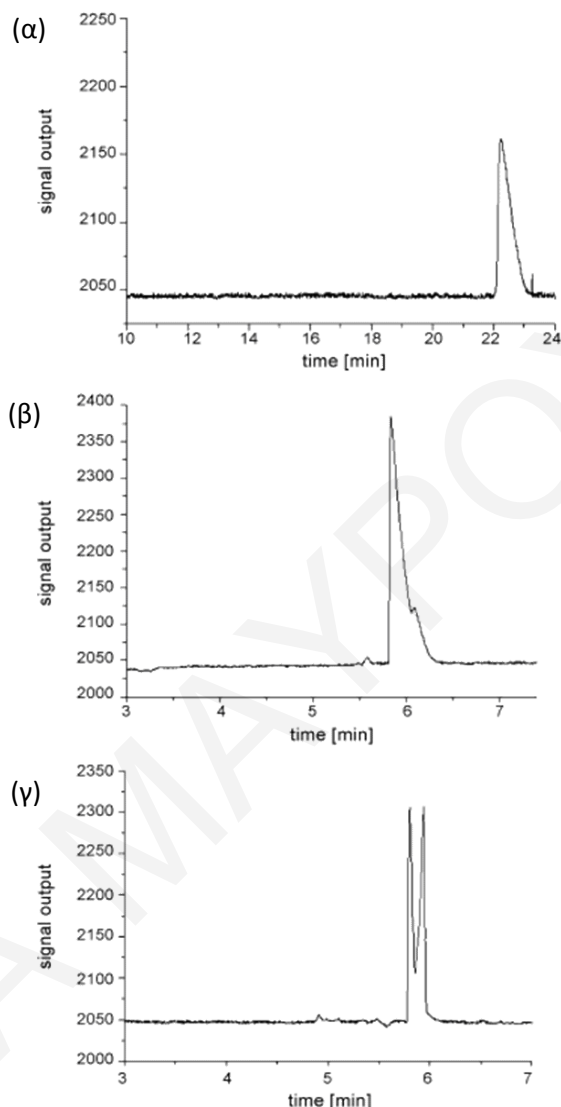
Από τις περισσότερες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην CE με CILs, λίγες είναι αυτές που χρησιμοποίησαν τα CILs ως τους μοναδικούς CSs μέσα στον BGE. Το 2006, οι Yuan *et al.* [157], εκτός από τη μελέτη του (R)-N,N,N-trimethyl-2-aminobutanol-bis(trifluoromethanesulfon)imidate ως CS στην HPLC και GC, μελέτησαν την ικανότητα λειτουργίας του ως CS στην CE. Το συγκεκριμένο CIL χρησιμοποιήθηκε ως πρόσθετο στον BGE (20 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 ή 20 mM $Na_2B_4O_7$). Εξετάστηκαν δεκαπέντε χειρόμορφες ενώσεις με τις τιμές R_s να είναι 0,60 και 6,80 για το di-O,O' p-toluyI-tartaric acid και το 3-benzyloxy-1,2-propane diol, αντίστοιχα. Οι Tran και Mejac εξέτασαν το CIL S-[3-(chloro-2-hydroxypropyl)trimethylammonium] [bis((trifluoromethyl)sulfonyl)amide] (S-[CHTA][NTf₂]) ως τον μοναδικό CS στην CE [164]. Παρόλ' αυτά, δεν ήταν δυνατό να διαχωρίσουν χειρόμορφα ουσίες όπως το ιβουπροφαίνιο (ibuprofen), η φλουρβιπροφαίνη (flurbiprofen), η ατενολόλη (atenolol) κ.α. με τη χρήση μόνο του S-[CHTA][NTf₂] ως το μοναδικό CS. Έτσι, εκτός του CIL μέσα στον BGE προστέθηκαν κι άλλες πρόσθετες ουσίες, όπως το χειρόμορφο άλας χολικού νατρίου αλλά και το 1-S-οκτυλ-β-D-θειογλυκοκυρανοσίτη (1-S-octyl-β-D-thioglucoopyranoside, *OTG*). Αξίζει να σημειωθεί ότι, για το χειρόμορφο διαχωρισμό απαιτήθηκαν συνολικά τρεις CSs. Επίσης, όπως φαίνεται

στο **Σχήμα 2.16**, η προσθήκη του CIL είναι πολύ σημαντική στο διαχωρισμό, αφού μόνο τότε επιτεύχθηκε μερικός διαχωρισμός ($R_s < 1,5$) του φλουρβιπροφαινίου.

Σε μια άλλη εργασία, οι Ma et al. [165] μελέτησαν τη χρήση CIL που αποτελείται από εφεδρινικό κατιόν ως CS στην μη-υδατική CE (Non-Aqueous CE, NACE). Συγκεκριμένα, το (+)-N,N-dimethylephedrinium-bis(trifluoromethanesulfon)imidate ([DMP][NTf₂]) χρησιμοποιήθηκε ως ο BGE και ταυτόχρονα ως CS για το χειρόμορφο διαχωρισμό των ενώσεων ραμπεπραζόλη (rabeprazole) και ομεπραζόλη (omeprazole). Η προσθήκη του [DMP][NTf₂] είχε ως αποτέλεσμα την αντιστροφή της EOF (ανοδική ροή), πιθανότατα λόγω της προσρόφησης των κατιόντων του CIL πάνω στα τοιχώματα της στήλης. Ως BGE χρησιμοποιήθηκαν 60 mM [DMP][NTf₂] μέσα σε ακετονιτρίλιο-μεθανόλη (60:40). Όπως αναφέρουν οι ερευνητές, οι χειρόμορφοι διαχωρισμοί επιτεύχθηκαν κυρίως λόγω των διαφορετικών αλληλεπιδράσεων ζεύγους-ιόντων (ion-pairing interaction), μεταξύ του χειρόμορφου κατιόντος του CIL και του αρνητικά φορτισμένου αναλύτη, καθώς επίσης και των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται. Πρόσφατα, συντέθηκε ένα νέο CIL, το οποίο αποτελείται από ένα κατιόν με βάση την CD [166]. Πιο συγκεκριμένα, το CIL 6-O-2-hydroxypropyltrimethylammonium-β-CD tetrafluoroborate ([HPTMA-β-CD][BF₄]) προστέθηκε μέσα στο BGE ως ο CSs, και μελετήθηκε ο διαχωρισμός οκτώ χειρόμορφων φαρμακευτικών ουσιών. Με αύξηση της συγκέντρωσης του [HPTMA-β-CD][BF₄] από 3 σε 13 mg/mL, οι χρόνοι συγκράτησης και η διαχωριστική ικανότητα αυξήθηκαν σημαντικά. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης (27 mg/mL) οδήγησε σε αύξηση των χρόνων συγκράτησης, ενώ η διαχωριστική ικανότητα είτε παρέμεινε σταθερή είτε μειώθηκε.

Σε μια άλλη προσπάθεια, οι Francois et al. [167] εξέτασαν την εναντιοεκλεκτική ικανότητα δύο χολινικών CILs (ethyl- και phenylcholine bis(trifluoromethylsulfonyl)imide) για το χειρόμορφο διαχωρισμό 2-αρυλοπροπιονικών οξέων. Εντούτοις, η χρήση του CIL, ως ο μοναδικός CS, δεν ήταν ικανή να διαχωρίσει τα εναντιομερή, και για το λόγο αυτό, το CIL προστέθηκε μαζί με μια CD (διμεθυλο- ή τριμεθυλο-β-CD) μέσα στον BGE. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η συνεργιστική δράση μεταξύ του CIL και της CD. Σε κάποιες περιπτώσεις, η προσθήκη του CIL είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της εκλεκτικότητας και της διαχωριστικής ικανότητας. Αυτό, όπως αναφέρουν οι συγγραφείς, οφείλεται στη μείωση της EOF, η οποία προκαλείται λόγω της προσρόφησης του CIL στα τοιχώματα της στήλης. Η τελευταία παρατήρηση οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η συνεργιστική δράση που

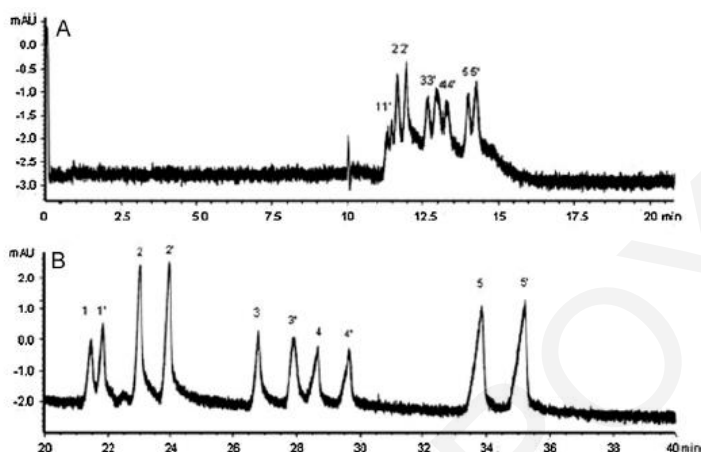
αναπτύσσεται οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις ζεύγους-ιόντων μεταξύ αναλύτη κατιόντος του CIL αλλά και της CD (Σχήμα 2.14).



Σχήμα 2.16. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν κατά το χειρόμορφο διαχωρισμό του φλουρβιπροφαινίου. BGE: (α) 50 mM χολικό νάτριο, (β) 20 mM S-[CHTA][NTf₂] + 30 mM χολικό νάτριο, (γ) 20 mM S-[CHTA][NTf₂] + 30 mM χολικό νάτριο + 10 mM OTG [164].

Εκτός από τα CILs, έχουν συντεθεί και πολυμερή CILs τα οποία χρησιμοποιήθηκαν μαζί με άλλους CSs, όπως CDs, για τη μελέτη της συνεργιστικής τους δράσης στη MEKC. Το 2009, οι Wang et al. ανέφεραν το συνδυασμό της TM-β-CD και του CIL βρωμίδιο του N-ενδεκυλοξυ-καρβονυλικής L-λευκινόλης (N-udecenoxy-carbonyl-L-leucinol bromide, L-UCLB), το οποίο σχηματίζει μικκύλια σε υδατικά BGEs, για το χειρόμορφο διαχωρισμό 2-αρυλοπροπιονικών οξέων [168, 169]. Η συνεργασία μεταξύ L-UCLB και TM-βCD είχε ως

αποτέλεσμα τη βελτίωση της αποδοτικότητας των κορυφών, καθώς και τον πλήρη διαχωρισμό των εναντιομερών σχεδόν όλων των υπό μελέτη αναλυτών (εκτός της ιβουπροφαίνης, της οποίας η R_s ήταν ίση με 1.3) (Σχήμα 2.17) [168].



Σχήμα 2.17. Ταυτόχρονος διαχωρισμός 2-αρυλοπροπιονικών οξέων κατά την απουσία (A) και παρουσία (B) του L-UCLB. Συνθήκες: 5 mM NaOAc, 2,63 mM HOAc (pH 5,0) + 35 mM TM-β-CD (A), και 35 mM TM-β-CD + 1,5 mM L-UCLB (B). 1,1' = R-, S-ιβουπροφαίνιο, 2,2' = R-, S-φαινοπροφαίνιο, 3,3' = R-, S-ινδοπροφαίνιο, 4,4' = R-, S-σουπροφαίνιο, 5,5' = R-,S-κετοπροφαίνιο [168].

Σε μια άλλη μελέτη, η ίδια ομάδα [169] εξέτασε τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των TM-β-CD, L-UCLB και των 2-αρυλοπροπιονικών οξέων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι σταθερές δέσμευσης είναι διαφορετικές για τα εναντιομερή του αναλύτη, λόγω της συνεργιστικής δράσης των CSs, και αυτό οδηγεί στον επιτυχή χειρόμορφο τους διαχωρισμό.

Ένα άλλο είδος CIL, το οποίο περιέχει ως ανιόν το χειρόμορφο L-γαλακτικό (L-lactate), έχει πρόσφατα εφαρμοστεί στην CE ως CS [35, 37, 170]. Σε όλες τις περιπτώσεις το CIL συνδυάστηκε με CDs. Η προσθήκη του L-γαλακτικού 1-αιθυλο-3-μεθυλιμιδαζολίου (1-ethyl-3-methylimidazolium L-lactate, [EMIM][L-lactate]) μέσα στον BGE βελτίωσε δραματικά το διαχωρισμό των αναλυτών. Για παράδειγμα, η τιμή της R_s για τη ζοπικλόνη (zopiclone) και τη μηλεϊνική βρωμοφαινιραμίνη (bromopheniramine maleate) αυξήθηκε από 0,8 και 1,3 σε 5,2 και 4,5, αντίστοιχα. Επιπλέον, εξέτασαν το ρόλο που παίζει το μέγεθος της αλκυλ-αλυσίδας του CIL στο χειρόμορφο διαχωρισμό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διαχωριστική ικανότητα ήταν μεγαλύτερη όταν χρησιμοποιήθηκε το [BMIM][L-lactate] απ' ό,τι όταν χρησιμοποιήθηκε το [EMIM][L-lactate] [37]. Σε μια παρόμοια μελέτη, εξετάστηκε

η εναντιοεκλεκτική ικανότητα των [EMIM][L-lactate] και EMIM][DL-lactate] σε συνδυασμό με την HP-β-CD [35]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το στερεογονικό κέντρο του CIL είναι πολύ σημαντικό για το χειρόμορφο διαχωρισμό, αφού στην περίπτωση του [EMIM][DL-lactate] δεν παρατηρήθηκε οποιαδήποτε βελτίωση στη διαχωριστική ικανότητα.

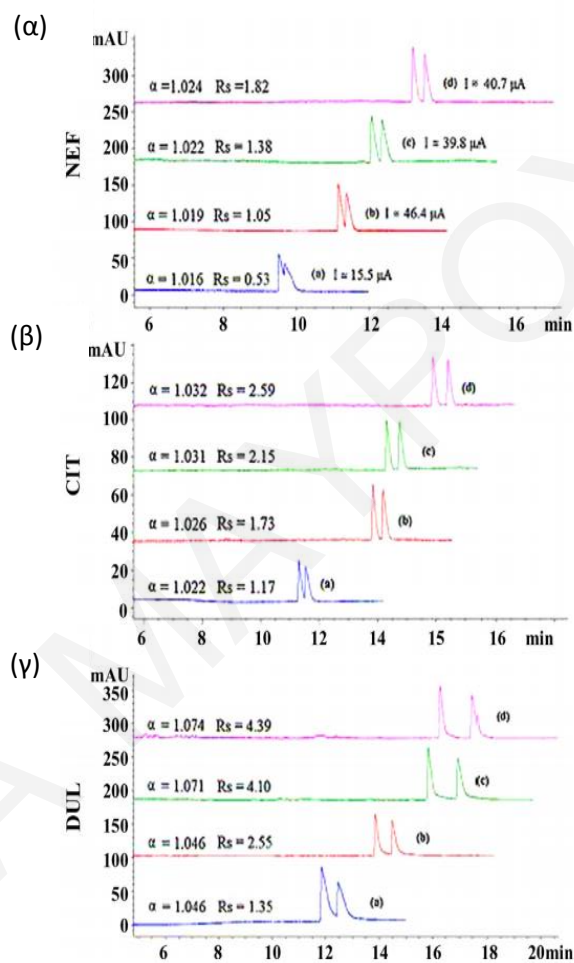
Ερευνητές από την Κίνα μελέτησαν το συνεργιστικό φαινόμενο με AAILs ως πρόσθετα στον BGE [36, 38, 39]. Στην πρώτη τους μελέτη, χρησιμοποίησαν δύο AAILs (τετραμεθυλαμμωνιακό της L-αργινίνης (tetramethylammonium-L-arginine, *TMA-L-Arg*) και τετραμεθυλαμμωνιακό του L-ασπαρτικού οξέος (TMA-L-aspartic acid, *TMA-L-Asp*)), για να αξιολογήσουν το συνεργιστικό φαινόμενο με τον CS γλυκογόνο στον εναντιομερή διαχωρισμό των αναλυτών νεφοπάμης (neforam, *NEF*), σιταλοπράμης (citalopram, *CIT*) και ντουλοξετίνης (duloxetine, *DUL*). Όταν εφαρμόστηκαν τα συστήματα TMA-L-Arg/γλυκογόνο και TMA-L-Asp/γλυκογόνο, η διαχωριστική ικανότητα και η εκλεκτικότητα (παράγοντας διαχωρισμού, α) βελτιώθηκαν σημαντικά, συγκριτικά με το σύστημα διαχωρισμού που περιείχε μόνο το γλυκογόνο ως χειρόμορφο μόριο. Αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη συνεργιστικού φαινομένου μεταξύ του AAIL και του CS. Συγκεκριμένα, συγκρίνοντας τα δύο συστήματα διαχωρισμού AAIL/γλυκογόνο, το TMA-L-Arg/γλυκογόνο παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα για τους προς εξέταση αναλύτες. Ως εκ τούτου, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η δομή και οι ιδιότητες του χειρόμορφου τμήματος του AAIL έχουν σημαντική επίδραση στην εναντιομερική αναγνώριση. Επίσης, μελέτησαν και την επίδοση ενός μη χειρόμορφου IL (υδροξείδιο του τετραμεθυλαμμωνίου, *TMA-OH*) σε συνδυασμό με το γλυκογόνο, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι το IL με το ίδιο κατιόν μπορούσε να βελτιώσει το διαχωρισμό, αλλά όχι σε τέτοιο βαθμό όπως στην περίπτωση των συστημάτων CAAILs/γλυκογόνου. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις απεικονίζονται στο **Σχήμα 2.18**.

2.5 Ηλεκτροφόρηση

2.5.1 Γενικά-Κατηγορίες Ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική διαχωρισμού, η οποία βασίζεται στη διαφορετική ταχύτητα όδευσης των φορτισμένων σωματιδίων σε διαφορετικό διάλυμα, κατά μήκος του οποίου εφαρμόζεται ένα ηλεκτρικό πεδίο [183]. Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε το 1937 από

τον Σουηδό χημικό Arne Tiselius, μελετώντας τις πρωτεΐνες του ορού και για την εργασία αυτή τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1948 [184]. Η ηλεκτροφόρηση έχει εφαρμοσθεί ευρέως σε διαχωρισμούς φορτισμένων μακρομορίων, όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Αποτελεί τη βασική αρχή σε διάφορες αναλυτικές τεχνικές και τεχνικές προετοιμασίας.



Σχήμα 2.18. Ηλεκτροφερογράμματα του εναντιομερούς διαχωρισμού των (α) NEF, (β) CIT και (γ) DUL σε διάφορα συστήματα διαχωρισμού. (a) 2,5% γλυκογόνο, (b) 2,5% γλυκογόνο + 60 mM TMA-OH, (c) 2,5% γλυκογόνο + 60 mM TMA-L-Asp, (d) 2,5% γλυκογόνο + 60 mM TMA-L-Arg [36].

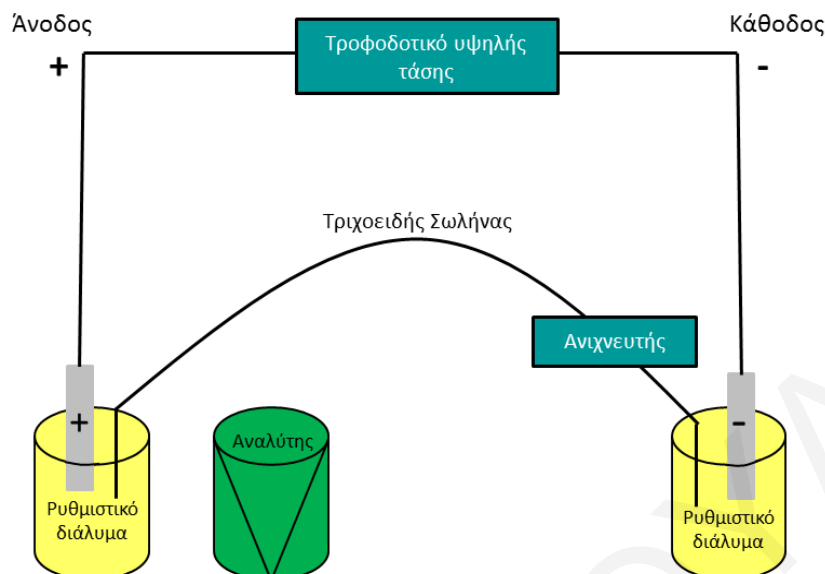
Οι ηλεκτροφορητικοί διαχωρισμοί πραγματοποιούνται με δύο διαφορετικούς τρόπους, την ηλεκτροφόρηση πλάκας πηκτής και την CE. Ο πρώτος τρόπος αποτελεί και την κλασική μέθοδο, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί πολλά χρόνια για το διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων. Οι διαχωρισμοί της ηλεκτροφόρησης πλάκας εκτελούνται σε ένα λεπτό επίπεδο στρώμα πορώδους ημιστερεάς πηκτής, που περιέχει υδατικό ρυθμιστικό μέσα στους πόρους

της. Όσο χρήσιμη και εάν ήταν και συνεχίζει να είναι η ηλεκτροφόρηση πλάκας, αυτός ο τύπος ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού είναι γενικά αργός και δύσκολο να αυτοματοποιηθεί και δεν παρέχει πολύ ακριβή ποσοτικά αποτελέσματα [183].

Ως εκ τούτου, διάφορες μελέτες οδήγησαν στην ανάπτυξη μιας παρόμοιας τεχνικής, η οποία χρησιμοποιούσε τριχοειδείς στήλες από γυαλί με διάμετρο μικρότερη από 100 μm . Τα πρώτα ευρέως αποδεκτά αποτελέσματα που έδειχναν την ισχύ της CE λήφθηκαν στις αρχές του '80 από τους Jorgenson και Lukacs, αναπτύσσοντας την πρώτη μέθοδο ενόργανης ηλεκτροφόρησης, με χρήση τριχοειδών στηλών από τηγμένη πυριτία, εσωτερικής διαμέτρου 75 μm [185]. Η μελέτη αυτή αποτέλεσε τη βάση για τη θεμελίωση της τεχνικής CE στον τομέα των ενόργανων μεθόδων ανάλυσης. Όπως στην ηλεκτροφόρηση, έτσι και στην CE, οι διαχωρισμοί βασίζονται στις διαφορές της ευκινησίας των ιόντων σε ηλεκτροφορητικό μέσο μέσα σε τριχοειδείς στήλες. Η CE επιτρέπει γρήγορους και αποτελεσματικούς διαχωρισμούς φορτισμένων συστατικών, με χρήση πολύ μικρών όγκων δείγματος (0,1-10 nL), μικρή κατανάλωση διαλυτών και προσφέρει υψηλή αποδοτικότητα.

2.5.2 Οργανολογία της Ηλεκτροφόρησης Τριχοειδούς

Η οργανολογία της CE είναι σχετικά απλή. Στο **Σχήμα 2.19** φαίνεται μια απλή διάταξη ενός συστήματος CE. Αποτελείται από μια τριχοειδή στήλη τηγμένης πυριτίας, της οποίας τα άκρα είναι βυθισμένα σε φιαλίδια που περιέχουν ηλεκτρολύτη. Επίσης, αποτελείται από ένα τροφοδοτικό υψηλής τάσης και δύο ηλεκτρόδια λευκοχρύσου, τα οποία εφαρμόζουν τάση στα δύο άκρα της στήλης, μια λυχνία υπεριώδους (Ultraviolet, UV) με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων και φιαλίδιο που περιέχει τον αναλύτη. Για την πραγματοποίηση των διαχωρισμών, γίνεται εισαγωγή του δείγματος από το φιαλίδιο του αναλύτη μέσα στο ένα άκρο της στήλης (άνοδος), και στη συνέχεια, το φιαλίδιο του αναλύτη αντικαθίσταται από αυτό του BGE, εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού και έτσι τα ιόντα του δείγματος κινούνται κατά μήκος της στήλης (προς την κάθοδο). Το δυναμικό που εφαρμόζεται είναι συνήθως 20-30 kV. Σε περιπτώσεις που χρειάζεται γρήγορος διαχωρισμός ανιόντων, γίνεται αντιστροφή της καθόδου και της ανόδου οπότε προκύπτουν οι αντίστοιχες αρνητικές τιμές δυναμικού. Ο όγκος έγχυσης του δείγματος είναι της τάξης των nL ή και μικρότερος διότι ο όγκος ενός συνηθισμένου τριχοειδούς δεν υπερβαίνει τα 5 μL [186].



Σχήμα 2.19. Σχηματική διάταξη του βασικού συστήματος CE.

Η έγχυση του δείγματος μπορεί να γίνει ηλεκτροκινητικά ή υδροδυναμικά υπό πίεση. Στην πρώτη περίπτωση, το ένα άκρο της τριχοειδούς στήλης με το ηλεκτρόδιο απομακρύνεται από το δοχείο με το ρυθμιστικό διάλυμα και τοποθετείται στο δοχείο με το δείγμα. Εφαρμογή τάσης για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα εξαναγκάζει το δείγμα να εισέλθει στη στήλη. Ακολούθως, το άκρο της τριχοειδούς στήλης με το ηλεκτρόδιο επιστρέφει στο δοχείο με το ρυθμιστικό διάλυμα. Με τον τρόπο αυτό, εισάγονται στη στήλη μεγαλύτερες ποσότητες ευκίνητων ιόντων και μικρότερους βραδύτερων ιόντων με αποτέλεσμα να γίνεται μερική διάκριση των ιόντων. Στη δεύτερη περίπτωση, το άκρο της τριχοειδούς στήλης με το ηλεκτρόδιο τοποθετείται στιγμιαία στο δοχείο με το δείγμα και εφαρμόζεται διαφορά πίεσης που οδηγεί στην προώθηση του δείγματος στη στήλη. Στην περίπτωση αυτή δε γίνεται διάκριση των ιόντων. Και στις δύο περιπτώσεις έγχυσης, ο όγκος του δείγματος που εισάγεται στη στήλη ελέγχεται από τη διάρκεια της έγχυσης και αντιστοιχεί συνήθως στα 5-10 nL [186].

Όλα τα ιόντα, θετικά και αρνητικά, ωθούνται διαμέσου του τριχοειδούς προς την ίδια κατεύθυνση (κάθοδος) λόγω της ηλεκτροωσμωτικής ροής (Electroosmotic Flow, *EOF*). Οι αναλύτες διαχωρίζονται κατά τη μετανάστευσή τους λόγω της διαφορετικής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας και ανιχνεύονται στην έξοδο του τριχοειδούς, στην οποία βρίσκεται ο ανιχνευτής. Η ανίχνευση στην CE χωρίζεται σε δύο κατηγορίες, την ανίχνευση

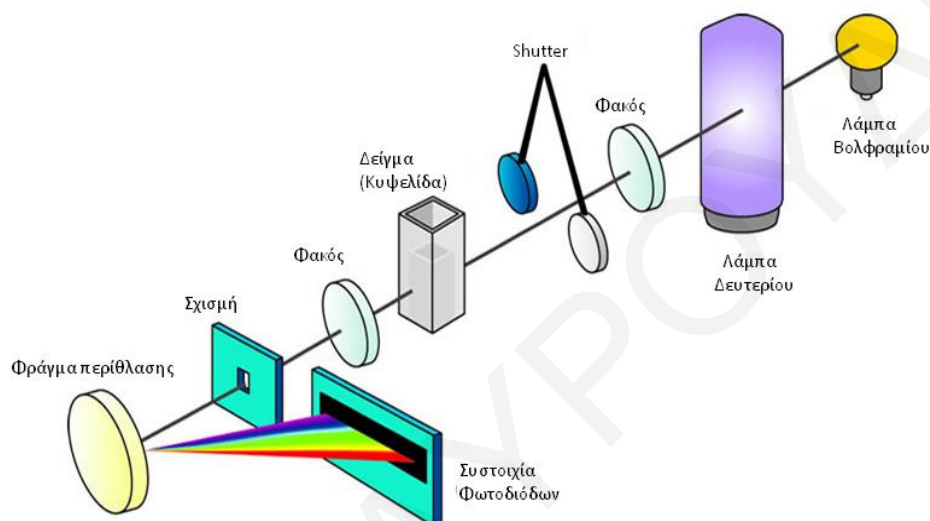
μέσα στον τριχοειδή (on-line) και την εξωτερική ανίχνευση (external). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι φασματοφωτομετρικοί ανιχνευτές με κυριότερο τον ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (Ultraviolet-Visible, UV-Vis), οι φθορισμομετρικοί και οι ηλεκτροχημικοί. Στη δεύτερη κατηγορία, ανήκουν τα φασματόμετρα μάζας (Mass Spectrometer, MS) και το Surface Enhanced Raman Spectrometer (SERS) [42]. Ο ανιχνευτής στέλνει τα δεδομένα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή για καταγραφή και αποθήκευση ως ηλεκτροφερόγραμμα, το οποίο αποτελεί απόκριση του ανιχνευτή συναρτήσει του χρόνου. Οι διαχωρισμένοι αναλύτες εμφανίζονται με τη μορφή κορυφών με διαφορετικό χρόνο μετανάστευσης στο ηλεκτροφερόγραμμα [186].

2.5.3 Μέθοδοι Ανίχνευσης στην CE

Οι τέσσερις πιο συνηθισμένοι μέθοδοι ανίχνευσης στην CE είναι η ανίχνευση UV-Vis, η ανίχνευση φθορισμού, η ηλεκτροχημική ανίχνευση και η ανίχνευση MS. Ένας ανιχνευτής UV-Vis (190-600 nm) αποτελεί τον πιο χρήσιμο και πιο ευρέως διαδεδομένο ανιχνευτή της CE, διότι μπορεί να ανιχνεύσει την πλειονότητα των οργανικών ενώσεων και επιπλέον η συμβατότητά του με το σύστημα CE είναι μεγάλη. Η ανίχνευση πραγματοποιείται μέσα στη στήλη τηγμένης πυριτίας, η οποία χρησιμοποιείται η ίδια ως κυψελίδα, ώστε να αποφεύγεται η μείωση της αποδοτικότητας του διαχωρισμού. Σε μια περιοχή στη στήλη δημιουργείται ένα παράθυρο ανίχνευσης περίπου 0,5 cm, όπου η εξωτερική επίστρωση πολυμιδίου της στήλης αφαιρείται με κάψιμό της με φλόγα. Η τηγμένη πυριτία είναι γυάλινο υλικό το οποίο είναι διαπερατό από ορατή και υπέρυθη ακτινοβολία μέχρι τα 3 μm. Ως αποτέλεσμα, η δέσμη ακτινοβολίας διαπερνά τη στήλη στην περιοχή του παραθύρου ανίχνευσης της στήλης και έτσι επιτυγχάνεται η ανίχνευση των αναλυτών [186].

Υπάρχουν δύο είδη ανιχνευτών UV-Vis. Το ένα καταγράφει την απορρόφηση των αναλυτών σε ένα μόνο μήκος κύματος, οπότε διαθέτει μονοχρωμάτορα, ενώ το άλλο καταγράφει την απορρόφηση αναλυτών σε διάφορα μήκη κύματος της ακτινοβολίας ταυτόχρονα, οπότε διαθέτει πρίσμα ή αποτελείται από συστοιχίες φωτοδιόδων (**Σχήμα 2.20**). Οι τελευταίοι αποτελούν τους αποδοτικότερους φασματοφωτομετρικούς ανιχνευτές UV-Vis, με τους οποίους συλλέγονται και αποθηκεύονται φασματικά δεδομένα για κάθε αναλύτη σε χρόνο περίπου ενός δευτερολέπτου. Στη συστοιχία διόδων, το δείγμα ακτινοβολείται σε όλο το φάσμα, και η ακτινοβολία που εξέρχεται, προσπίπτει σε μια διάταξη φωτοδιόδων, που

αποτελείται από 35-512 φωτοευαίσθητα στοιχεία. Κάθε δίοδος δέχεται την ακτινοβολία ενός μήκους κύματος και το σήμα, αφού ενισχυθεί, μετατρέπεται σε ψηφιακό και αποθηκεύεται στον υπολογιστή. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την καταγραφή, ταυτόχρονα, πολλών μηκών κύματος, διευκολύνοντας έτσι την ανίχνευση και τον προσδιορισμό διαφορετικών αναλυτών.



Σχήμα 2.20. Σχηματική διάταξη φασματοφωτομετρικού ανιχνευτή UV-Vis συστοιχίας φωτοδιόδων.

Μειονέκτημα της ανίχνευσης UV-Vis είναι τα ψηλά όρια ανίχνευσης, τα οποία κυμαίνονται από 10^{-5} - 10^{-6} M, με αποτέλεσμα τη μείωση της ανιχνευσιμότητας [187]. Το μήκος διαδρομής της ανίχνευσης στην CE περιορίζεται στην εσωτερική διάμετρο της στήλης (50-100 μm), ενώ το μήκος μιας συνηθισμένης κυψελίδας του UV-Vis είναι 1 cm (10^4 μm). Σύμφωνα με το νόμο Beer-Lambert, η ευαισθησία του ανιχνευτή είναι ανάλογη του μήκους της κυψελίδας, έτσι η ευαισθησία είναι μικρή. Για να αυξηθεί η ευαισθησία πρέπει να αυξηθεί το μήκος της ανίχνευσης της CE, όμως τότε μειώνεται η διαχωριστική ικανότητα.

Η φθορισμομετρική ανίχνευση μπορεί να χρησιμοποιηθεί, είτε σε δείγματα στα οποία οι αναλύτες φθορίζουν φυσικά, είτε σε δείγματα τα οποία έχουν τροποποιηθεί χημικά με φθορίζον παράγωγο. Τα πλεονεκτήματα της ανίχνευσης με φθορισμό είναι η υψηλή ευαισθησία και η βελτίωση της εκλεκτικότητας, ενώ στα μειονεκτήματά της εντάσσεται το γεγονός ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μη φθορίζοντα δείγματα, καθώς και η πολυπλοκότητα της μεθόδου λόγω της δυσκολίας εστίασης του φωτός στον τριχοειδή. Με

τη χρήση laser στο φθορισμό, τα όρια ανίχνευσης είναι πολύ χαμηλά. Η υψηλή ευαισθησία της τεχνικής αυτής οφείλεται στην υψηλή ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και της δυνατότητας να εστιάζει με ακρίβεια το φως στον τριχοειδή.

Η CE μπορεί επίσης να συζευχθεί απευθείας με ανιχνευτή MS. Η ανίχνευση με MS παρέχει μεγαλύτερη ευαισθησία και ικανότητα να διαχωρίζει κορυφές που αλληλεπικαλύπτονται με βάση το λόγο μάζα-προς-φορτίο (m/z). Επιπλέον, δίνει πληροφορίες σχετικά με το μοριακό βάρος και τη δομή του αναλύτη, έτσι μπορούν να ταυτοποιηθούν άγνωστοι αναλύτες ή να επιβεβαιωθεί η ταυτότητά τους. Παρόλ' αυτά, ο συνδυασμός CE/MS είναι μια τεχνική που δεν έχει πλήρως καθιερωθεί ως τρόπος ανίχνευσης για αναλύσεις ρουτίνας. Επιπλέον, η εφαρμογή της CE/MS στους χειρόμορφους διαχωρισμούς είναι σχετικά δύσκολη, αφού ο CS, που συνήθως είναι σχετικά μεγάλου μοριακού βάρους, δεν πρέπει να φτάσει στην πηγή ιονισμού του MS [188]. Λόγω της μεγάλης συμβατότητάς του με το σύστημα CE, ο ανιχνευτής UV-Vis αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο ανίχνευσης στην CE.

2.5.4 Βασικές Αρχές της CE

Στην CE, ο διαχωρισμός καθορίζεται από δύο παράγοντες, την ταχύτητα όδευσης του ιόντος, λόγω του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου, και τη ροή της κύριας μάζας του διαλύματος, λόγω του φορτίου της επιφάνειας στο τοίχωμα της στήλης, η οποία ονομάζεται ηλεκτροωσμωτική ροή (Electroosmotic flow, *EOF*) [189]. Με εφαρμογή ενός σταθερού ηλεκτρικού πεδίου, η ταχύτητα όδευσης των ιόντων εκφράζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$v = \mu_e \cdot E$$

Εξίσωση (2.1)

όπου v είναι η ταχύτητα όδευσης του ιόντος, μ_e η ηλεκτροφορητική ευκινησία και E είναι η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου. Το ηλεκτρικό πεδίο είναι συνάρτηση της εφαρμοζόμενης τάσης και του μήκους της στήλης.

Με εφαρμογή ενός σταθερού ηλεκτρικού πεδίου, τα ιόντα υπόκεινται σε μια ηλεκτροστατική δύναμη, F_e , η οποία τα επιταχύνει προς το ηλεκτρόδιο και είναι ανάλογη της ισχύος του ηλεκτρικού πεδίου (E) και του φορτίου του συγκεκριμένου ιόντος (q):

$$F_e = q \cdot E$$

Εξίσωση (2.2)

Αντίθετα, μέσα σε ένα διάλυμα, η δύναμη τριβής (F_f) που ασκείται εξισορροπεί την ηλεκτροστατική δύναμη και μειώνει την ευκινησία των ιόντων σύμφωνα με τη σχέση:

$$F_f = -6\pi\eta r v$$

Εξίσωση (2.3)

όπου η είναι το ιξώδες του διαλύματος και r η ιοντική ακτίνα.

Στο σημείο ισορροπίας των δύο δυνάμεων, αντικαθιστώντας τις πιο πάνω εξισώσεις, εξάγεται η σχέση της ταχύτητας όδευσης, v , και κατά συνέπεια και της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας, μ_e :

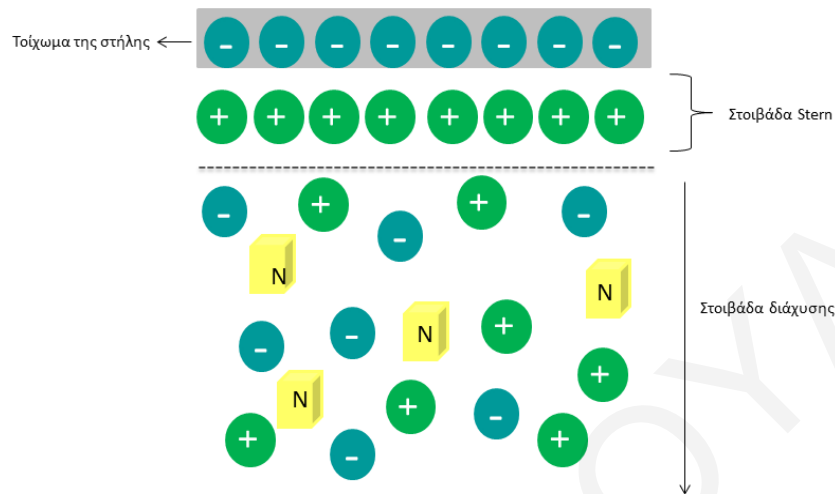
$$v = \frac{q}{6\pi\eta r} E = \mu_e \cdot E$$

Εξίσωση (2.4)

Η ηλεκτροφορητική ευκινησία είναι ανάλογη του ιοντικού φορτίου του αναλύτη και αντιστρόφως ανάλογη των επιβραδυντικών παραγόντων της τριβής. Είναι μια ιδιότητα των ιόντων και αποτελεί φυσική σταθερά για κάθε ιόν [183]. Η **Εξίσωση 2.4** αποδεικνύει ότι μικρά σε μέγεθος ιόντα με μεγάλο φορτίο έχουν μεγαλύτερη ηλεκτροφορητική ευκινησία, ενώ μεγάλα ιόντα με μικρό φορτίο έχουν μικρή ηλεκτροφορητική ευκινησία. Καθώς το ηλεκτρικό πεδίο επιδρά μόνο στα ιόντα, δύο ουσίες θα διαχωριστούν μεταξύ τους, εάν διαφέρουν είτε στο φορτίο, είτε στις δυνάμεις τριβής που υφίστανται κατά την κίνησή τους στο ρυθμιστικό διάλυμα. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος φορτίο-προς-μέγεθος ενός ιόντος τόσο γρηγορότερα κινείται ένα ιόν. Αντιθέτως, τα ουδέτερα σωματίδια δε είναι δυνατόν να διαχωριστούν. Επιπλέον, ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την κίνηση των ιόντων μέσα στη στήλη είναι το ιξώδες του BGE. Με αύξηση του ιξώδους η ηλεκτροφορητική ευκινησία των ιόντων μειώνεται [187].

Όταν εφαρμόζεται υψηλή τάση κατά μήκος του τριχοειδούς σωλήνα, που περιέχει τον BGE, δημιουργείται το φαινόμενο της EOF, επηρεάζοντας την κίνηση των ιόντων και των ουδέτερων μορίων μέσα στη στήλη. Η EOF οφείλεται στη διπλοστιβάδα που σχηματίζεται μεταξύ της κύριας μάζας του διαλύματος και του εσωτερικού τοιχώματος της στήλης. Σε τιμές pH μεγαλύτερες από 3 οι επιφανειακές ομάδες σιλανόλης είναι αποπρωτονιωμένες

($\text{SiOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiO}^- + \text{H}_3\text{O}^+$). Όπως παρουσιάζεται και στο **Σχήμα 2.21**, αντισταθμιστικά ιόντα τείνουν να προσροφώνται σε αυτή με ηλεκτροστατικές δυνάμεις έλξης.



Σχήμα 2.21. Απεικόνιση της διπλοστιβάδας που σχηματίζεται στο τοίχωμα του τριχοειδούς σωλήνα.

Το γεγονός αυτό εξισορροπεί το αρνητικό φορτίο της επιφάνειας, δημιουργώντας μια άκαμπτη στιβάδα, η οποία αποκαλείται στιβάδα Stern. Μια εξωτερική στιβάδα διάχυσης εξισορροπεί με τη στιβάδα Stern. Τα κατιόντα της στιβάδας διάχυσης είναι επιδιαλυτωμένα και παρασύρουν μαζί τους την κύρια μάζα του διαλύματος. Έτσι, όλα τα είδη αποκτούν μια ταχύτητα όδευσης προς την κάθοδο [190]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία της EOF, η οποία περιγράφεται από την εξίσωση:

$$v_{EOF} = \left(\frac{\epsilon \zeta}{\eta} \right) E$$

Εξίσωση (2.5)

όπου v_{EOF} είναι η ηλεκτροωσμωτική ταχύτητα, ζ είναι το δυναμικό ζήτα και ϵ η διηλεκτρική σταθερά του BGE. Το δυναμικό ζήτα είναι το δυναμικό που αναπτύσσεται στις στιβάδες και εξαρτάται από το πάχος της στιβάδας διάχυσης και το φορτίο στην επιφάνεια της τριχοειδούς στήλης.

Η δημιουργία της EOF έχει ως αποτέλεσμα την κίνηση όλων των ειδών, ανεξάρτητα από το φορτίο τους, προς την ίδια κατεύθυνση. Παρουσία της ηλεκτροώσμωσης, η ταχύτητα ενός ιόντος είναι το άθροισμα της ταχύτητας όδευσης και της ταχύτητας της EOF [189-191].

Έτσι, η ταχύτητα όδευσης των ιόντων που αποκτούν μέσα στη στήλη είναι:

$$\mathbf{v} = (\mu_e + \mu_{EOF})\mathbf{E}$$

Εξίσωση (2.6)

Η EOF εκφράζεται επίσης από την ηλεκτροωσμωτική ευκινησία, μ_{EOF} :

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon\zeta}{\eta}$$

Εξίσωση (2.7)

Η ευκινησία των ιόντων είναι το άθροισμα της ηλεκτροφορητικής και της ηλεκτροωσμωτικής τους ροής:

$$\mu_{app} = \mu_e + \mu_{EOF}$$

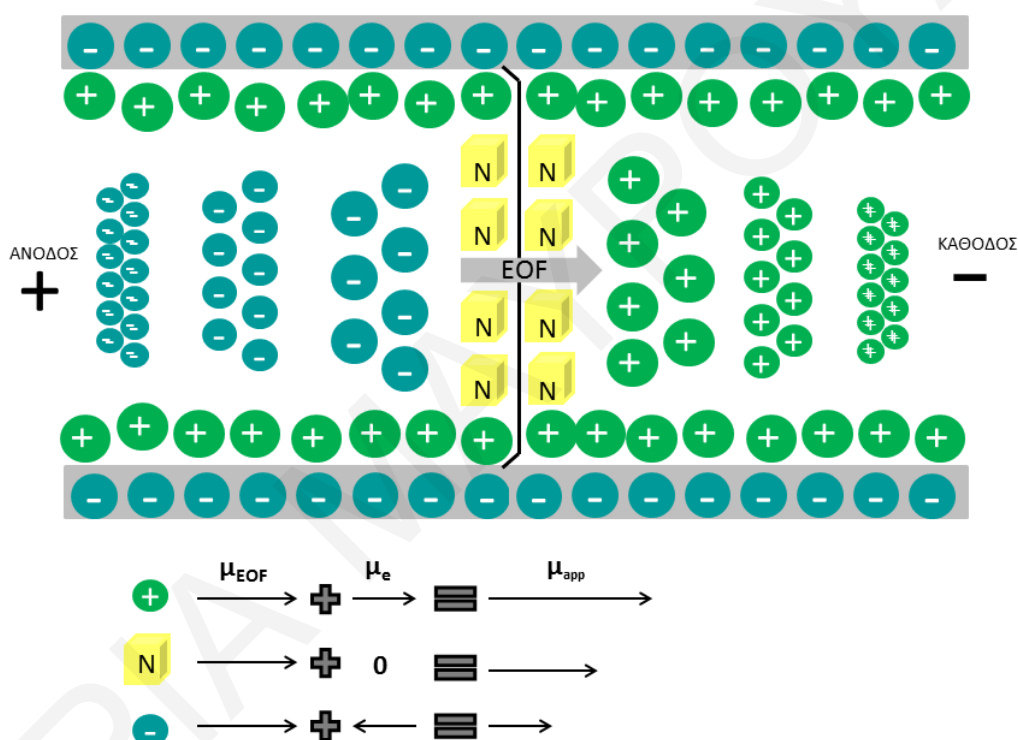
Εξίσωση (2.8)

όπου, μ_{app} , είναι η φαινομενική ευκινησία.

Τα κατιόντα έλκονται προς την κάθοδο μαζί με την EOF, και έτσι η ταχύτητα τους αυξάνεται. Τα ανιόντα, έλκονται ηλεκτροφορητικά προς την άνοδο. Μετακινούνται όμως προς την κάθοδο μαζί με την κύρια ροή του BGE, επειδή η μ_e είναι μικρότερη σε μέγεθος από την μ_{EOF} . Επιπλέον, ουδέτερα φορτισμένα είδη μεταφέρονται με την EOF. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, τα κατιόντα με το μεγαλύτερο λόγο φορτίο προς μέγεθος μεταναστεύουν πρώτα, ακολουθούμενα από κατιόντα με μικρότερο λόγο. Στη συνέχεια εκλούνται όλα τα ουδέτερα είδη χωρίς να διαχωριστούν μεταξύ τους, καθώς ο λόγος φορτίο προς μέγεθος είναι μηδέν. Τέλος, μετακινούνται τα ανιόντα, εκ των οποίων αυτά με το χαμηλότερο λόγο φορτίο προς μέγεθος να μεταναστεύουν πρώτα. Στο **Σχήμα 2.22**, παρουσιάζεται σχηματική απεικόνιση της μετανάστευσης των ουσιών λόγω της EOF. Να αναφερθεί επίσης, ότι η πολικότητα μπορεί να αναστραφεί και η σειρά έκλουσης να αλλάξει ανάλογα με το αν η EOF καταστέλλεται ή αντιστρέφεται [191].

Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό της EOF είναι ότι κατανέμεται ομοιόμορφα κατά μήκος της στήλης. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2.23 (α)**, η κινητήρια δύναμη της ροής είναι ομοιόμορφα κατανεμημένη κατά μήκος της τριχοειδούς στήλης. Δεν παρατηρείται πτώση πίεσης και

έτσι, η ροή είναι σχεδόν ομοιόμορφη σε όλη τη στήλη [187, 190]. Αυτή η επίπεδη ροή αποτελεί ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα της CE σε σύγκριση με άλλες τεχνικές, των οποίων οι ροές προκαλούνται από εφαρμογή εξωτερικής υψηλής πίεσης, με αποτέλεσμα να παρατηρείται παραβολική ή τυρβώδης ροή (Σχήμα 2.23 (β)). Το πλεονέκτημα που προσφέρει η επίπεδη ροή είναι ότι δε συμβάλλει στη διεύρυνση των ζωνών των κορυφών του αναλύτη καθώς περνούν κατά μήκος της στήλης, και κατά συνέπεια οδηγεί σε αύξηση του διαχωρισμού, μείωση της διεύρυνσης των κορυφών και αύξηση της αποδοτικότητας των κορυφών.



Σχήμα 2.22. Απεικόνιση της σειράς μετανάστευσης των αναλυτών λόγω της EOF.

Η επιλογή του BGE είναι πολύ σημαντικός παράγοντας αφού η σύστασή του επηρεάζει τη μετανάστευση των αναλυτών. Η επιλογή του κατάλληλου BGE στο διαχωρισμό στην CE περιλαμβάνει μελέτη πολλών παραγόντων, όπως της διαλυτότητας και της σταθερότητας των αναλυτών στον ηλεκτρολύτη, το βαθμό ιονισμού των αναλυτών, την επίδραση των ανιόντων και των κατιόντων του ηλεκτρολύτη στη μετανάστευση των ουσιών, την επίδραση

του pH, οργανικών τροποποιητών και άλλων πρόσθετων και την απώλεια της θερμότητας που δημιουργείται στον ηλεκτρολύτη κατά τη διέλευση του ρεύματος [189, 192].



(α) Ροή λόγω EOF-Ηλεκτροοσμωτική Ροή

(β) Ροή υπό Πίεση-Υδροδυναμική Ροή

Σχήμα 2.23. Προφίλ ροών (α) παρουσία της EOF και (β) σε ροή προκαλούμενη από εφαρμογή πίεσης.

2.5.5 Μέθοδοι CE

Πίνακας 2.1. Βασικότερες μέθοδοι CE και η αρχή στην οποία βασίζεται ο διαχωρισμός.

Μέθοδος CE	Ακρωνύμιο	Αρχή Διαχωρισμού
Ηλεκτροφόρηση Ζώνης Τριχοειδούς	CZE	Φορτίο ως προς το μέγεθος.
Ηλεκτροκινητική Χρωματογραφία	EKC	Υδρόφοβες ή ιοντικές αλληλεπιδράσεις με διάφορα πρόσθετα (π.χ. επιφανειοδραστικά
Ηλεκτροχρωματογραφία πληρωμένης στήλης	p-CEC	Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με υλικό πλήρωσης. Αλληλεπιδράσεις με κινητή φάση.
Ηλεκτροχρωματογραφία τριχοειδούς ανοικτού σωλήνα	OT-CEC	Υδρόφοβες ή ιοντικές αλληλεπιδράσεις με επικάλυψη της στήλης.
Ισοταχοφόρηση τριχοειδούς	CITP	Μετανάστευση σε όρια ανάλογα με την αναλογία φορτίο ως προς μάζα.
Ισοηλεκτρική εστίαση τριχοειδούς	CIEF	Ισοηλεκτρικό σημείο
Ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς πηκτής	CGE	Μέγεθος του μορίου

Στην CE οι διαχωρισμοί μπορούν να επιτευχθούν με διάφορους τρόπους. Η προέλευση των διαφόρων μεθόδων για το διαχωρισμό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η CE αναπτύχθηκε από το συνδυασμό διαφόρων ηλεκτροφορητικών και χρωματογραφικών τεχνικών. Αν και οι περισσότεροι διαχωρισμοί πραγματοποιούνται με χρήση υγρού ως μέσον για το διαχωρισμό, η CE περιλαμβάνει τεχνικές, στις οποίες ο τριχοειδής περιέχει ηλεκτροφορητική πηκτή, χρωματογραφικό υλικό πλήρωσης ή επικάλυψη. Στον **Πίνακα 2.1** συνοψίζονται οι βασικότερες μέθοδοι CE και η αρχή στην οποία βασίζεται ο διαχωρισμός σε κάθε περίπτωση [183, 189]. Το κύριο πλεονέκτημα της ποικιλίας των διαφορετικών εφαρμογών της CE είναι ο διαχωρισμός και η ανάλυση μιας ευρείας κλίμακας διαφορετικών ουσιών, από ανόργανα μόρια μέχρι βιολογικά πολυμερή [42].

2.5.5.1 Ηλεκτροφόρηση Ζώνης Τριχοειδούς (CZE)

Η ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς (Capillary Zone Electrophoresis, *CZE*) αποτελεί την πιο κοινή εφαρμογή της CE, λόγω της απλότητας και της ευελιξίας της. Βρίσκει εφαρμογή στην ανάλυση αμινοξέων, πεπτιδίων, ιόντων, εναντιομερών ουσιών και ιοντικών ειδών. Η *CZE* είναι η πιο απλή τεχνική σε σχέση με τις υπόλοιπες, διότι η τριχοειδής στήλη διατρέχεται μόνο από απλό ρυθμιστικό διάλυμα σταθερής σύστασης. Λόγω της EOF μπορούν να διαχωριστούν μόνο κατιοντικοί και ανιοντικοί αναλύτες. Η ηλεκτροφορητική ευκινησία των φορτισμένων αναλυτών προσδιορίζεται από το λόγο φορτίο ως προς μέγεθος. Ουδέτεροι αναλύτες, εκλούνται όλοι μαζί σε μια κορυφή αφού δεν έχουν φορτίο και κατά συνέπεια δεν έχουν δικές τους ηλεκτροφορητικές ευκινησίες και η μόνη κινητήρια δύναμη είναι η EOF, η οποία είναι η ίδια για όλα τα ουδέτερα συστατικά στο δείγμα [66].

2.5.5.2 Ηλεκτροκινητική Χρωματογραφία (EKC)

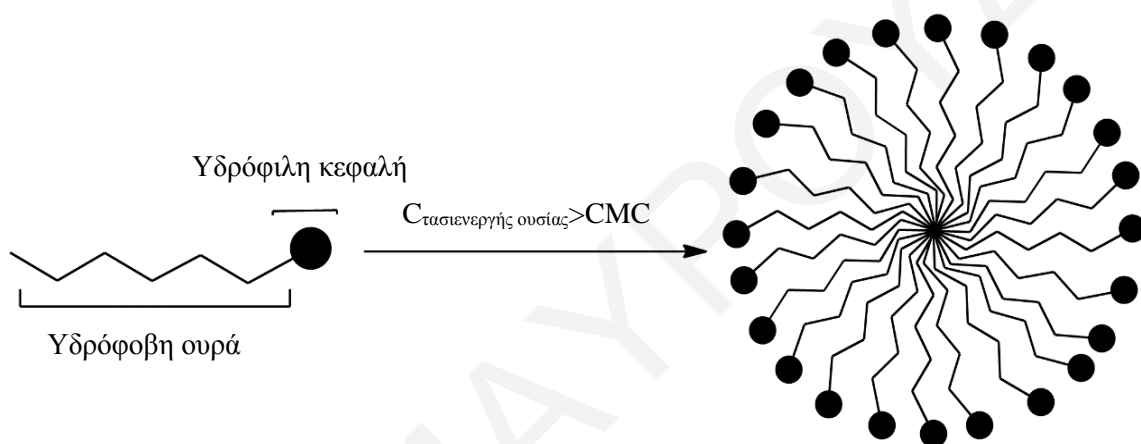
Στην ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (Electrokinetic Chromatography, *EKC*), η τριχοειδής στήλη γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιέχει ένα πρόσθετο που λειτουργεί ως ψευδοστατική φάση και αλληλεπιδρά με τον αναλύτη. Συνεπώς, οποιαδήποτε τεχνική χρησιμοποιεί ψευδοστατική φάση καλείται *EKC*. Για παράδειγμα, όταν μέσα στον BGE προστίθενται CDs, η μέθοδος αυτή καλείται CD-*EKC*. Αντίστοιχα, αν χρησιμοποιεί τασιενεργά μόρια (μικκύλια), τότε καλείται Micellar Electrokinetic Chromatography (*MEKC*) [193].

Η MEKC ανακαλύφθηκε το 1984 από τον Terabe και τους συνεργάτες του και αποτελεί μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιημένες μεθόδους ηλεκτροφόρησης τριχοειδούς. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της είναι ότι επιτρέπει το διαχωρισμό τόσο φορτισμένων όσο και ηλεκτρικώς ουδέτερων σωματιδίων [194, 195]. Βασίζεται στην εισαγωγή επιφανειοδραστικής ουσίας στο ρυθμιστικό διάλυμα, σε επίπεδα συγκέντρωσης όπου σχηματίζονται μικκύλια. Τα επιφανειοδραστικά, αμφίφιλα μόρια αποτελούνται από μια πολική ή ιοντική κεφαλή και μια υδρογονανθρακική ουρά. Η κεφαλή εμφανίζει υδρόφιλες ιδιότητες και είναι συμβατή με υδατικό περιβάλλον, ενώ η ουρά είναι υδρόφοβη. Τα μικκύλια είναι συσσωματώματα των επιφανειοδραστικών ουσιών, με τις υδρόφοβες ουρές των επιφανειοδραστικών μορίων να προσανατολίζονται προς το κέντρο για να αποφύγουν τις αλληλεπιδράσεις με τον υδρόφιλο BGE και τα φορτισμένα άκρα να εκτείνονται στην υδατική φάση. Ανάλογα με τη φύση της κεφαλής τους, τα τασιενεργά μόρια κατηγοριοποιούνται σε ανιοντικά, κατιοντικά, μη-ιοντικά και διπολικά ιόντα. Τα μικκύλια, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, σχηματίζονται σε υδατικά διαλύματα όταν η συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού αυξηθεί πάνω από την κρίσιμη μικυλιακή συγκέντρωση (Critical Micellar Concentration, *CMC*) (Σχήμα 2.24). Τα μικκύλια είναι φορτισμένα και έτσι μεταναστεύουν κατά τη φορά ή αντίθετα με την EOF ανάλογα με το φορτίο τους. Το SDS είναι το πιο κοινό επιφανειοδραστικό, το οποίο χρησιμοποιείται στη MEKC. Η επιφάνεια ενός ανιοντικού μικκυλίου αυτού του τύπου έχει ένα μεγάλο αρνητικό φορτίο, το οποίο του προσδίδει μεγάλη ηλεκτροφορητική ευκινησία προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Ο ανιοντικός χαρακτήρας των ομάδων θειικού άλατος του SDS αναγκάζει το επιφανειοδραστικό και τα μικκύλια να έχουν ηλεκτροφορητική ευκινησία που είναι αντίθετη προς την κατεύθυνση της ισχυρής EOF. Η φάση αυτή που δημιουργείται από τα μικκύλια αποκαλείται ψευδοστατική φάση. Ως αποτέλεσμα, τα μικκύλια μεταναστεύουν πολύ αργά προς την κάθοδο. Ως εκ τούτου, κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού, οι αναλύτες κατανέμονται μεταξύ του εσωτερικού υδρόφοβου μικκυλίου και του υδρόφιλου ρυθμιστικού διαλύματος [193, 196].

2.5.5.3 Ηλεκτροχρωματογραφία Τριχοειδούς Πληρωμένης Στήλης (p-CEC)

Η ηλεκτροχρωματογραφία τριχοειδούς πληρωμένης στήλης (Packed Capillary Electrophoresis, *p-CEC*) είναι ένα είδος ηλεκτροχρωματογραφίας, στην οποία η στήλη από τηγμένη πυριτία είναι πληρωμένη με ένα τυπικό υλικό πλήρωσης που

χρησιμοποιείται στις στήλες HPLC (π.χ. δεκαοκτυλιωμένη πυριτία). Η κινητή φάση στην p-CEC μετακινείται λόγω της EOF που αναπτύσσεται μέσα στη στήλη. Ωστόσο, όταν το υλικό πλήρωσης αποτελείται από αλκυλιωμένα σωματίδια πυριτίας, η EOF εκμηδενίζεται λόγω του μικρού ποσοστού φορτισμένων σιλανομάδων. Ένας τρόπος για βελτίωση αυτού του προβλήματος είναι η χρήση μίγματος μη-τροποποιημένης πυριτίας και τροποποιημένης πυριτίας. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με τον ίδιο τρόπο που πραγματοποιείται στην HPLC. Οι αναλύτες κατανέμονται μεταξύ στατικής και κινητής φάσης, ανάλογα με την πολικότητά τους [197].



Σχήμα 2.24. Σχηματική απεικόνιση μικυλλίου.

Για την πλήρωση της στήλης στην p-CEC απαιτείται η κατασκευή φριτών (*frits*), τα οποία είναι απαραίτητα για τη συγκράτηση του πληρωμένου υλικού μέσα στη στήλη. Ένα πρόβλημα που παρατηρείται σε αυτή την τεχνική είναι η παρουσία φυσαλίδων, οι οποίες σχηματίζονται γύρω από το υλικό πλήρωσης ή/και τις φρίτες. Αυτό οδηγεί σε ασταθή γραμμή βάσης, μεταβαλλόμενους χρόνους μετανάστευσης και πτώση/εκμηδενισμό του ρεύματος. Επιπλέον, απαιτείται εφαρμογή υψηλής πίεσης στα άκρα της στήλης για την επίτευξη κίνησης κατά μήκος της στήλης. Συνεπώς, παρά το μεγάλο εύρος εφαρμογών της p-CEC, η οργανολογία και η προετοιμασία της στήλης είναι περίπλοκη και δύσκολη [197, 198]. Για την αποφυγή των παραπάνω δυσκολιών και προβλημάτων, αναπτύχθηκε η εναλλακτική μέθοδος OT-CEC.

2.5.5.4 Ηλεκτροχρωματογραφία Τριχοειδούς Ανοικτού Σωλήνα (OT-CEC)

Η ηλεκτροχρωματογραφία τριχοειδούς ανοικτού σωλήνα (Open tubular-CEC, *OT-CEC*) είναι μια τεχνική, στην οποία η στατική φάση μπορεί, είτε να προσροφάται, είτε να δεσμεύεται μέσα στη στήλη, χωρίς να απαιτείται η κατασκευή φριτών. Ως εκ τούτου, με βάση τη διαδικασία προετοιμασίας της στήλης, σε σύγκριση με την p-CEC, η τεχνική αυτή θεωρείται πιο εύκολη και γρήγορη [199].

Η προσρόφηση δημιουργείται μετά από προσθήκη τροποποιητών μέσα στον BGE, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τα τοιχώματα της στήλης, σχηματίζοντας, έτσι, μια στατική φάση. Τέτοιοι τροποποιητές είναι τα κατιοντικά επιφανειοδραστικά, τα επιφανειοδραστικά πολυμερή και τα φορτισμένα πολυμερή [197].

Η δέσμευση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση ενός διασταυρωτή, ο οποίος δεσμεύεται αρχικά στις σιλανομάδες της στήλης και ακολούθως με τη στατική φάση. Δέσμευση επίσης, πραγματοποιείται με πολυμερισμό, κατά τον οποίο τα μονομερή πολυσυμπυκνώνονται και ακολούθως με χρήση ενός διασταυρωτή σχηματίζεται η στατική φάση μέσα στη στήλη [200-203].

2.5.5.5 Ισοταχοφόρηση Τριχοειδούς (CITP)

Η ισοταχοφόρηση τριχοειδούς (Capillary Isotachopheresis, *CITP*) έχει ονομαστεί έτσι λόγω του ότι όλες οι ζώνες του αναλύτη κινούνται με την ίδια ταχύτητα. Χρησιμοποιείται κυρίως ως ένα βήμα πριν τον πραγματικό διαχωρισμό, ώστε να ενισχυθεί η ευαισθησία. Η ταυτοποίηση των αναλυτών γίνεται βάση της αγωγιμότητάς τους. Στην περίπτωση αυτή η ανίχνευση πραγματοποιείται με ανιχνευτή αγωγιμότητας. Πρώτοι εξέρχονται οι αναλύτες με τη μεγαλύτερη ευκινησία και την υψηλότερη αγωγιμότητα [183].

2.5.5.6 Ισοηλεκτρική Εστίαση Τριχοειδούς (CIEF)

Η ισοηλεκτρική εστίαση τριχοειδούς (Capillary Isoelectric Focusing, *CIEF*) χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό αμφιπρωτικών ουσιών, δηλαδή ουσιών των οποίων τα διαλύματα είναι και δότες και δέκτες πρωτονίων. Τέτοιοι αναλύτες διαχωρίζονται με βάση τη διαφορετικότητα στο ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI), δηλαδή την τιμή pH στην οποία το

φορτίο τους μηδενίζεται. Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές ισορροπίας των αναλυτών και όχι στις διαφορετικές ταχύτητες όδευσης [183].

2.5.5.7 Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδούς Πηκτής (CGE)

Η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς πηκτής (Capillary Gel Electrophoresis, *CGE*) πραγματοποιείται σε μήτρα πορώδους πηκτής πολυμερούς. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο βρίσκεται μέσα στους πόρους της πηκτής. Εφαρμόζεται κυρίως στους διαχωρισμούς μεγάλων μορίων, όπως πρωτεΐνες, ολιγονουκλεοτίδια και θραύσματα DNA με ίδιο λόγο φορτίο-προς-μέγεθος. Ο διαχωρισμός γίνεται μόνο με βάση το μέγεθός τους. Αναλύτες με μεγαλύτερο μέγεθος κινούνται πιο αργά μέσα στον τριχοειδή και εξέρχονται τελευταίοι. Το συνηθέστερο είδος πηκτής είναι το πολυμερές πολυακρυλαμιδίου, ενώ άλλα πολυμερή που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι η αγαρόζη, η μεθυλιωμένη κυτταρίνη και η πολυαιθυλενογλυκόλη [183].

3 Πειραματικό Μέρος

3.1 Οργανολογία CE-UV

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε σύστημα PrinCE CE 760 (Σχήμα 3.1). Ένα σύστημα PrinCE CE αποτελείται από το τροφοδοτικό υψηλής τάσης, τα δύο δοχεία που περιέχουν τον BGE, ένα κωνικό δοχείο με τον αναλύτη, την τριχοειδή στήλη και τον ανιχνευτή συστοιχίας διόδων UV-Vis. Επιπλέον, στο σύστημα υπάρχει ένας αυτόματος δειγματολήπτης, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Ο χειρισμός του συστήματος και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του λογισμικού 3D-Dax.



Σχήμα 3.1. Σύστημα PrinCE CE.

3.1.1 Στήλη

Για όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη από τηγμένη πυριτία, η οποία καλύπτεται εξωτερικά από μια επίστρωση πολυιμιδίου, ενός θερμικά σταθερού πολυμερούς με καλή χημική αντίσταση και εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες. Η επίστρωση αυτή προσδίδει στη στήλη ελαστικότητα, προστατεύοντάς την από σπάσιμο και βοηθά στη διατήρηση της θερμοκρασίας κατά μήκος της στήλης. Η τηγμένη πυριτία είναι μη κρυσταλλική μορφή του διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) και παρουσιάζει τη χαρακτηριστική άμορφη δομή του γυαλιού. Η τηγμένη πυριτία έχει σχεδόν μηδενική θερμική διαστολή και καλή θερμική αντίσταση, παρουσιάζει πολύ καλή χημική αδράνεια, μπορεί να επικαλυφθεί, έχει χαμηλή διηλεκτρική σταθερά, είναι καλά διαπερατή στο UV-Vis και είναι φθηνή.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είχε εσωτερική διάμετρο (internal diameter, i.d.) 50 μm και εξωτερική διάμετρο 360 μm , ολικό μήκος (total length, L) 57,2 cm και αποτελεσματικό μήκος (effective length, l) 50 cm. Αποτελεσματικό μήκος είναι το μήκος της στήλης από την είσοδο της στήλης μέχρι τον ανιχνευτή. Στο σημείο αυτό δημιουργείται ένα παράθυρο ανίχνευσης περίπου 0,5 cm με κάψιμο του εξωτερικού στρώματος πολυϊμιδίου της στήλης ώστε η δέσμη φωτός από τον ανιχνευτή να διαπεράσει τη γυάλινη στήλη, η οποία αντικαθιστά την κυψελίδα, και να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση των αναλυτών.

Σημαντικός παράγοντας για την ύπαρξη σταθερών συνθηκών, ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή επαναληψιμότητα, είναι το πλύσιμο της στήλης. Στην παρούσα έρευνα, κάθε νέα στήλη πλενόταν αρχικά με απεσταγμένο νερό (H_2O) για 10 λεπτά, στη συνέχεια με υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) 1 M για μια ώρα, ξανά με H_2O για ακόμα 10 λεπτά και τέλος με το ρυθμιστικό διάλυμα (BGE) για 30 λεπτά. Ο ρόλος του NaOH είναι η αποπρωτονίωση των ομάδων σιλανόλης στην εσωτερική επιφάνεια της στήλης ενώ του BGE η επίτευξη συνθηκών ισορροπίας μέσα στη στήλη. Στα ενδιάμεσα των πειραμάτων η στήλη πλενόταν για 4 λεπτά με NaOH 1 M, 2 λεπτά με H_2O και 5 λεπτά με BGE για να διατηρούνται οι συνθήκες αποπρωτονίωσης και ισορροπίας της στήλης ώστε να μη χάνεται η επαναληψιμότητα. Η EOF ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας τη MeOH ως τον ουδέτερο δείκτη (neutral marker).

3.1.2 Ανιχνευτής UV-Vis

Το σύστημα PrinCE CE 760 είναι εφοδιασμένο με ανιχνευτή DAD για ανίχνευση στο UV-Vis. Για να είναι δυνατή η ανίχνευση με UV-Vis δημιουργείται παράθυρο ανίχνευσης περίπου 0,5 cm σε απόσταση 50 cm της στήλης με κάψιμο της εξωτερικής επίστρωσης πολυϊμιδίου. Στη συνέχεια, η στήλη τοποθετείται μέσα στην κασέτα με τέτοιο τρόπο ώστε το παράθυρο να συμπίπτει με το παράθυρο του ανιχνευτή. Η ανίχνευση των περισσότερων NSAIDs (ibuprofen, ketoprofen, flurbiprofen, indoprofen και fenoprofen) στο UV έγινε στα 200 nm, ενώ για την carprofen και τη naproxen στα 230 nm. Η ανίχνευση για τα κουμαρινικά παράγωγα (warfarin, coumachlor) έγινε στα 206 nm και για τη T4 στα 226 nm.

3.1.3 Τροφοδοτικό Υψηλής Τάσης

Στο σύστημα CE περιέχεται επίσης τροφοδοτικό υψηλής τάσης, με το οποίο εφαρμόζεται τάση εύρους 0 έως 30 kV και ρεύμα εύρους 0 έως 200 μA . Οι αντίστοιχες τιμές δυναμικού

μπορούν να προκύψουν με αντιστροφή ανόδου-καθόδου ή με επικάλυψη των τοιχωμάτων της στήλης. Η διατήρηση της τάσης σε σταθερά επίπεδα είναι σημαντική ώστε να υπάρχει επαναληψιμότητα στους χρόνους μετανάστευσης των αναλυτών. Οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν εφαρμόζοντας δυναμικό 30 kV, εκτός από τις περιπτώσεις που αναφέρεται διαφορετικά.

3.1.4 Θερμοστάτης

Εκτός από τη σταθερή τάση, σημαντική παράμετρος για την επίτευξη καλής επαναληψιμότητας είναι ο αποτελεσματικός έλεγχος της θερμοκρασίας της στήλης, αφού ο χρόνος μετανάστευσης των αναλυτών εξαρτάται ισχυρά από τη θερμοκρασία. Το σύστημα CE είναι εφοδιασμένο με θερμοστάτη αέρα, ο οποίος ρυθμίζει τη θερμοκρασία στους $\pm 0,1$ °C, διατηρώντας τη θερμοκρασία σταθερή και εξαλείφοντας τη θερμοκρασία Joule. Επιπρόσθετα, ο έλεγχος της θερμοκρασίας μπορεί να εφαρμοστεί ως παράμετρος βελτιστοποίησης του διαχωρισμού, αφού αυξομειώσεις της θερμοκρασίας οδηγούν σε αυξομειώσεις του ιξώδους του BGE, το οποίο με τη σειρά του προκαλεί μεταβολές στους χρόνους μετανάστευσης και στη R_s των αναλυτών. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 20 °C, εκτός από τις περιπτώσεις που αναφέρεται διαφορετικά.

3.1.5 Αυτόματος Δειγματολήπτης

Το σύστημα CE είναι επίσης εφοδιασμένο με αυτόματο δειγματολήπτη, με τον οποίο τα δοχεία δείγματος και BGE μεταφέρονται στα άκρα της στήλης. Έχει μεγάλη χωρητικότητα, η πρόσβαση στα δοχεία είναι εύκολη και γρήγορη και περιέχει θερμοστάτη. Ο θερμοστάτης είναι σημαντικός όταν τα δείγματα που χρησιμοποιούνται είναι θερμικά ασταθή ή έχουν κάποια πτητικότητα, με αποτέλεσμα η εξάτμισή τους να περιορίσει τον ποσοτικό τους προσδιορισμό.

3.1.6 Έγχυση Δείγματος

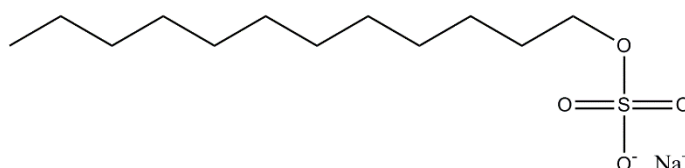
Η έγχυση του δείγματος για όλους τους αναλύτες που μελετήθηκαν στην παρούσα έρευνα πραγματοποιήθηκε υδροδυναμικά με εφαρμογή πίεσης 30 mbar για 3 sec. Επιλέχθηκε η υδροδυναμική έγχυση έναντι της ηλεκτροκινητικής έγχυσης λόγω της καλύτερης επαναληψιμότητας που προσφέρει [186].

Παρακάτω περιγράφεται το πειραματικό μέρος (αντιδραστήρια, αναλύτες, BGEs) που πραγματοποιήθηκε στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή για κάθε μελέτη ξεχωριστά. Το πειραματικό μέρος είναι χωρισμένο σε τέσσερα υποκεφάλαια, που αντιστοιχούν στις τέσσερις βασικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν: 1) η χρήση τασιενεργών ουσιών και AAILs για το μη εναντιομερή διαχωρισμό πέντε NSAIDs, 2) η συνεργιστική δράση του L-AlaC₄Lac με την TM-β-CD για τον εναντιομερή διαχωρισμό επτά NSAIDs, 3) η συνεργιστική δράση του L-AlaC₄Lac με τρία παράγωγα της β-CD για το χειρόμορφο διαχωρισμό 2 κουμαρινικών παραγώγων και 4) η χρήση διάφορων δυαδικών συστημάτων για το διαχωρισμό των εναντιομερών της T4 στην CE.

3.2 Πειραματικό Μέρος για τη «Χρήση Τασιενεργών Ουσιών και AAILs για το μη Εναντιομερή Διαχωρισμό Πέντε NSAIDs»

Αντιδραστήρια

Η MeOH ήταν υψηλής αναλυτικής καθαρότητας (HPLC grade). Ακόμα, τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, όπως τρις-υδροξυμεθυλο-αμινομεθάνιο (Tris(hydroxymethyl)aminomethane, *TRIS*), δεκαϋδρικό τετραβορικό νάτριο (Sodium tetraborate decahydrate, *Borate*), οξικό νάτριο (Sodium Acetate, *Acetate*), φωσφορικό νάτριο (Sodium Phosphate Monobasic/Sodium Phosphate Dibasic, *Phosphate*), δωδεκυλοθειικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, *SDS*) (**Σχήμα 3.2**), ιβουπροφαίνιο (ibuprofen, *IBU*), καρπροφαίνιο (carprofen, *CAR*), καιτοπροφαίνιο (ketoprofen, *KET*), ινδοπροφαίνιο (indoprofen, *INDO*), φλουρβιπροφαίνιο (flurbiprofen, *FLU*) επιλέχθηκαν να έχουν την υψηλότερη δυνατή καθαρότητα. Τα αντιδραστήρια για τη σύνθεση των AAILs ήταν το χλωρίδιο του τριτ-βουτυλικού εστέρα της L-αλανίνης (L-alanine tert-butyl ester hydrochloride, *L-AlaC₄Cl*), χλωρίδιο του τριτ-βουτυλικού εστέρα της D-αλανίνης (D-alanine tert-butyl ester hydrochloride, *D-AlaC₄Cl*), και ο γαλακτικός άργυρος (Silver Lactate, *AgLac*). Όλα τα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).



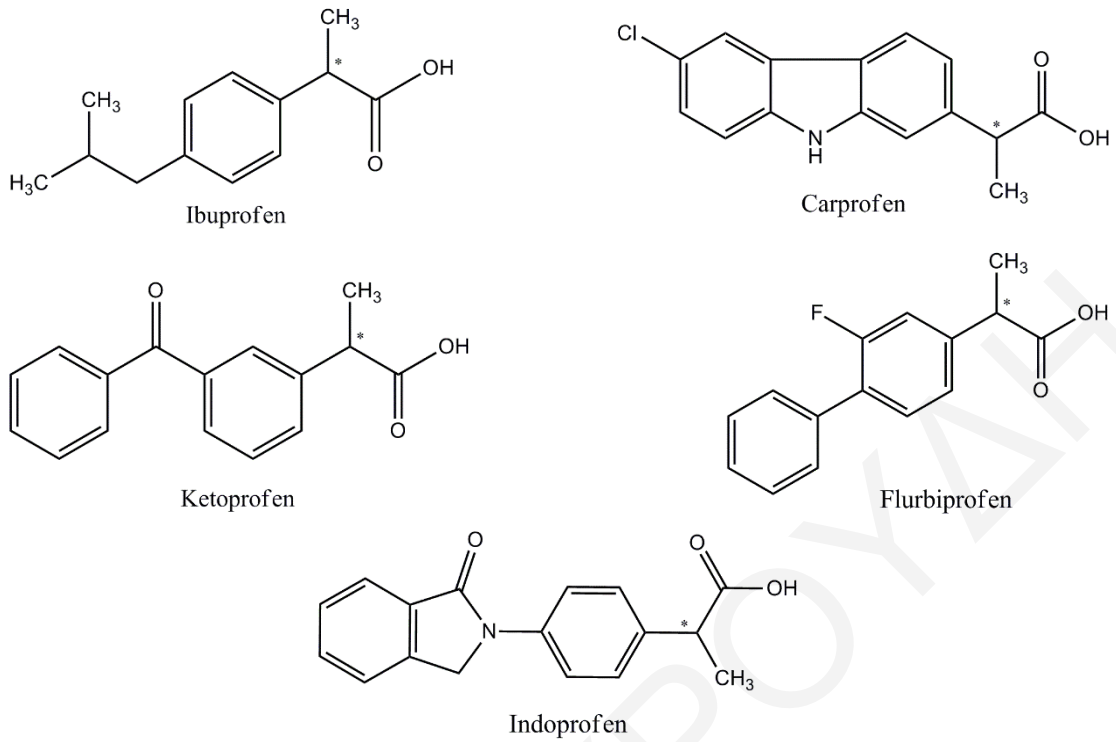
Σχήμα 3.2. Δομή του μονομερούς του επιφανειοδραστικού SDS.

Προετοιμασία BGE και δειγμάτων

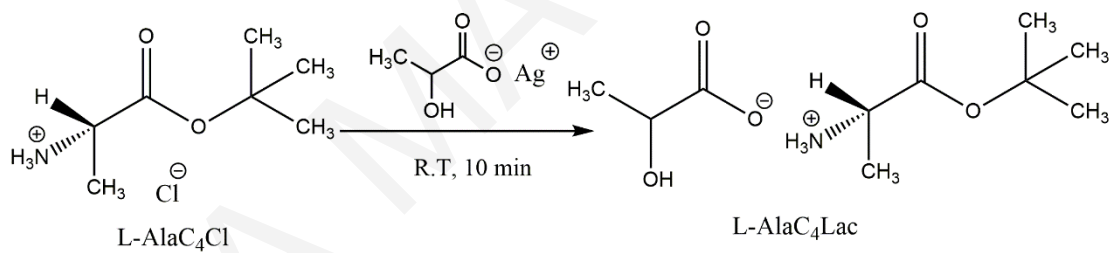
Ως BGEs χρησιμοποιήθηκαν μίγμα 100 mM TRIS και 10 mM Borate, 5 mM Acetate και 50 mM Phosphate για τη μελέτη διαχωρισμού των πέντε NSAIDs. Το pH ρυθμίστηκε στην επιθυμητή τιμή με προσθήκη 1 M NaOH ή 1 M HCl ή 1 M CH₃COOH ή 1 M H₃PO₄. Οι δομές των πιο πάνω αναλυτών φαίνονται στο **Σχήμα 3.3**. Τα AAILs, καθώς επίσης και η επιφανειοδραστική ουσία, προστέθηκαν και διαλύθηκαν μέσα στον BGE. Ακολούθως, έγινε ρύθμιση του pH και ο όγκος τους προσαρμόστηκε έτσι ώστε να σχηματιστούν διαλύματα με την επιθυμητή συγκέντρωση. Μετά από την παρασκευή τους, οι BGEs διηθούνταν με χρήση σύριγγας με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 μm και τοποθετούνταν σε σύστημα υπερήχων για 5 min. Όλα τα δείγματα των αναλυτών και οι BGEs φυλάγονταν, αμέσως μετά την παρασκευή τους, στους 4 °C. Τα πρότυπα διαλύματα των αναλυτών παρασκευάστηκαν μέσα σε μίγμα 50:50 MeOH/H₂O σε συγκέντρωση 2 mg/mL, προκειμένου να δώσουν τελική συγκέντρωση 0,4 mg/mL στο μείγμα.

Σύνθεση των AAILs

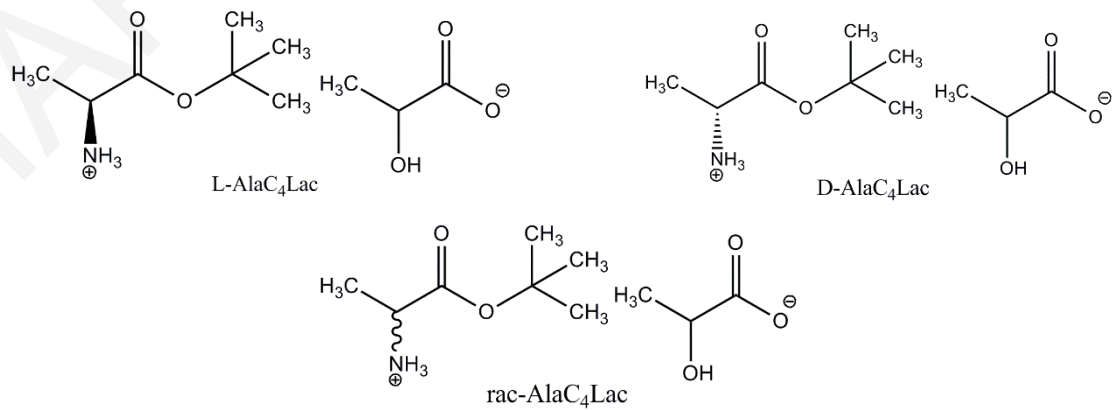
Σε αυτή τη μελέτη συντέθηκαν τρία AAILs: 1) ο γαλακτικός *τριτ* βουτυλεστέρας της L-αλανίνης (L-alanine *tert*-butyl ester lactate, *L-AlaC₄Lac*), 2) ο γαλακτικός *τριτ* βουτυλεστέρας της D-αλανίνης (D-alanine *tert*-butyl ester lactate, *D-AlaC₄Lac*) και 3) ο γαλακτικός *τριτ* βουτυλεστέρας της rac-αλανίνης (rac-alanine *tert*-butyl ester lactate, *rac-AlaC₄Lac*). Η τυπική σύνθεση των AAILs πραγματοποιήθηκε με βάση τη συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε σε προηγούμενες μελέτες [151, 171]. Μια ποσότητα από το αντίστοιχο χλωρίδιο του εστέρα και AgLac αναμίχθηκαν (αναλογία 1:1) ξεχωριστά σε MeOH. Ακολούθως τα δύο μίγματα αναμίχθηκαν και αναδεύτηκαν. Το στερεό που προέκυψε (AgCl) απομακρύνθηκε με διήθηση. Το διήθημα εξατμίστηκε υπό κενό και καθαρίστηκε με ανακρυστάλλωση σε MeOH/αιθέρα. Στο **Σχήμα 3.4** φαίνεται μια αντιπροσωπευτική πορεία σύνθεσης των AAILs και στο **Σχήμα 3.5** φαίνονται όλα τα AAILs που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.



Σχήμα 3.3. Δομές αναλυτών που μελετήθηκαν στο μη εναντιομερή διαχωρισμό.



Σχήμα 3.4. Αντιπροσωπευτική σύνθεση των AAILs.

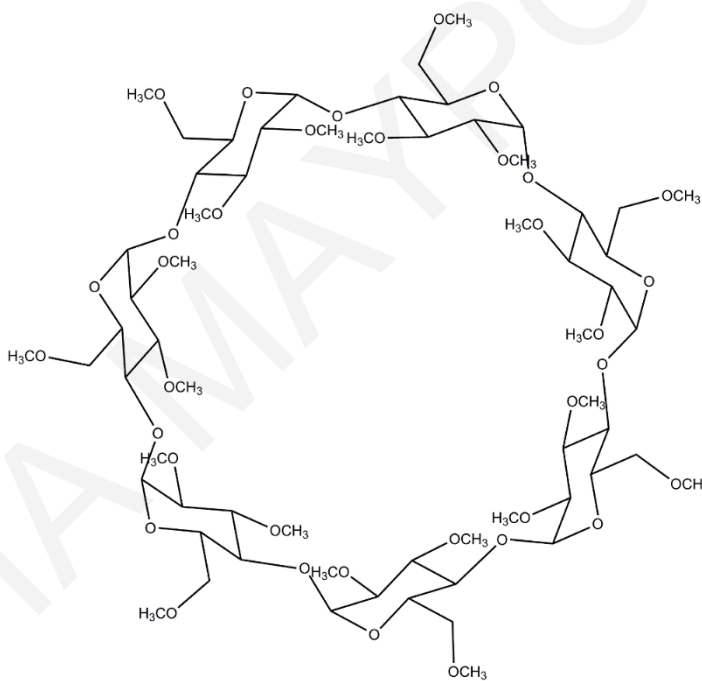


Σχήμα 3.5. Δομές των AAILs.

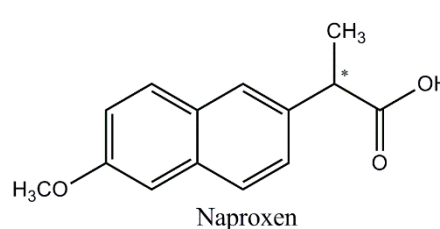
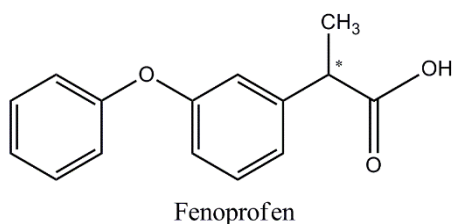
3.3 Πειραματικό Μέρος για τη «Συνεργιστική Δράση του L-AlaC₄Lac με την TM-β-CD για τον Εναντιομερή Διαχωρισμό Επτά NSAIDs»

Αντιδραστήρια

Σε αυτή τη μελέτη, η TM-β-CD χρησιμοποιήθηκε ως CS (M.W. 1429.54 g/mol) (**Σχήμα 3.6**) και ως πρόσθετο το AAIL L-AlaC₄Lac. Ο CS και όλοι οι αναλύτες αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Το L-AlaC₄Lac παρασκευάστηκε στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης σύμφωνα με την προαναφερθείσα μέθοδο. Οι αναλύτες που εξετάστηκαν ήταν η IBU, η CAR, η KET, η INDO, η FLU, η φαινοπροφαίνιο (fenoprofen, *FEN*) και η ναπροξαίνιο (naproxen, *NAP*). Οι δομές των δύο επιπλέον NSAIDs που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη φαίνονται στο **Σχήμα 3.7**.



Σχήμα 3.6. Δομή του CS, TM-β-CD.



Σχήμα 3.7. Δομές των επιπλέον αναλυτών που μελετήθηκαν στον εναντιομερή διαχωρισμό.

Προετοιμασία BGE και δειγμάτων

Σε αυτή τη μελέτη, ως BGE χρησιμοποιήθηκε 5 mM Acetate και το pH ρυθμίστηκε στην επιθυμητή τιμή με προσθήκη 1 M NaOH ή 1 M CH₃COOH. Το AAIL, καθώς επίσης και ο CS, προστέθηκαν και διαλύθηκαν μέσα στον BGE, έγινε ρύθμιση του pH και ο όγκος τους προσαρμόστηκε ανάλογα. Ακολούθως, οι BGEs μαζί με τα δείγματα των αναλυτών, φυλάγονταν στους 4 °C. Όλοι οι αναλύτες παρασκευάστηκαν μέσα σε μίγμα 50:50 MeOH/H₂O και σε συγκέντρωση 0,2 mg/mL.

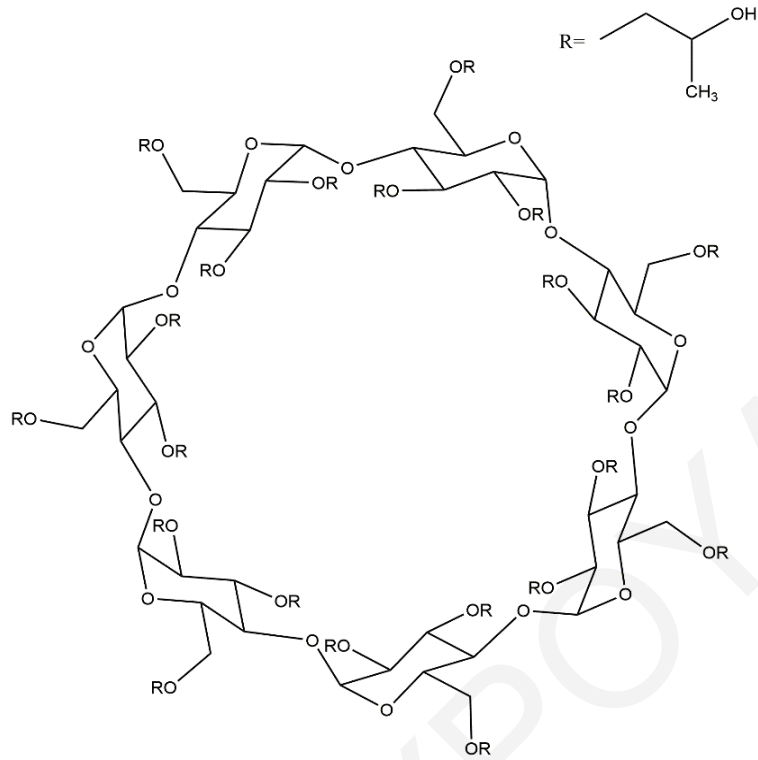
3.4 Πειραματικό Μέρος για τη «Συνεργιστική Δράση του L-AlaC₄Lac με Τρία Παράγωγα της β-CD για το Χειρόμορφο Διαχωρισμό Δύο Κουμαρινικών Παραγώγων»

Αντιδραστήρια

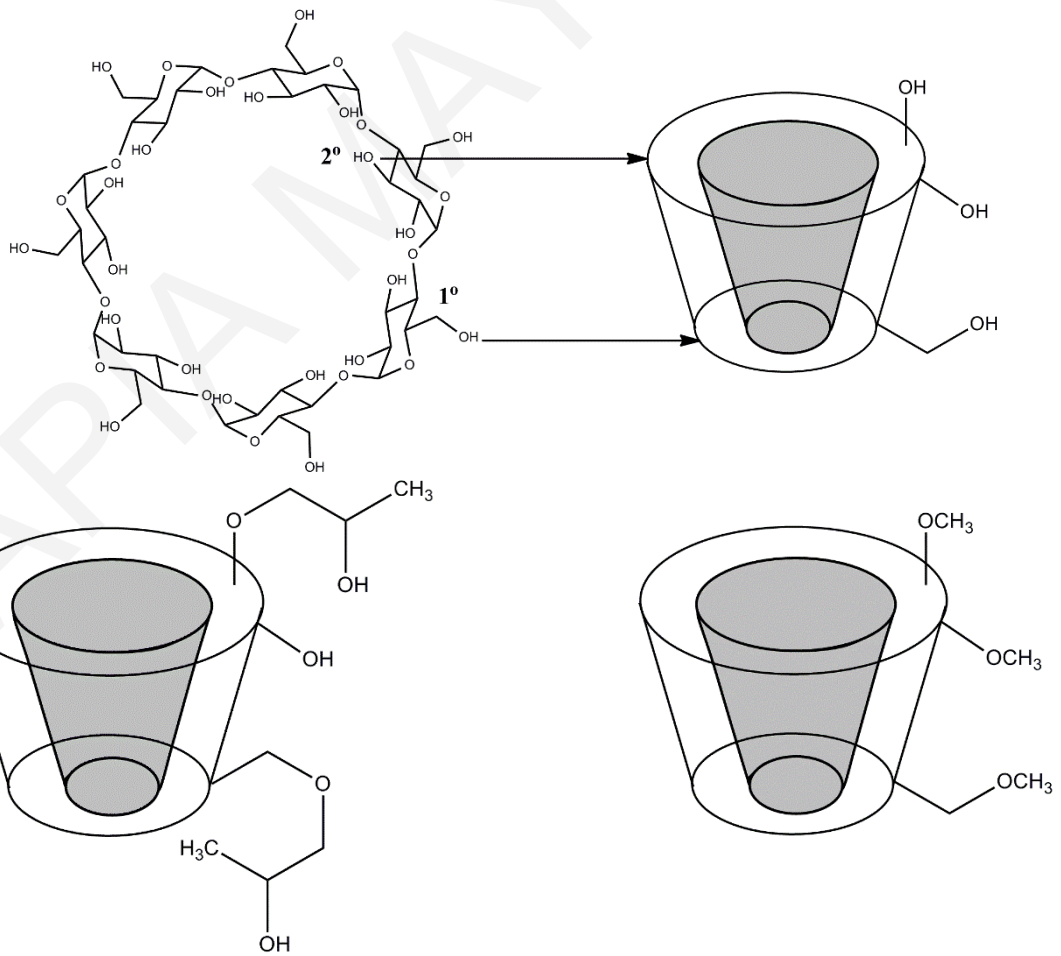
Σε αυτή τη μελέτη, οι β-CD (M.W.=1135,01 g/mol) (**Σχήμα 2.8**), HP-β-CD (M.W.=1540 g/mol) (**Σχήμα 3.8**) και TM-β-CD (M.W.=1429,54 g/mol) χρησιμοποιήθηκαν ως CSs και ως πρόσθετο το AAIL L-AlaC₄Lac. Στο **Σχήμα 3.9** παρουσιάζονται οι τρεις CSs που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη με τις χαρακτηριστικές τους λειτουργικές ομάδες και τη διαμόρφωσή τους στο χώρο. Οι CSs και οι αναλύτες αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Το L-AlaC₄Lac παρασκευάστηκε στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης σύμφωνα με την προαναφερθείσα μέθοδο. Οι αναλύτες που εξετάστηκαν ήταν η βαρφαρίνη (warfarin, WAR) και το coumachlor (COU). Οι δομές των δύο κουμαρινικών παραγώγων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη φαίνονται στο **Σχήμα 3.10**.

Προετοιμασία BGE και δειγμάτων

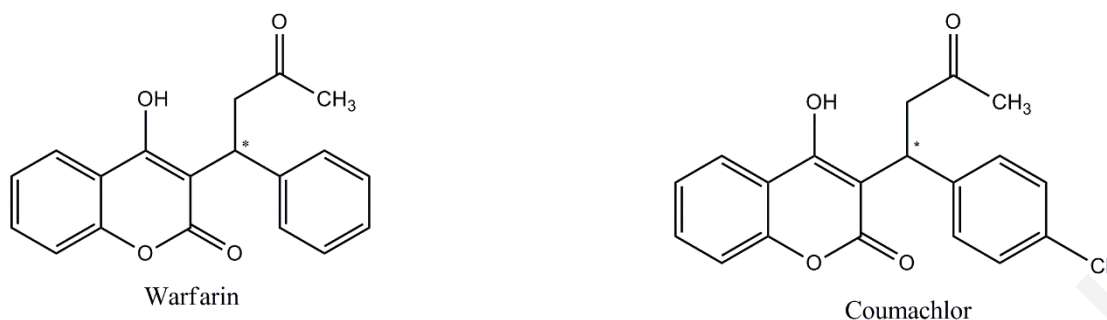
Σε αυτή τη μελέτη ως BGE χρησιμοποιήθηκε 5 mM Acetate και το pH ρυθμίστηκε στο 5,0 με προσθήκη 1 M CH₃COOH. Το AAIL, καθώς επίσης και οι CSs, προστέθηκαν και διαλύθηκαν μέσα στον BGE, έγινε ρύθμιση του pH και ο όγκος τους προσαρμόστηκε ανάλογα. Ακολούθως, οι BGEs μαζί με τα δείγματα των αναλυτών, φυλάγονταν στους 4 °C. Όλοι οι αναλύτες παρασκευάστηκαν μέσα σε μίγμα 50:50 MeOH/H₂O και σε συγκέντρωση 0,2 mg/mL.



Σχήμα 3.8. Δομή του CS, HP-β-CD.



Σχήμα 3.9. Δομές των CSs σε 3-D μορφή.

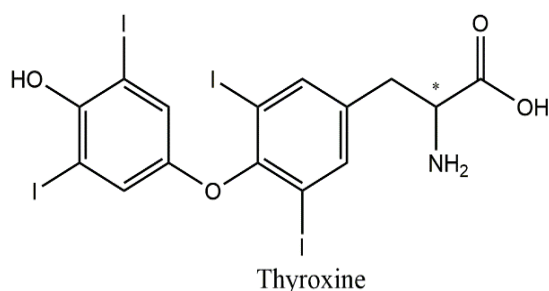


Σχήμα 3.10. Δομές των κουμαρινικών παραγώγων.

3.5 Πειραματικό Μέρος για τη «Χρήση Διάφορων Δυσαιδικών Συστημάτων για το Διαχωρισμό των Εναντιομερών της T4»

Αντιδραστήρια

Σε αυτή τη μελέτη, ως CSs χρησιμοποιήθηκαν οι TM-β-CD, HP-β-CD, HP-γ-CD, Θεϊκή-β-CD (Sulphated-β-CD, S-β-CD) και οι INs SP1 (μέσος βαθμός πολυμερισμού, Average Degree of Polymerization, *D.P.*=min. 23), TEX (*D.P.*=min. 23), HD (*D.P.*=8-12) και IQ (*D.P.*=8-12) και ως πρόσθετο το AAIL L-AlaC₄Lac. Οι INs παραχωρήθηκαν ευγενικά από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Grzegorz Bazyłak του Τμήματος Φαρμακευτικής του Nicolaus Copernicus University at Bydgoszcz (Poland). Το L-AlaC₄Lac παρασκευάστηκε στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης σύμφωνα με την προαναφερθείσα μέθοδο. Ο προς εξέταση αναλύτης ήταν η T4 (Σχήμα 3.10). Οι υπόλοιποι CSs και ο αναλύτης αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).



Σχήμα 3.11. Δομή της T4.

Προετοιμασία BGE και δειγμάτων

Ως BGEs χρησιμοποιήθηκαν μίγμα 100 mM TRIS και 10 mM Borate. Το pH ρυθμίστηκε στην επιθυμητή τιμή με προσθήκη 1 M NaOH ή 1 M HCl. Το AAIL, καθώς επίσης και οι CSs, προστέθηκαν και διαλύθηκαν μέσα στον BGE, έγινε ρύθμιση του pH και ο όγκος τους προσαρμόστηκε ανάλογα. Ακολούθως, οι BGEs μαζί με τα δείγματα των αναλυτών, φυλάγονταν στους 4 °C. Όλοι οι αναλύτες παρασκευάστηκαν μέσα σε μίγμα 50:50 MeOH/H₂O και σε συγκέντρωση 0,2 mg/mL.

3.6 Ανάλυση και Αξιολόγηση των Αποτελεσμάτων

Τα αναλυτικά δεδομένα χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο πιθανών υποψήφιων φαρμάκων, βοηθούν στην ανάπτυξη της σύνθεσης των φαρμάκων, ελέγχουν την σταθερότητα των φαρμακευτικών ουσιών και των προϊόντων τους και έπειτα γίνεται έλεγχος των τελικών προϊόντων πριν την προώθησή τους στην αγορά. Η διαδικασία που ακολουθείται για την ανάπτυξη και αξιολόγηση μιας μεθόδου έχει άμεσες επιπτώσεις στην ποιότητα των αναλυτικών δεδομένων.

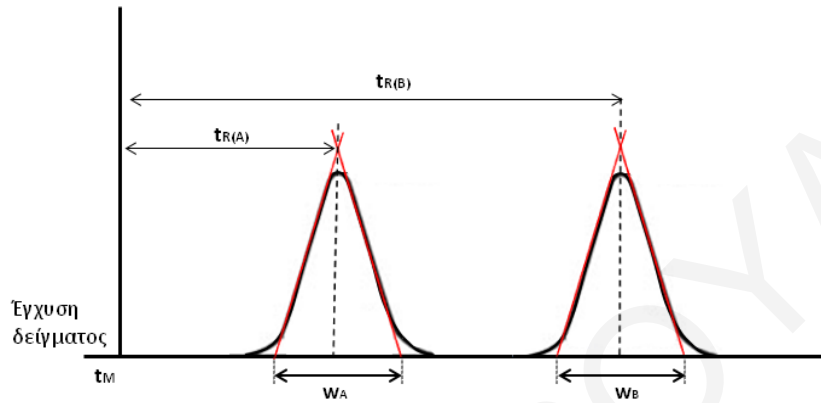
Η αποδοχή των αναλυτικών δεδομένων σχετίζεται άμεσα με τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της μεθόδου. Η αξιολόγηση της μεθόδου χωρίζεται σε τρία επίπεδα: (α) την πλήρη αξιολόγηση όταν μια μέθοδος αναπτύσσεται για πρώτη φορά και είναι σημαντική στην εισαγωγή νέων φαρμάκων, (β) τη μερική αξιολόγηση για τροποποίηση μιας ήδη υπάρχουσας αναλυτικής μεθόδου και (γ) τη διασταυρωμένη αξιολόγηση για σύγκριση των κριτηρίων αξιολόγησης όταν δύο ή περισσότερες αναλυτικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τη λήψη δεδομένων ίδιας μελέτης ή διαφορετικών μελετών.

Τα αποτελέσματα από μια ανάλυση CE μπορούν να χαρακτηριστούν από τη διαχωριστική ικανότητα. Η διαχωριστική ικανότητα περιγράφει την ικανότητα μιας στήλης να διαχωρίζει δύο αναλύτες (**Σχήμα 3.11**). Ο βασικός στόχος είναι η επίτευξη της μέγιστης δυνατής διαχωριστικής ικανότητας στο μικρότερο δυνατό χρόνο [66, 183]. Η διαχωριστική ικανότητα μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση:

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{w_A + w_B}$$

Εξίσωση (3.1)

όπου $(t_R)_A$ και $(t_R)_B$ οι χρόνοι μετανάστευσης των κορυφών A και B, αντίστοιχα, και w_A και w_B το εύρος της βάσης των κορυφών A και B, αντίστοιχα. Όταν η τιμή της R_s είναι ίση ή μεγαλύτερη από 1,5, τότε ο διαχωρισμός θεωρείται πλήρης, ενώ για τιμές R_s 0,75 έως 1,5, ο διαχωρισμός θεωρείται ικανοποιητικός για ποιοτική ανάλυση.



Σχήμα 3.12. Γραφική απεικόνιση των μεγεθών t_R και w που χρησιμοποιούνται κατά τον υπολογισμό της R_s .

Η ηλεκτροωσμωτική και ηλεκτροφορητική ευκινησία (μ_{EOF} και μ_e) υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη σχέση:

$$\mu_{EOF,e} = \frac{lL}{t_{nm,1}V}$$

Εξίσωση (3.2)

όπου L είναι το μήκος της στήλης, l το αποτελεσματικό μήκος, $t_{nm,1}$ είναι οι χρόνοι μετανάστευσης του ουδέτερου δείκτη (EOF) και της πρώτης κορυφής, αντίστοιχα, και V είναι το εφαρμοζόμενο δυναμικό.

Στις περιπτώσεις, όπου ο διαχωρισμός ήταν πλήρης, πολύ σημαντικός παράγοντας θεωρείται και η αποδοτικότητα (αριθμός θεωρητικών πλακών) των κορυφών, N , η οποία ορίζεται ως:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

Εξίσωση (3.3)

Πειραματικά, όσο πιο μεγάλη είναι η αποδοτικότητα, τόσο πιο μικρή είναι η διεύρυνση των κορυφών και άρα πιο οξείες και καλοσηματισμένες οι κορυφές.

Η επαναληψιμότητα (repeatability) αποτελεί μέτρο του τυχαίου ή απροσδιόριστου σφάλματος της ανάλυσης. Συγκεκριμένα, η επαναληψιμότητα περιγράφει τη συμφωνία μεταξύ των αναλυτικών δεδομένων για μια σειρά επαναλαμβανόμενων μετρήσεων ή για μετρήσεις που έχουν ληφθεί υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες [183]. Η εκτίμηση της επαναληψιμότητας της μεθόδου έγινε με το κριτήριο της σχετικής τυπικής απόκλισης (Relative Standard Deviation, RSD), η οποία δίνεται από την *εξίσωση 3.4*, ενώ η απόλυτη τυπική απόκλιση (Absolute Standard Deviation, s) δίνεται από την *εξίσωση 3.5*:

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Εξίσωση (3.4)

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Εξίσωση (3.5)

όπου x_i η μέση τιμή της i μέτρησης και \bar{x} η μέση τιμή N μετρήσεων.

4 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται και συζητούνται τα αποτελέσματα που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια ανάπτυξης και αξιολόγησης νέων μεθόδων διαχωρισμού στην CE χρησιμοποιώντας ILs στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής έρευνας. Το κεφάλαιο χωρίζεται σε τέσσερα μέρη. Στο πρώτο μέρος, έγινε χρήση τασιενεργών ουσιών και AAILs για το μη εναντιομερή διαχωρισμό πέντε NSAIDs. Το δεύτερο μέρος αφορά στη μελέτη της συνεργιστικής δράσης του L-AlaC₄Lac με την TM-β-CD για τον εναντιομερή διαχωρισμό επτά NSAIDs, ενώ στο τρίτο μέρος μελετάται η συνεργιστική δράση του L-AlaC₄Lac με τρία παράγωγα της β-CD για το χειρόμορφο διαχωρισμό 2 κουμαρινικών παραγωγών. Στο τέταρτο μέρος, στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΔΙΑΚΡΑΤΙΚΕΣ/ΚΥ-ΡΟΥ/0713 και σε συνεργασία με το ερευνητικό εργαστήριο της καθηγήτριας Raluca-Ioana Stefan-van Staden, μελετήθηκε η χρήση διάφορων δυαδικών συστημάτων για την ανάπτυξη μιας νέας αναλυτικής μεθόδου για το διαχωρισμό των εναντιομερών της T4.

4.1 Χρήση Τασιενεργών Ουσιών και των AAILs για το μη Εναντιομερή Διαχωρισμό Πέντε NSAIDs

Την τελευταία δεκαετία, μια νέα σειρά ILs, τα οποία αποτελούνται από αμινοξέα και εστέρες αμινοξέων, έχει συντεθεί και χαρακτηριστεί από τους Tao et al. [171, 204]. Η σύνθεση των συγκεκριμένων ILs από «βιο-ανανεώσιμα» (biorenewable) υλικά, αντί πρόδρομα συνθετικά χημικά μόρια, τα καθιστά πιο «πράσινα» από τα κοινώς χρησιμοποιούμενα ILs [171, 204]. Μέχρι τώρα, έχουν συντεθεί αρκετά AAILs, που έχουν κατιόντα βασισμένα σε αμινοξέα ή εστέρες αυτών (π.χ. γλυκίνη, αλανίνη, μεθυλεστέρα της αλανίνης, αιθυλεστέρα της αλανίνης, τριτ-βουτυλεστέρα της αλανίνης (AlaC₄⁺), κτλ.) [151, 171, 204]. Οι Bwambok et al. χρησιμοποίησαν μια απλή αντίδραση μετάθεσης με σκοπό να συνθέσουν AAILs, τα οποία έχουν ως κατιόν το AlaC₄⁺ και διάφορα ανόργανα ή οργανικά ανιόντα (NO₃⁻, BF₄⁻, Lac⁻ και NTf₂⁻). Οι φασματοσκοπικές τεχνικές NMR και φθορισμού έδειξαν ότι τα συγκεκριμένα AAILs έχουν εναντιοεκλεκτικές ιδιότητες και έτσι, προτάθηκε η χρήση τους στους χειρόμορφους διαχωρισμούς. Πρέπει να σημειωθεί ότι, μέχρι τώρα, τα AAILs δεν έχουν χρησιμοποιηθεί ως τα μόνα πρόσθετα στον BGE για μελέτες μη χειρόμορφων διαχωρισμών σε καμία ηλεκτροφορητική τεχνική.

Στη μελέτη αυτή αρχικά, για σκοπούς σύγκρισης, εξετάστηκε η χρήση μιας τασιενεργής ουσίας ως το μόνο πρόσθετο στον BGE για την επίτευξη του ταυτόχρονου διαχωρισμού. Η απόδοσή της αξιολογήθηκε με εξέταση των παραμέτρων που αναφέρονται παρακάτω. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η ικανότητα χρήσης των AAILs ως τα μοναδικά πρόσθετα στην CE. Μελετήθηκε, για πρώτη φορά, η ικανότητα λειτουργίας τους ως πρόσθετα σε ηλεκτροφορητική τεχνική για μελέτες μη χειρόμορφων διαχωρισμών. Συγκεκριμένα, τρία διαφορετικά AAILs συντέθηκαν και προστέθηκαν μέσα στον BGE, με στόχο την αξιολόγηση της δράσης τους στην CE. Η απόδοση των AAILs αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας ως μείγμα αναλυτών, πέντε φαρμακευτικές ενώσεις (IBU, CAR, KET, INDO, FLU) της ίδιας οικογένειας φαρμάκων και συγκεκριμένα των NSAIDs. Μελετήθηκαν διαφορετικές παράμετροι, όπως το είδος και το pH του BGE, η συγκέντρωση των πρόσθετων, η θερμοκρασία της στήλης, η διαμόρφωση του AAIL και το εφαρμοζόμενο δυναμικό, με στόχο την κατανόηση της επίδρασης που έχει η κάθε παράμετρος στο διαχωρισμό των NSAIDs και συγκεκριμένα στη R_s , και στην N , των τιμών της %RSD για τον κάθε αναλύτη. Τέλος, αξιολογήθηκε η συνεργιστική δράση της τασιενεργής ουσίας με το AAIL.

4.1.1 Επίδραση του Είδους του BGE

Σκοπός του BGE είναι η μεταφορά του ηλεκτρικού ρεύματος, η οποία είναι απαραίτητη για να προκύψει ο διαχωρισμός στην CE. Δεν αποτελεί όμως ένα παθητικό μέσο που δρα μόνο ως μεταφορέας των διαχωριζόμενων αναλυτών. Αντίθετα, αποτελεί μια πολύ σημαντική παράμετρο στους διαχωρισμούς με CE, διότι επηρεάζει την εκλεκτικότητα της μεθόδου και την ευαισθησία της ανίχνευσης των ουσιών.

Λόγω των ισχυρών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων τύπου Coulomb μεταξύ των ιόντων, ο BGE επηρεάζει σημαντικά φαινόμενα που συμβαίνουν κατά την κίνηση των φορτισμένων αναλυτών μέσα στη στήλη. Ένα από αυτά τα φαινόμενα είναι η δημιουργία ζωνών που προκύπτουν με την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη και οφείλονται στην παρουσία των ιόντων του BGE. Στους πλείστους διαχωρισμούς με χρήση της τεχνικής CE χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις BGE από 1 mM έως 1000 mM.

Για την επιλογή του κατάλληλου BGE πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ιοντική του ισχύς (αγωγιμότητα), καθώς και η απορρόφησή του στο UV. Η αγωγιμότητα του BGE δείχνει την

ευκολία με την οποία το ηλεκτρικό ρεύμα περνά μέσα από αυτό, όταν εφαρμοστεί διαφορά δυναμικού και άρα αποτελεί μέτρο των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (δυνάμεις Coulomb) σε αυτό. Ανάλογα με το είδος και τη συγκέντρωση ενός BGE, η τιμή της ιοντικής του ισχύος όταν ξεπεράσει μια συγκεκριμένη τιμή προκαλεί ηλεκτροδιασπορά, με αποτέλεσμα τη μείωση της αποδοτικότητας των κορυφών. Συγκεκριμένα, η ηλεκτροδιασπορά προκαλείται λόγω βαθμίδωσης της θερμοκρασίας κατά μήκος της στήλης, φαινόμενο γνωστό ως θερμότητα Joule, η οποία προκαλεί προβλήματα ρεύματος και αυξάνει το θόρυβο στο υπόβαθρο. Η αποδοτικότητα ενός διαχωρισμού στην CE διαφαίνεται από το σχήμα και τη συμμετρία των κορυφών. Γενικά, για να προκύψουν συμμετρικές κορυφές, και κατά συνέπεια υψηλή αποδοτικότητα, πρέπει οι αγωγιμότητες του BGE και του διαλύματος του αναλύτη να είναι ισοδύναμες. Σε περιπτώσεις σημαντικής διαφοράς μεταξύ της αγωγιμότητάς τους προκαλείται ηλεκτροδιασπορά, με αποτέλεσμα οι κορυφές να παρουσιάζουν ασυμμετρία, καταλήγοντας στην εμφάνιση του φαινομένου 'peak tailing', φαινόμενο κατά το οποίο η ασυμμετρία μιας κορυφής οφείλεται στην εμφάνιση ουράς. Η ουρά αυτή εμφανίζεται προς τα δεξιά σε ένα χρωματογράφημα, με αποτέλεσμα η κορυφή να καταρρέει αργά, ενώ η αρχή της να είναι απότομη. Είναι, λοιπόν, σημαντικό να επιλέγεται τόσο το κατάλληλο είδος, όσο και η κατάλληλη συγκέντρωση του BGE, ώστε να προκύψει διαχωρισμός με μεγάλη αποδοτικότητα. Επιπλέον, η επιλογή του κατάλληλου είδους του BGE είναι σημαντική, διότι, ανάλογα με αυτό, μπορεί να παρουσιαστεί προσρόφιση των συστατικών του στην εσωτερική επιφάνεια της στήλης με αποτέλεσμα να επηρεάζεται το φορτίο της. Όσον αφορά την απορρόφησή του στο UV, το BGE δεν πρέπει να απορροφά σε μήκη κύματος όπου απορροφούν οι προς ανάλυση ουσίες. Ως αποτέλεσμα του τελευταίου, προκύπτει ένα πιο απλό ηλεκτροφερόγραμμα, με κορυφές που να αντιστοιχούν μόνο στους αναλύτες.

Για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό των NSAIDs δοκιμάστηκαν διάφορα BGEs, σε ένα ευρύ φάσμα τιμών pH, ανάλογα με τη σταθερότητά τους σε αυτά. Στον **Πίνακα 4.1** φαίνονται το είδος, η συγκέντρωση και το pH των BGEs που εξετάστηκαν, καθώς και το εύρος σταθερότητας pH και το pKa για τον καθένα απ' αυτούς. Το εύρος αυτό είναι σημαντικό διότι σε ένα διαχωρισμό η τιμή του pH πρέπει να διατηρείται σταθερή. Οι BGEs παρουσιάζουν εύρος pH σε τιμές κοντά και γύρω από τα pKa τους. Επομένως, ανάλογα με τα pKa μπορούν να έχουν ένα ή περισσότερα εύρη pH.

Πίνακας 4.1. Είδος, συγκέντρωση, pH και εύρος σταθερότητας pH των BGEs που μελετήθηκαν.

Είδος BGE	Συγκέντρωση (mM)	pH	Εύρος σταθερότητας pH	pKa
Acetate (CH_3COONa)	5	5,0	3,7-5,6	4,76
Phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}/$ Na_2HPO_4)	25/25	7,0	5,8-8,0	7,2
Tris/Borate ($\text{B}_4\text{Na}_2\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	100/10	8,0	-	-

Τα NSAIDs, λόγω του καρβοξυλικού οξέος που περιέχουν, μπορούν να βρίσκονται σε δύο διαφορετικές μορφές (ανάλογα με το pH του BGE), την αποπρωτονιωμένη (ανιοντική) και την πρωτονιωμένη (ουδέτερη). Ανάλογα με το pKa τους, βρίσκονται και στην ανάλογη μορφή σε συγκεκριμένο pH. Δηλαδή, σε pH μικρότερα από την τιμή του pKa, βρίσκονται σε ουδέτερη μορφή, ενώ σε μεγαλύτερα βρίσκονται σε ανιονική μορφή.

Αρχικά, μελετήθηκαν BGEs σε όξινες και ουδέτερες τιμές pH και αυτοί ήταν το Acetate σε pH 5,0 και το Phosphate σε pH 7,0. Σε αυτούς προστέθηκε το AAIL, L-AlaC₄Lac, σε συγκέντρωση 20 mM, ή η τασιενεργή ουσία, SDS, σε συγκέντρωση 10 mM. Εφαρμόστηκε τάση 30 kV, θερμοκρασία 20 °C και η έγχυση έγινε υπό πίεση 30 mbar για 3 sec. Σε καμία περίπτωση δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του μείγματος. Αυτό συμβαίνει, διότι στην τιμή pH 5,0, οι αναλύτες βρίσκονται σε ένα μεγάλο ποσοστό στην ουδέτερή τους μορφή και όχι στην ανιοντική, αφού αυτή η τιμή του pH είναι πολύ κοντά στην τιμή pKa των αναλυτών. Έτσι, οι αλληλεπιδράσεις του μείγματος με τα πρόσθετα πιθανόν να μην είναι τόσο ισχυρές ώστε να επηρεάσουν την ευκινησία των αναλυτών και να οδηγήσουν στο διαχωρισμό τους. Ως αποτέλεσμα, το μείγμα εξέρχεται από τη στήλη με τη ροή της EOF. Επίσης, στην τιμή pH 7,0 οι αναλύτες, παρόλο που βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στην ανιοντική τους μορφή, δεν κατάφεραν να διαχωριστούν. Παρατηρήθηκε ακόμη πολύ ασταθής γραμμή βάσης και πολύ μεγάλοι χρόνοι συγκράτησης των ουσιών.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε BGE σε βασική τιμή pH (pH 8,0), στην οποία αναμένεται οι αναλύτες να παρουσιάζουν ανιοντική συμπεριφορά. Στην περίπτωση αυτή, παρατηρήθηκε μερικός διαχωρισμός του μείγματος. Για το λόγο αυτό, το 100 mM Tris/10 mM Borate επιλέχθηκε ως το βέλτιστο είδος BGE. Οι κορυφές που αντιστοιχούσαν στους πέντε αναλύτες εξέρχονται μετά την κορυφή-δείκτη της EOF, γεγονός που επιβεβαιώνει την ανιοντική συμπεριφορά των NSAIDs κάτω από αυτές τις συνθήκες. Ωστόσο, κρίθηκε αναγκαία ή περαιτέρω μελέτη των παραμέτρων και για τα δύο συστήματα.

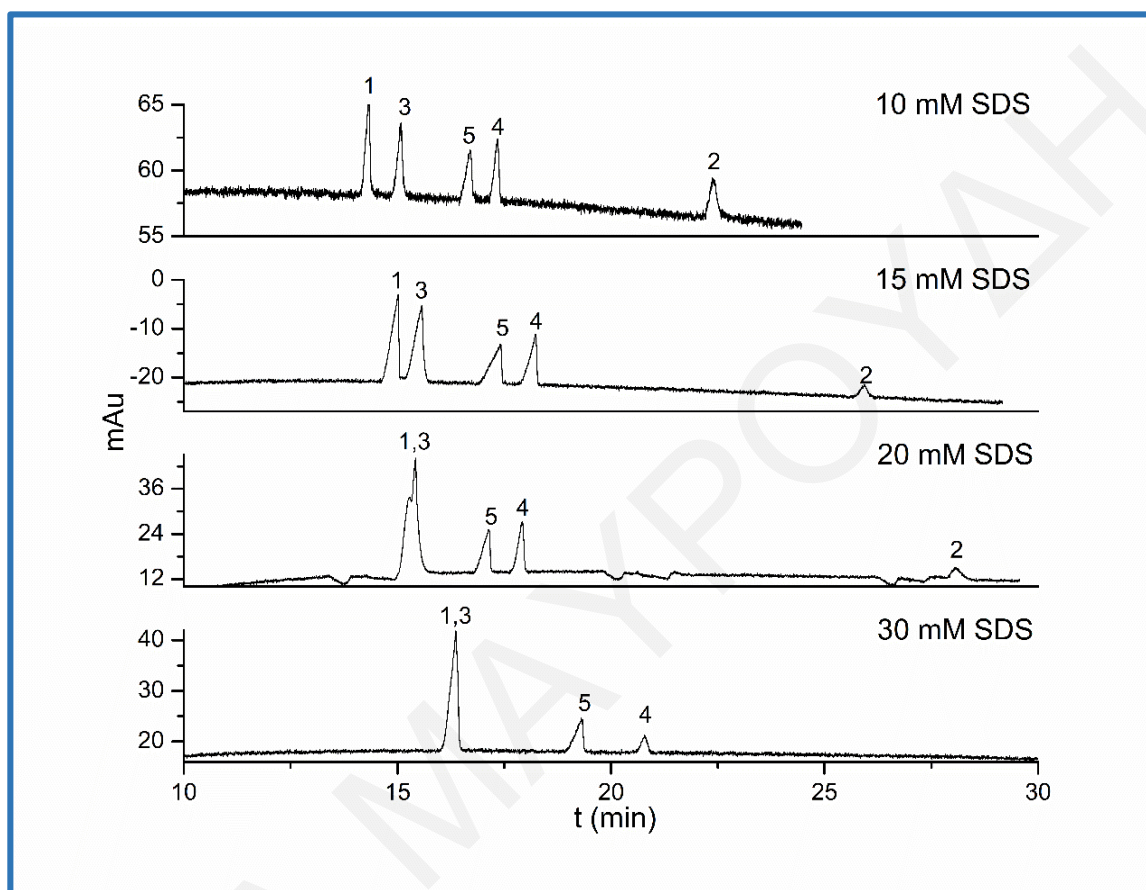
4.1.2 Μελέτες με το SDS

Το SDS είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο μη χειρόμορφο επιφανειοδραστικό που χρησιμοποιείται στη MEKC. Ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική συμμετοχή των αναλυτών ανάμεσα στην ψευδοστατική φάση, η οποία σχηματίζεται λόγω των μικκυλίων, και στην υπόλοιπη υδατική φάση. Πολύ σημαντικό ρόλο στο διαχωρισμό των αναλυτών παίζουν οι ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, καθώς και οι δεσμοί υδρογόνου με την υδρόφιλη κεφαλή του επιφανειοδραστικού.

4.1.2.1 Επίδραση της Συγκέντρωσης του SDS

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του SDS στη διαχωριστική ικανότητα και στο χρόνο συγκράτησης. Συγκεκριμένα, έγινε χρήση του SDS σε συγκεντρώσεις 10, 15, 20 και 30 mM. Στο **Σχήμα 4.1** φαίνονται οι διαχωρισμοί που λήφθηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του SDS. Παρατηρήθηκε ότι, με αύξηση της συγκέντρωσης, από 10 mM έως 15 mM, ο χρόνος συγκράτησης των αναλυτών αυξήθηκε. Με περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης στα 20 mM, η διαχωριστική ικανότητα των κορυφών της INDO (κορυφή 1) και της KET (κορυφή 3), μειώθηκε δραματικά, ενώ οι χρόνοι έκλουσης όλων των κορυφών αυξήθηκαν ελαφρώς. Όταν μέσα στον BGE προστέθηκαν 30 mM SDS, η INDO και η KET συνεκλούονταν και ο χρόνος της ανάλυσης αυξήθηκε περαιτέρω, σε σημείο που δεν ήταν δυνατή η έκλυση της CAR (κορυφή 2) μετά από 30 λεπτά ανάλυσης. Αυτό, πιθανόν να συνέβη, λόγω του ότι ένα πολύ μεγάλο ποσοστό των αναλυτών βρίσκεται στην ανιοντική μορφή σε τιμή pH ίση με 8,0, με αποτέλεσμα να υπάρχει άπωση από τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες του ανιοντικού επιφανειοδραστικού. Ως εκ τούτου, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του SDS, τα NSAIDs δεν είναι εφικτό να διαχωριστούν πλήρως. Επιπλέον, στις μεγάλες συγκεντρώσεις του τασιενεργού, παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση του

διαχωρισμού λόγω του φαινομένου της θερμότητας Joule [205]. Συνεπώς, η συγκέντρωση των 10 mM SDS επιλέγηκε ως η βέλτιστη για περαιτέρω μελέτες στο διαχωρισμό των NSAIDs.



Σχήμα 4.1. Επίδραση της συγκέντρωσης του SDS στο διαχωρισμό πέντε NSAIDs.

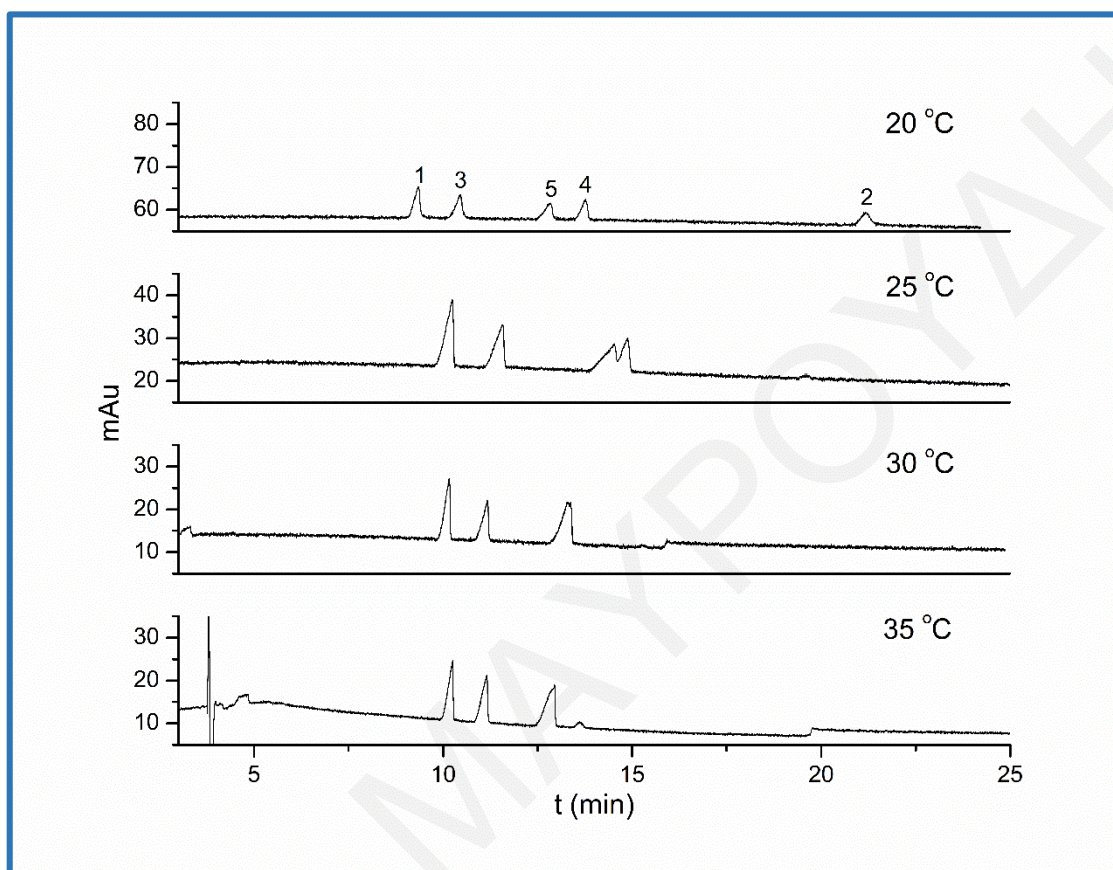
Κορυφές: (1) INDO, (2) CAR, (3) KET, (4) FLU και (5) IBU. Συνθήκες: BGE 100 mM Tris/10 mM τετραβορικό νάτριο pH 8,0, V = 30 kV, T = 20 °C, έγχυση δείγματος: 30 mbar για 3 s, $\lambda = 200$ nm.

4.1.2.2 Επίδραση της Θερμοκρασίας

Μια άλλη παράμετρος που παίζει σημαντικό ρόλο στο διαχωρισμό ουσιών με την τεχνική CE είναι η θερμοκρασία της στήλης. Στην παρούσα περίπτωση, λήφθηκαν ικανοποιητικά αποτελέσματα, μόνο σε θερμοκρασία 20 °C. Σε μικρότερες θερμοκρασίες, το ιξώδες του ρυθμιστικού διαλύματος αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ευκινησίας των συστατικών του συστήματος και επομένως την αύξηση του χρόνου ανάλυσης. Σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες, στους 30 °C ή στους 35 °C, παρατηρήθηκε η συνέκλωση των κορυφών της IBU, της FLU και της CAR (**Σχήμα 4.2**). Αυτό το φαινόμενο,

οφείλεται στο ότι οι αναλύτες δεν είχαν τον απαιτούμενο χρόνο για να αλληλεπιδράσουν με την τασιενεργή ουσία, ώστε να μπορέσουν να διαχωριστούν μεταξύ τους.

4.1.3 Μελέτες με το AAIL



Σχήμα 4.2. Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης στο διαχωρισμό πέντε NSAIDs χρησιμοποιώντας ως μοναδικό πρόσθετο στο BGE 10 mM SDS. Κορυφές: (1) INDO, (2) CAR, (3) KET, (4) FLU και (5) IBU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.1.

4.1.3.1 Επίδραση της Διαμόρφωσης του AAIL

Για σκοπούς σύγκρισης και για τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού, ένα AAIL χρησιμοποιήθηκε ως το μόνο πρόσθετο στον BGE. Μια πολύ σημαντική παράμετρος που λήφθηκε υπόψη είναι το χειρόμορφο κέντρο άνθρακα του κατιόντος του AAIL. Για το σκοπό αυτό, τα AAILs L-, D- και rac-AlaC₄Lac χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις 40 mM, προκειμένου να γίνει σύγκριση της ικανότητάς τους να διαχωρίσουν ταυτόχρονα τα NSAIDs. Αποδείχθηκε ότι και οι τρεις διαμορφώσεις του AAIL ήταν ικανές να διαχωρίσουν τα πέντε NSAIDs. Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4.2**, όλες οι τιμές R_s που υπολογίστηκαν για όλες τις διαδοχικές κορυφές και για τα τρία AAILs ήταν παρόμοιες.

Ωστόσο, εξετάστηκε η σειρά έκλυσης των πέντε αναλυτών για κάθε περίπτωση. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εμβολιασμού του δείγματος (*spiking*). Στη μέθοδο αυτή, το μίγμα των πέντε NSAIDs εμβολιάζεται με συγκεκριμένη ποσότητα ενός αναλύτη. Η κορυφή που παρουσιάζεται με μεγαλύτερη ένταση αντιστοιχεί στον εμβολιασμένο αναλύτη. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι η σειρά έκλυσης των αναλυτών και για τις τρεις περιπτώσεις ήταν η ίδια. Όπως ήταν αναμενόμενο, η διαμόρφωση του χειρόμορφου κέντρου του κατιόντος δεν επηρεάζει τη σειρά έκλυσης των αναλυτών για το μη εναντιομερή διαχωρισμό τους. Επομένως, η επιλογή της διαμόρφωσης του AAIL βασίστηκε μόνο στο οικονομικό κόστος της διαδικασίας σύνθεσής τους. Αφού, το L-AlaC₄Lac έχει το χαμηλότερο κόστος για να συντεθεί, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί για τις μετέπειτα μελέτες.

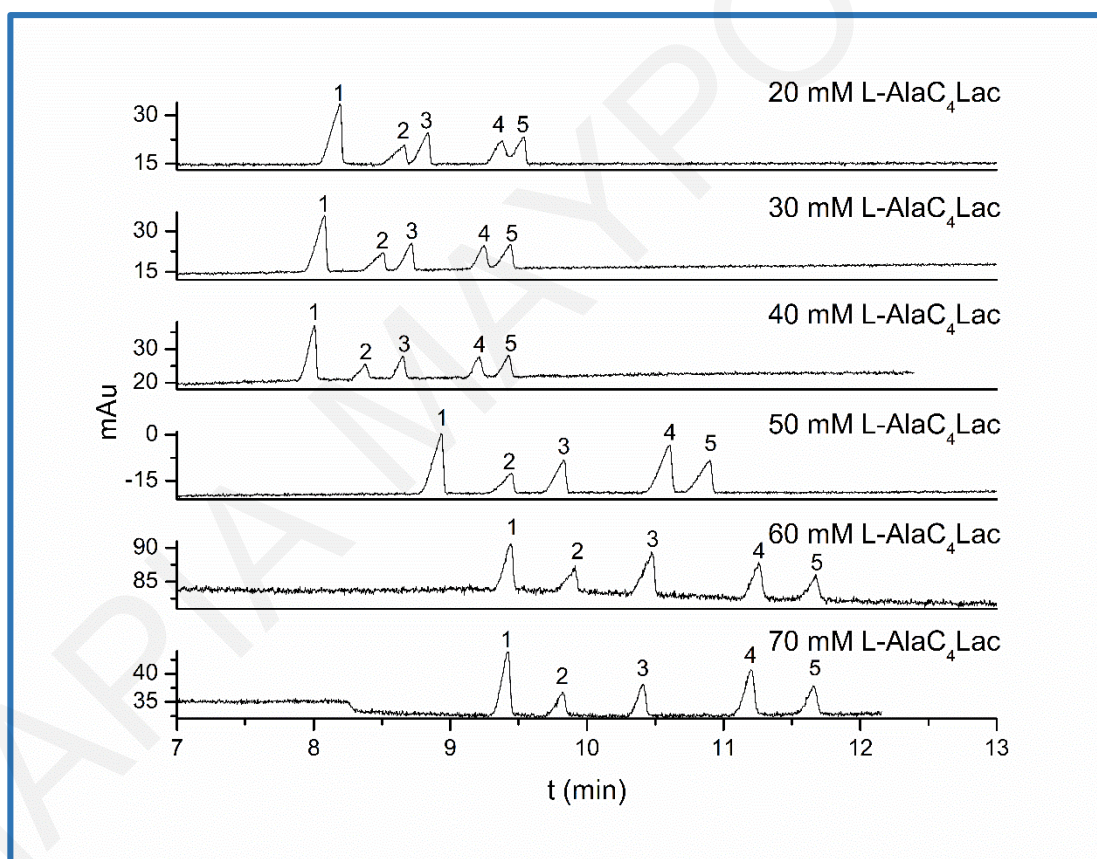
Πίνακας 4.2. Τιμές R_s για τρεις διαμορφώσεις του κατιόντος του AAIL.

Ζεύγος διαδοχικών κορυφών	R _s		
	L-AlaC ₄ Lac	D-AlaC ₄ Lac	rac-AlaC ₄ Lac
INDO-CAR	2,2	2,8	2,3
CAR-KET	2,9	2,8	2,9
KET-FLU	4,1	3,5	3,6
FLU-IBU	2,1	1,7	1,8

4.1.3.2 Επίδραση της Συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac

Μελετήθηκε, στη συνέχεια, η επίδραση της συγκέντρωσης του AAIL στη διαχωριστική ικανότητα και στην αποδοτικότητα. Συγκεκριμένα, έγινε χρήση του L-AlaC₄Lac σε συγκεντρώσεις 20, 30, 40, 50, 60 και 70 mM. Στο **Σχήμα 4.3** φαίνονται οι διαχωρισμοί που λήφθηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του L-AlaC₄Lac. Παρατηρήθηκε ότι με αύξηση της συγκέντρωσης ο διαχωρισμός του μείγματος των NSAIDs βελτιώθηκε. Στο **Σχήμα 4.4**

φαίνονται οι τιμές R_s που υπολογίστηκαν σε κάθε περίπτωση για τις κορυφές 2-3 και 4-5, οι οποίες αφορούσαν τα διαδοχικά ζεύγη των αναλυτών CAR-KET και FLU-IBU, αντίστοιχα. Όταν μέσα στον BGE προστέθηκαν 20 mM L-AlaC₄Lac, ο διαχωρισμός των CAR-KET και των FLU-IBU δεν ήταν ικανοποιητικός, με τις τιμές R_s να είναι περίπου 1,3 και 1,2, αντίστοιχα. Με αύξηση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac στα 30 mM, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της διαχωριστικής ικανότητας για τις κορυφές 2-3 ($R_s = 1,4$) και 4-5 ($R_s = 1,3$). Σε συγκεντρώσεις των 40 mM L-AlaC₄Lac, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη διαχωριστική ικανότητα με τις τιμές R_s , για τις κορυφές 2-3 και 4-5, να φτάνουν στα 2,9 και 1,7, αντίστοιχα. Στις συγκεντρώσεις 50, 60 και 70 mM του AAIL, επιτεύχθηκαν πλήρεις διαχωρισμοί με τιμές R_s μεγαλύτερες του 1,5.

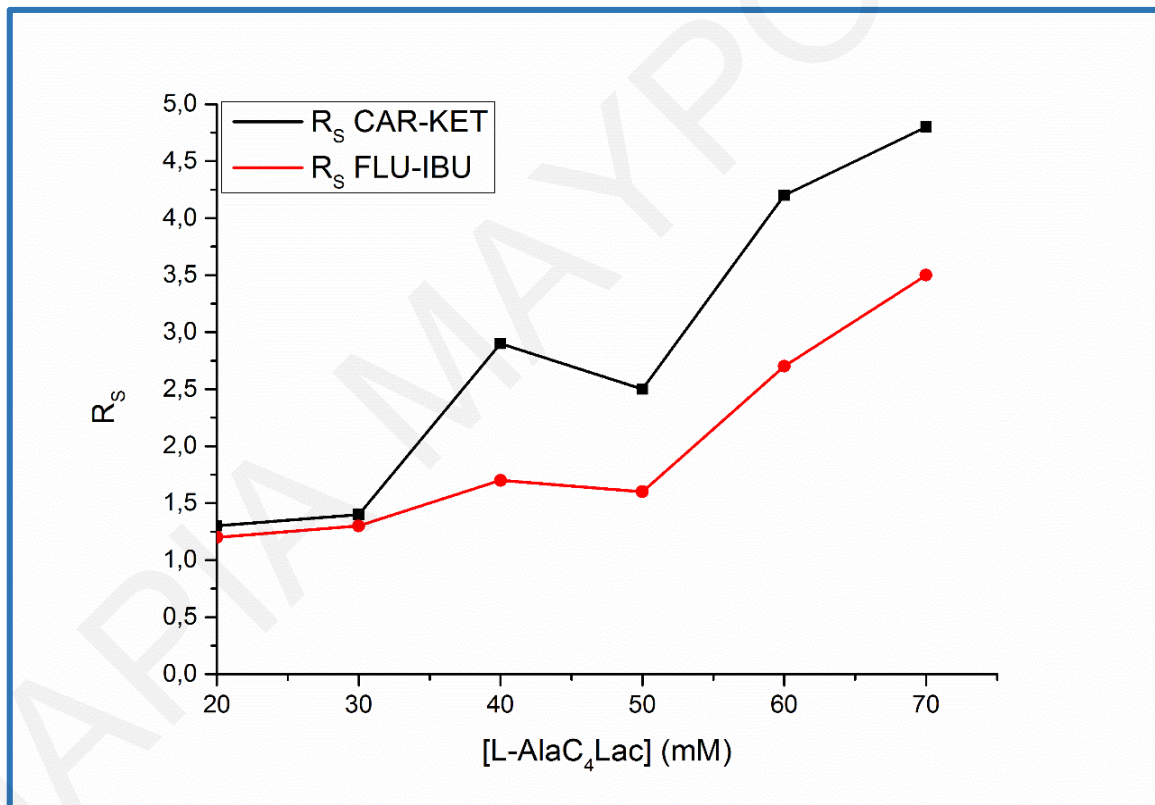


Σχήμα 4.3. Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac στο διαχωρισμό πέντε NSAIDs. Κορυφές: (1) INDO, (2) CAR, (3) KET, (4) FLU και (5) IBU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.1 (T = 35 °C).

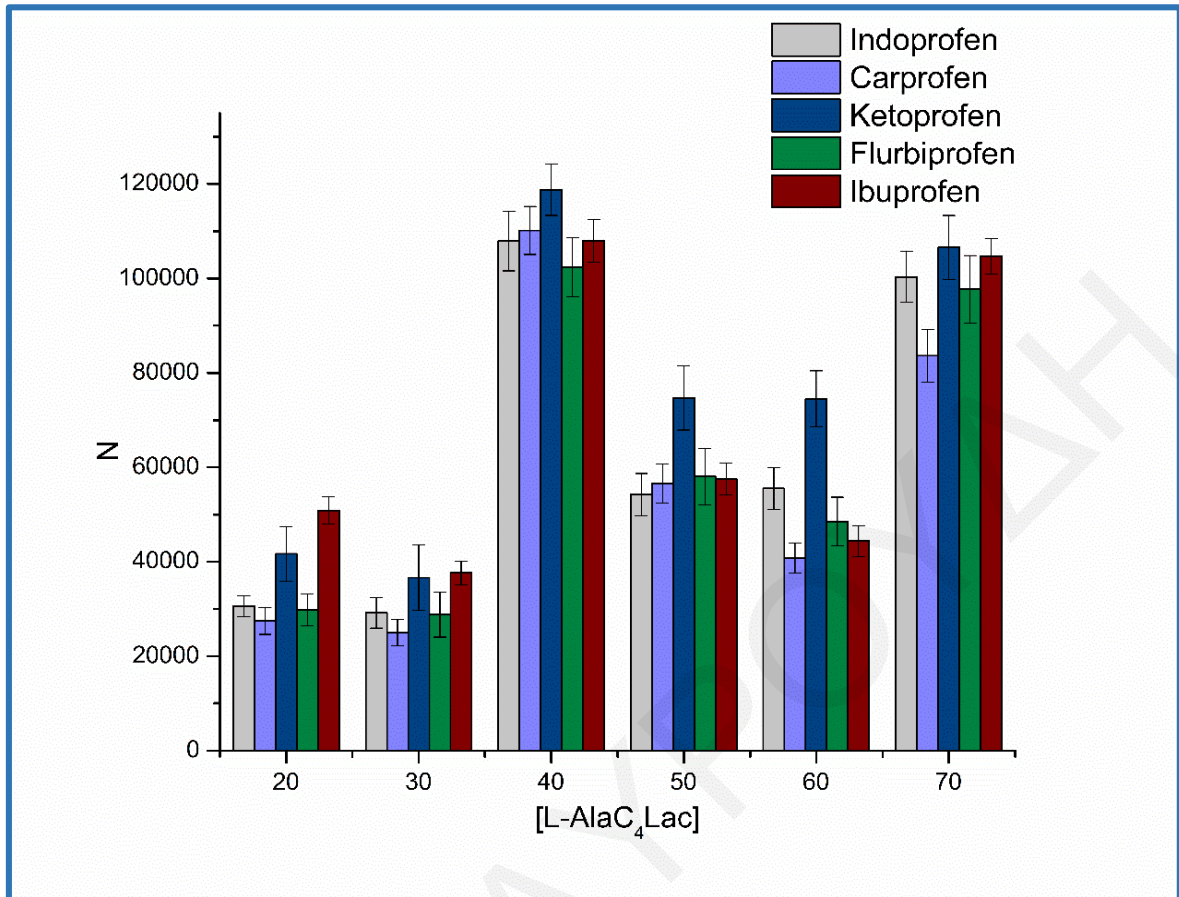
Εκτός από τη σημαντική μεταβολή της διαχωριστικής ικανότητας, παρατηρήθηκαν και σημαντικές αλλαγές στην αποδοτικότητα των κορυφών. Όπως παρουσιάζεται και στο **Σχήμα 4.5**, διαπιστώθηκε ότι, στη συγκέντρωση 40 mM L-AlaC₄Lac, ο αριθμός των

θεωρητικών πλακών (N) για όλες τις κορυφές ήταν πολύ ψηλός σε σύγκριση με αυτές που λήφθηκαν όταν εφαρμόστηκαν οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Ως εκ τούτου, η συγκέντρωση των 40 mM L-AlaC₄Lac επιλέχθηκε ως η βέλτιστη για περαιτέρω μελέτες της εκλεκτικής ικανότητας του AAIL για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό των NSAIDs.

Είναι σημαντικό εδώ να σημειωθεί ότι η σειρά έκλουσης των NSAIDs ήταν διαφορετική από την σειρά έκλουσης που παρατηρήθηκε όταν το SDS προστέθηκε στον BGE. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του SDS και των αναλυτών βασίζονται στην υδροφοβικότητα, ενώ στην περίπτωση του προσθέτου L-AlaC₄Lac, ο διαχωρισμός βασίζεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.



Σχήμα 4.4. Τιμές R_s που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεντρώσεις του L-AlaC₄Lac. Κορυφές: (1) INDO, (2) CAR, (3) KET, (4) FLU και (5) IBU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.3.



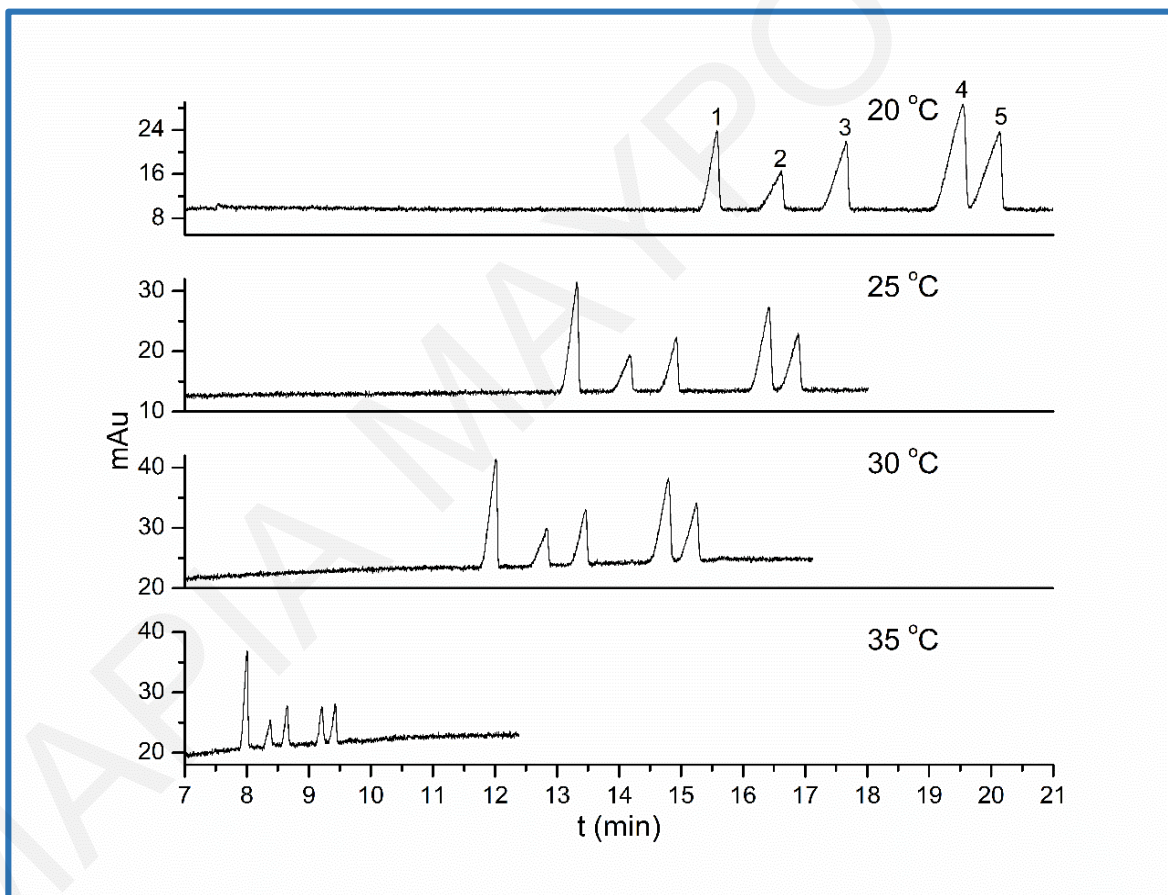
Σχήμα 4.5. Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac στην αποδοτικότητα. Κορυφές: (1) INDO, (2) CAR, (3) KET, (4) FLU και (5) IBU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.3.

4.1.3.3 Επίδραση της Θερμοκρασίας

Μια άλλη σημαντική παράμετρος που λήφθηκε υπόψη, ήταν η επιρροή που είχε η θερμοκρασία της στήλης, τόσο στη διαχωριστική ικανότητα, όσο και στο χρόνο ανάλυσης. Το εύρος των θερμοκρασιών που εξετάστηκε κυμαινόταν από τους 20 °C έως τους 35 °C (**Σχήμα 4.6**). Σε σταθερή εφαρμοζόμενη τάση των 30 kV, με αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρήθηκε ότι οι χρόνοι συγκράτησης των αναλυτών μειώθηκαν αισθητά από τα 21 λεπτά (στους 20 °C) στα 10 λεπτά (στους 35 °C). Το γεγονός αυτό, οφείλεται στη μείωση του ιξώδους του BGE. Παρόλο που ο χρόνος ανάλυσης των NSAIDs μειώθηκε κατά πολύ, εντούτοις, η διαχωριστική ικανότητα ήταν πολύ καλή ($R_s > 1,5$). Συνεπώς, η θερμοκρασία των 35 °C επιλέχθηκε ως η βέλτιστη για τις περαιτέρω μελέτες.

4.1.3.4 Επίδραση της Εφαρμοζόμενης Τάσης

Συνήθως, στους διαχωρισμούς με CE παρατηρείται ότι, με μείωση της εφαρμοζόμενης τάσης αυξάνεται ο χρόνος μετανάστευσης των αναλυτών και ταυτόχρονα αυξάνεται η διαχωριστική ικανότητα. Αυτό οφείλεται στην αύξηση του ιξώδους του BGE, το οποίο οδηγεί στη μείωση της EOF. Με τον τρόπο αυτό, δίνεται περισσότερος χρόνος στους αναλύτες να αλληλεπιδράσουν με τα πρόσθετα του BGE και αυτό, κατά συνέπεια, βελτιώνει το διαχωρισμό. Αυτό βέβαια δεν παρατηρείται πάντοτε, διότι οι αλληλεπιδράσεις του αναλύτη με το πρόσθετο είναι περίπλοκες και εξαρτώνται από μια μεγάλη ποικιλία παραγόντων, εκτός από το χρόνο αλληλεπίδρασης.



Σχήμα 4.6. Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης στο διαχωρισμό πέντε NSAIDs χρησιμοποιώντας ως μοναδικό πρόσθετο στο BGE 40 mM L-AlaC₄Lac. Κορυφές: (1) INDO, (2) CAR, (3) KET, (4) FLU και (5) IBU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.1.

Για τη μελέτη της επίδρασης της εφαρμοζόμενης τάσης στον ταυτόχρονο διαχωρισμό των NSAIDs, εξετάστηκαν τιμές δυναμικού από 10 kV έως 30 kV. Όπως ήταν αναμενόμενο, η μείωση της εφαρμοζόμενης τάσης αύξησε το χρόνο έκλουσης όλων των αναλυτών. Ωστόσο, η διαχωριστική ικανότητα δεν παρουσίασε καμία βελτίωση. Στα 30 kV, ο χρόνος μετανάστευσης του πιο ισχυρά συγκρατούμενου αναλύτη ήταν μόλις 9,6 λεπτά, ενώ στα 10 kV ο χρόνος ανάλυσης έφτανε τα 54,5 λεπτά. Περαιτέρω μείωση της εφαρμοζόμενης τάσης οδήγησε σε απότομη αύξηση του θορύβου στο υπόβαθρο με αποτέλεσμα οι κορυφές να μη διακρίνονται. Επιπρόσθετα, στα 30 kV η αποδοτικότητα των κορυφών ήταν πολύ υψηλή, ενώ σε χαμηλότερα δυναμικά οι κορυφές ήταν αρκετά διευρυμένες, με αποτέλεσμα η αποδοτικότητά τους να μην είναι ικανοποιητική. Για τους λόγους αυτούς, η εφαρμοζόμενη τάση των 30 kV επιλέχθηκε ως η βέλτιστη.

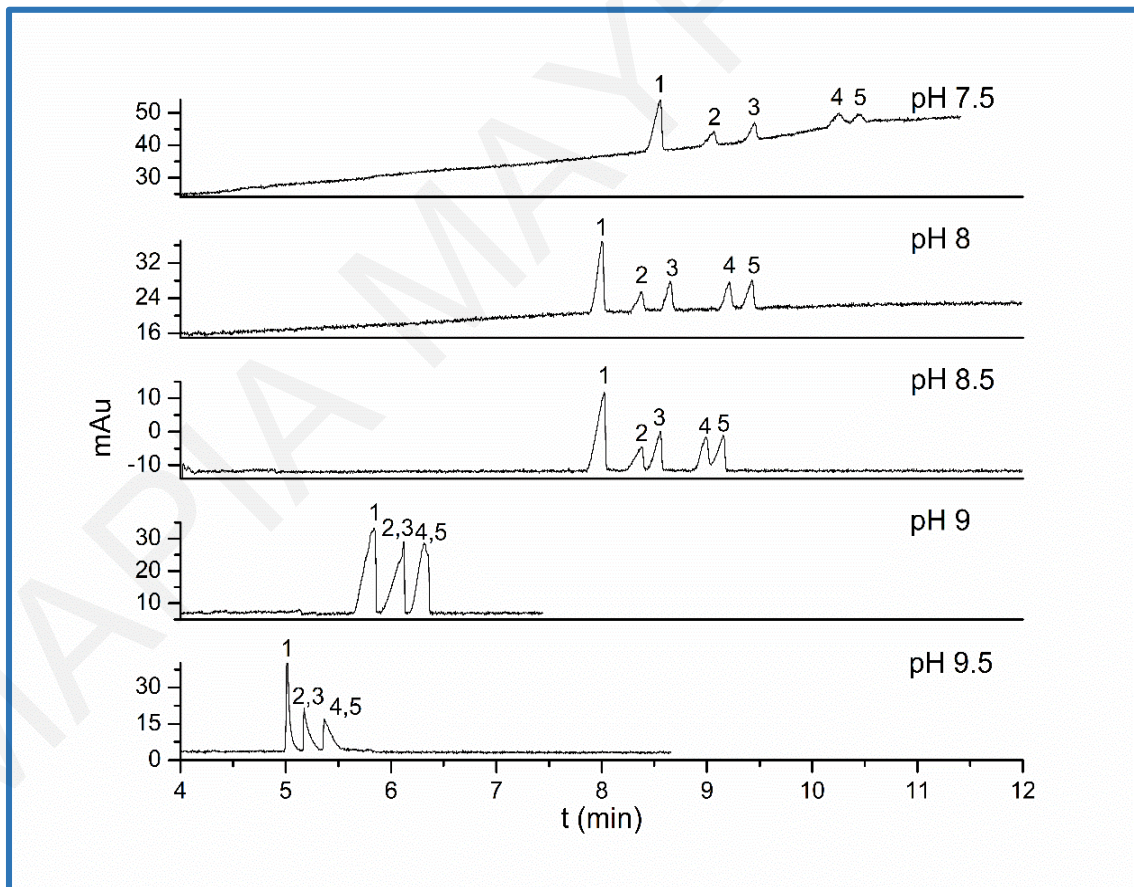
4.1.3.5 Επίδραση του pH

Το pH του BGE είναι μια πολύ σημαντική παράμετρος, η οποία επηρεάζει το διαχωρισμό και τους χρόνους μετανάστευσης στην CE. Αλλαγές στο pH επηρεάζουν την EOF, καθώς και το φορτίο των αναλυτών. Αναλύτες που περιέχουν ομάδες, οι οποίες μπορούν να ιονιστούν, επηρεάζονται δραματικά από το pH του BGE. Για παράδειγμα, οι βασικοί αναλύτες (π.χ. αμίνες), όταν βρίσκονται σε διάλυμα με τιμή του pH μικρότερη από τη σταθερά διάστασής τους (pK_a), είναι θετικά φορτισμένοι, και επομένως εκκλούνται πρώτοι σε ένα ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό. Στην περίπτωση όπου το pH έχει μεγαλύτερη τιμή από την τιμή pK_a , οι αναλύτες είναι ουδέτεροι και έτσι συνεκλούνται με το διαλύτη (δηλαδή την EOF). Όταν οι υπό μελέτη αναλύτες είναι αρνητικά φορτισμένοι ($pH > pK_a$), εκκλούνται τελευταίοι και συγκεκριμένα μετά την EOF. Συνεπώς, το pH πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη στη διαδικασία βελτιστοποίησης ενός διαχωρισμού.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, όμως, το pH είναι πολύ σημαντικό και για ακόμη ένα λόγο. Το AAIL περιέχει μια ομάδα η οποία είναι εξαρτώμενη από το pH. Συγκεκριμένα, το κατιόν του AAIL περιέχει μια πρωτοταγή αμινομάδα, η οποία μπορεί να είναι ουδέτερη ή θετικά φορτισμένη σε διάφορες τιμές pH. Η pK_a της αμινομάδας της αλανίνης είναι ίση με 9,8, ενώ του εστέρα της υπολογίζεται να είναι κοντά στο 9 [206]. Όπως φαίνεται από το **Σχήμα 4.7**, με μείωση του pH σε 7,5, η γραμμή βάσης ήταν πολύ ασταθής, πιθανότατα λόγω του ότι το ρεύμα βρισκόταν σε οριακό σημείο (κοντά στα 200 μA). Με αύξηση του pH, από το 8,0 στο 8,5, η διαχωριστική ικανότητα μειώθηκε αισθητά από 2,9 σε 1,5 για το ζεύγος των κορυφών

2-3 και από 1,7 σε 1,3 για τις κορυφές 4-5. Επιπρόσθετα, στα pHs 9,0 και 9,5, οι κορυφές των CAR-KET και των FLU-IBU συνεκλούνταν, ενώ οι χρόνοι συγκράτησης μειώθηκαν δραματικά.

Η παραπάνω σταδιακή μείωση της διαχωριστικής ικανότητας ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι η αύξηση του pH μειώνει το ποσοστό των θετικά φορτισμένων αμινομάδων του κατιόντος του AAIL, και ως εκ τούτου, μειώνονται οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ του AAIL και των αρνητικά φορτισμένων αναλυτών. Πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι από τις σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε τέτοια συστήματα διαχωρισμών και είναι οι ισχυρότερες [69, 165]. Συνεπώς, η μείωση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του διαχωρισμού.



Σχήμα 4.7. Επίδραση του pH του BGE στο διαχωρισμό πέντε NSAIDs χρησιμοποιώντας ως μοναδικό πρόσθετο στο BGE 40 mM L-AlaC₄Lac. Κορυφές: (1) INDO, (2) CAR, (3) KET, (4) FLU και (5) IBU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.3.

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σε υψηλές τιμές pH (pH = 9,0 και 9,5), οι εστέρες αμινοξέων πιθανόν να υδρολύονται [207, 208]. Οι μελέτες αυτές ασχολήθηκαν με την υδρόλυση κυρίως των μεθυλο- και αιθυλο- εστέρων της αλανίνης, και έδειξαν ότι είναι δυνατή μια υδρόλυση κάτω από βασικές συνθήκες. Έτσι, με αύξηση του pH, το κατιόν του AAIL πιθανόν να υδρολύεται σε κάποιο βαθμό και να οδηγεί στην απουσία ενός ποσοστού τριτ-βουτυλο-ομάδων, οι οποίες πιθανότατα να παίζουν σημαντικό ρόλο στο διαχωρισμό. Επομένως, η τιμή 8,0 για το pH θεωρήθηκε η βέλτιστη για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό των NSAIDs.

4.1.4 Αξιολόγηση των Μεθόδων MEKC και EKC

Κάθε καινούρια μέθοδος που αναπτύσσεται πρέπει να αξιολογείται, με στόχο την επιβεβαίωση ότι μπορεί να εφαρμοστεί. Μια σημαντική παράμετρος αξιολόγησης είναι η επαναληψιμότητα. Συγκεκριμένα, η επαναληψιμότητα περιγράφει τη συμφωνία μεταξύ των δεδομένων για μια σειρά επαναλαμβανόμενων μετρήσεων ή για μετρήσεις που έχουν ληφθεί υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, διερευνήθηκε η επαναληψιμότητα των χρόνων μετανάστευσης της EOF και όλων των εκλούμενων κορυφών για πειράματα που πραγματοποιήθηκαν συνεχόμενα την ίδια μέρα. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στις βέλτιστες συνθήκες της κάθε μεθόδου που αναπτύχθηκε ξεχωριστά. Δηλαδή, στην περίπτωση της τεχνικής MEKC χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συνθήκες:

- ✓ BGE: 100 mM TRIS/10 mM βορικά
- ✓ Πρόσθετο: 10 mM SDS
- ✓ pH = 8
- ✓ V = 30 kV
- ✓ T = 20 °C
- ✓ Έγχυση δείγματος: 30 mbar για 3 s

Στην περίπτωση της τεχνικής EKC οι συνθήκες ήταν οι ακόλουθες:

- ✓ BGE: 100 mM TRIS/10 mM βορικά
- ✓ Πρόσθετο: 40 mM L-AlaC₄Lac
- ✓ pH = 8
- ✓ V = 30 kV
- ✓ T = 35 °C
- ✓ Έγχυση δείγματος: 30 mbar για 3 s

Και στις δύο περιπτώσεις, η επαναληψιμότητα αξιολογήθηκε υπολογίζοντας τις τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD) των χρόνων της EOF (t_{EOF}) και όλων των κορυφών των προς ανάλυση ουσιών (t).

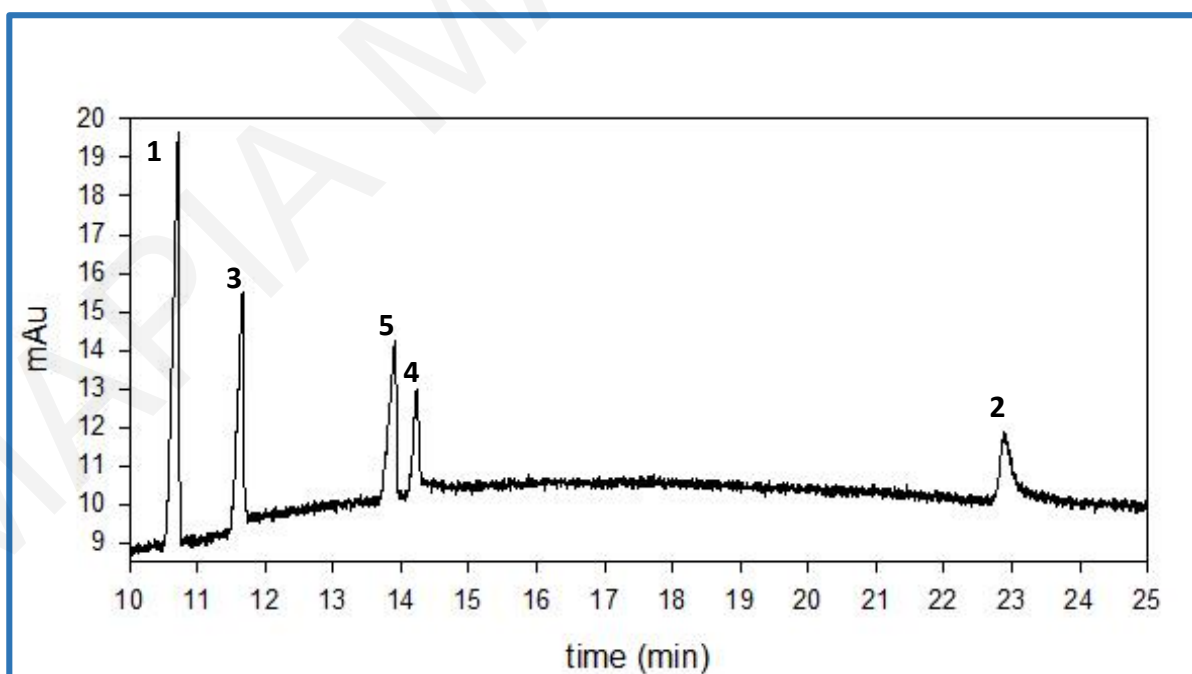
Για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας πραγματοποιήθηκαν δέκα διαδοχικές μετρήσεις. Στην πρώτη περίπτωση, οι τιμές RSD για την EOF ήταν 2,1% και για τους χρόνους συγκράτησης των αναλυτών, κυμαίνονταν από το 2,8% έως το 11,7% (**Πίνακας 4.3**). Στη δεύτερη περίπτωση, οι τιμές RSD ήταν εξαιρετικά χαμηλές, σε σύγκριση με αυτές που υπολογίστηκαν όταν το μόνο πρόσθετο στον BGE ήταν το SDS. Η τιμή RSD για την EOF ήταν 0,4% ενώ οι τιμές RSDs για τα NSAIDs κυμαίνονταν από 1,2 μέχρι 1,3% (**Πίνακας 4.3**). Οι τιμές RSD που προέκυψαν, όταν χρησιμοποιήθηκε το L-AlaC₄Lac ως το μόνο πρόσθετο στον BGE, αποδεικνύουν εξαιρετική επαναληψιμότητα.

Πίνακας 4.3. Επαναληψιμότητα χρόνων μετανάστευσης και αποδοτικότητα χρησιμοποιώντας ως μόνο πρόσθετο το SDS ή το L-AlaC₄Lac για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό των NSAIDs. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.1 και 4.3.

Κορυφή	Αναλύτης	10 mM SDS		40 mM L-AlaC ₄ Lac			
		t (min)	RSD	N ($\times 10^4$)	t (min)	RSD	N ($\times 10^4$)
EOF	-	5,5	2,1	—	3,7	0,4	—
1	INDO	14,3	3,0	6,5	8,0	1,2	10,8
2	CAR	22,4	11,7	5,2	8,5	1,2	11,0
3	KET	15,1	2,8	6,1	8,8	1,3	11,9
4	FLU	17,3	4,1	7,6	9,4	1,2	10,2
5	IBU	16,7	3,6	4,7	9,6	1,3	10,8

4.1.5 Αξιολόγηση της Συνεργιστικής Δράσης των Δύο Πρόσθετων

Αφού διερευνήθηκε η ικανότητα ταυτόχρονου διαχωρισμού των NSAIDs με τη χρήση, είτε του ανιοντικού επιφανειοδραστικού SDS είτε του IL, L-AlaC₄Lac, μελετήθηκε, στη συνέχεια, η δυνατότητα χρήσης συνδυασμού των δύο αυτών πρόσθετων για αποτελεσματικότερους διαχωρισμούς. Κρατώντας σταθερή τη συγκέντρωση 10 mM του SDS, προστέθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις του L-AlaC₄Lac στον BGE (1-40 mM). Καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση του AAIL, ο διαχωρισμός των NSAIDs ήταν αποτελεσματικότερος ως προς την αποδοτικότητα και τη διαχωριστική ικανότητα, πιθανότατα λόγω της αύξησης του συνεργιστικού φαινομένου του δυαδικού συστήματος SDS / L-AlaC₄Lac. Ωστόσο, η σειρά έκλουσης και ο χρόνος ανάλυσης ήταν παρόμοια με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν όταν το SDS χρησιμοποιήθηκε ως το μοναδικό πρόσθετο (Σχήμα 4.8). Αυτό αποδεικνύει ότι, στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ήταν ικανές να ξεπεράσουν τις ηλεκτροστατικές. Αξίζει εδώ να αναφερθεί ότι, όταν κρατήθηκε σταθερή η συγκέντρωση 40 mM του L-AlaC₄Lac και προστέθηκε σε αυτό συγκέντρωση 10 mM SDS, παρατηρήθηκε πολύ υψηλό ρεύμα και έτσι ο διαχωρισμός των NSAIDs ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί.



Σχήμα 4.8. Επίδραση του συνεργιστικού φαινομένου 10 mM SDS / 40 mM L-AlaC₄Lac στο διαχωρισμό πέντε NSAIDs. Κορυφές: (1) INDO, (2) CAR, (3) KET, (4) FLU και (5) IBU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.1.

4.1.6 Συμπεράσματα

Σε μια προσπάθεια σύγκρισης της χρωματογραφικής απόδοσης των τεχνικών MEKC (πρόσθετο στον BGE το SDS) και EKC (πρόσθετο στον BGE το L-AlaC₄Lac) για το διαχωρισμό όξινων αναλυτών, χρησιμοποιήθηκαν τα NSAIDs ως αναλύτες υπό διερεύνηση. Ο διαχωρισμός των INDO, CAR, KET, IBU και FLU αξιολογήθηκε συγκρίνοντας το χρόνο ανάλυσης, τις τιμές RSD των χρόνων συγκράτησης και την αποδοτικότητα διαχωρισμού όλων των αναλυτών, χρησιμοποιώντας ως BGE το 100 mM Tris/10 mM Borate (pH 8,0). Όπως καταδεικνύεται και από τον **Πίνακα 4.3**, όταν το L-AlaC₄Lac χρησιμοποιήθηκε ως πρόσθετο, ο χρόνος ανάλυσης ήταν 10 λεπτά. Από την άλλη πλευρά, όταν το SDS προστέθηκε στον BGE, οι αναλύτες εκλούστηκαν στα 23 λεπτά. Επιπλέον, οι τιμές RSD για το L-AlaC₄Lac ήταν πολύ χαμηλές (1,3%) σε σύγκριση με τις τιμές RSD για το SDS (11,7%). Μια άλλη σημαντική παράμετρος, η οποία αξιολογήθηκε ήταν η αποδοτικότητα των κορυφών για όλους τους αναλύτες, η οποία για το L-AlaC₄Lac έπαιρνε τιμές πάνω από $10,2 \times 10^4$, ενώ για το SDS, η απόδοση υπολογίστηκε μεταξύ $4,7 \times 10^4$ και $7,6 \times 10^4$ θεωρητικών πλακών. Ως εκ τούτου, είναι σαφές ότι, ολοκληρώνοντας τη μελέτη αυτή, προκύπτει ότι η προσθήκη του L-AlaC₄Lac στον BGE συνιστάται για τον επαναλήψιμο, πλήρη, αποδοτικό και γρήγορο διαχωρισμό των NSAIDs.

Συμπερασματικά, τα νέα AAILs, με βάση τους εστέρες των αμινοξέων, τα οποία μπορούν εύκολα να συντεθούν από εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια, έδειξαν ότι μπορούν να λειτουργήσουν ως πρόσθετα στον BGE για τον ταυτόχρονο μη εναντιομερή διαχωρισμό των NSAIDs. Αυτή είναι η πρώτη φορά που μελετήθηκαν τα AAILs ως τα μοναδικά πρόσθετα στην CE για μη εναντιομερείς διαχωρισμούς.

Το είδος του BGE, το pH, καθώς και η συγκέντρωση του AAIL ήταν καθοριστικοί παράγοντες για το διαχωρισμό των NSAIDs. Συνεπώς, στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι αλληλεπιδράσεις που μπορούν να αναπτυχθούν για την επίτευξη του διαχωρισμού, πιθανόν να περιλαμβάνουν στερεοχημικές παρεμποδίσεις (λόγω της τριτ-βουτυλο-ομάδας), ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (μεταξύ κατιόντος του CIL και αρνητικά φορτισμένων αναλυτών) και δεσμούς υδρογόνου (λόγω της τάσης για δεσμούς υδρογόνου της καρβοξυλικής ομάδας των 2-αρυλπροπιονικών οξέων). Ένας περιορισμός που προκύπτει από αυτή τη μελέτη είναι η χρήση αυτών των CILs για διαχωρισμό αρνητικά φορτισμένων αναλυτών σε pH < 8,5.

4.2 Μελέτη της Συνεργιστικής Δράσης του L-AlaC₄Lac με την TM-β-CD για τον Εναντιομερή Διαχωρισμό Επτά NSAIDs

Το τελευταίο διάστημα, σε αρκετές μελέτες, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, χρησιμοποιήθηκαν AAILs σε συνδυασμό με CSs, για την επίτευξη χειρόμορφων διαχωρισμών. Το 2013, οι Hadjistasi *et al.* μελέτησαν το χειρόμορφο διαχωρισμό του πιπεκολικού οξέος με χρήση του L-AlaC₄Lac και της β-CD [75]. Η προσθήκη του πρώτου στον BGE αύξησε τη τιμή R_S από 1,4 σε 1,9. Πιο πρόσφατα, οι Zhang *et al.* χρησιμοποίησαν τα AAILs L-alanine και L-valine *tert* butyl ester bis(trifluoromethane)sulphonamide (L-AlaC₄NTf₂ και L-ValC₄NTf₂) σε συνδυασμό με το CS βανκομυκίνη για το διαχωρισμό 5 NSAIDs [39]. Η προσθήκη των AAILs, και σε αυτή την περίπτωση, αύξησε τις τιμές R_S σε σύγκριση με αυτές που λήφθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε μόνο η βανκομυκίνη ως CS. Η ίδια ομάδα μελέτησε τη συνεργιστική δράση των δύο αυτών AAILs με παράγωγα β-CDs (methyl-β-CD, HP-β-CD, glucose-β-CD) [36]. Παρατηρήθηκε ότι, τρεις από τους πέντε αναλύτες (ναπροξένιο, πρανοπροφαίνιο, βαρφαρίνη) διαχωρίστηκαν πλήρως με την προσθήκη AAIL μέσα στον BGE. Συνεπώς, η χρήση AAILs με βάση το L-AlaC₄⁺ ως πρόσθετα στον BGE, σε συνδυασμό με κάποιους CSs, φαίνεται ότι συμβάλλει στη βελτίωση, ακόμη και του εναντιομερούς διαχωρισμού, αυξάνοντας την εκλεκτικότητα και τη διαχωριστική ικανότητα. Επομένως, σε αυτή τη διδακτορική διατριβή, λόγω της σημαντικότητας των εναντιομερών διαχωρισμών, προχωρήσαμε στη μελέτη της χρήσης του L-AlaC₄Lac ως πρόσθετου στο BGE, το οποίο περιέχει ένα CS (TM-β-CD), αξιολογώντας, έτσι, τη συνεργιστική τους δράση ως προς τον εναντιομερή διαχωρισμό των NSAIDs.

Ο χειρόμορφος διαχωρισμός θεωρείται σημαντικός για την ανάπτυξη και χρήση φαρμακευτικών προϊόντων. Το γεγονός ότι τα εναντιομερή χειρόμορφων ενώσεων παρουσιάζουν συχνά διαφορετικές φαρμακολογικές και τοξικολογικές ιδιότητες, οδήγησε στη χρήση εναντιομερώς καθαρών προϊόντων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση μιας γρήγορης, εκλεκτικής και ευαίσθητης τεχνικής, όπως είναι η CE.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια ανάπτυξης και αξιολόγησης μιας νέας αναλυτικής μεθόδου για τον εναντιομερή διαχωρισμό επτά 2-αρυλπροπιονικών οξέων. Τα 2-αρυλπροπιονικά οξέα αποτελούν μια σημαντική ομάδα των NSAIDs, αναστέλλοντας τη σύνθεση των προσταγλανδινών και των θρομβοξανών παρέχοντας, έτσι, αναλγητικά και αντιπυρετικά αποτελέσματα, και, σε υψηλότερες δόσεις, αντι-φλεγμονώδεις επιδράσεις.

Έχει βρεθεί ότι, κυρίως το S-εναντιομερές είναι βιολογικά δραστικότερο από το ρακεμικό τους μείγμα. Κατά συνέπεια, ο χειρόμορφος διαχωρισμός των εν λόγω ενώσεων είναι πολύ σημαντικός στη φαρμακευτική βιομηχανία. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε ο εναντιομερής διαχωρισμός επτά NSAIDs με τη χρήση CD ως CS και «πράσινου» CIL ως πρόσθετου μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα για την επίτευξη πλήρους διαχωρισμού και υψηλής αποδοτικότητας. Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκε η δυνατότητα ύπαρξης συνεργιστικής δράσης του παραπάνω δυαδικού συστήματος χρησιμοποιώντας επτά NSAIDs (IBU, KET, CAR, INDO, FLU, NAP και FEN) ως μοντέλα αναλυτών. Έγινε εκτίμηση της συνεργιστικής δράσης μεταξύ των δύο πρόσθετων στον BGE, μεταβάλλοντας διάφορες σημαντικές ηλεκτροφορητικές παραμέτρους, όπως το pH του BGE και τη συγκέντρωση της TM-β-CD και του L-AlaC₄Lac. Είναι αξιοσημείωτο γεγονός το ότι δεν υπήρξε προηγούμενη προσπάθεια διερεύνησης της εναντιοεκλεκτικότητας του συνεργιστικού συστήματος του L-AlaC₄Lac με τον CS TM-β-CD.

Επιλογή BGE

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα NSAIDs είναι όξινες ενώσεις, οι οποίες περιέχουν μια καρβοξυλομάδα με τιμές pK_a να κυμαίνονται από 3-5. Άρα, σε τιμές pH πάνω από τις τιμές αυτές, οι ουσίες είναι αρνητικά φορτισμένες. Σε προηγούμενη μελέτη για τον εναντιομερή διαχωρισμό αναλυτών της ίδιας οικογένειας στην CE, επιλέχθηκε ως BGE 5 mM Acetate σε pH = 5 [168], έτσι ώστε οι αναλύτες να κινούνται στην περιοχή των ανιόντων. Για τους πιο πάνω λόγους, ως BGE επιλέχθηκε το οξικό νάτριο σε pH 5.

4.2.1 Αξιολόγηση της Συνεργιστικής Δράσης

Οι χειρόμορφοι διαχωρισμοί πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας είτε TM-β-CD ως το μόνο CS ή με την εφαρμογή του L-AlaC₄Lac ως πρόσθετο στον BGE. Στους **Πίνακες 4.4** και **4.5** φαίνεται ότι η συνεργιστική δράση μεταξύ του L-AlaC₄Lac και του TM-β-CD είναι αποτελεσματική, αφού σχεδόν για όλους τους αναλύτες (εκτός για την IBU και τη FLU) επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός και παρατηρήθηκε μια σημαντική βελτίωση στην αποδοτικότητα των κορυφών. Όπως καταδεικνύεται στον **Πίνακα 4.4**, οι ψηλότερες τιμές R_s που λήφθηκαν για την IBU και την FLU ήταν 1,3 και 1,1, αντίστοιχα. Οι παραπάνω παρατηρήσεις καταδεικνύονται σαφέστερα στα ηλεκτροφερογράμματα που παρουσιάζονται στα **Σχήματα 4.9-4.15**. Συγκεκριμένα, φαίνεται ο διαχωρισμός του κάθε

αναλύτη ξεχωριστά, όταν η TM-β-CD χρησιμοποιήθηκε ως ο μόνος CS και όταν στον BGE προστέθηκε και το L-AlaC₄Lac. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι όταν χρησιμοποιήθηκε το L-AlaC₄Lac, ως το μόνο πρόσθετο στον BGE, δεν παρατηρήθηκε κανένας εναντιομερής διαχωρισμός για τους υπό μελέτη αναλύτες. Ως εκ τούτου, το δυαδικό σύστημα, το οποίο αποτελείται από την TM-β-CD και το L-AlaC₄Lac χρειάζεται περαιτέρω μελέτη, ώστε να βελτιστοποιηθούν οι χειρόμορφοι διαχωρισμοί των NSAIDs.

4.2.2 Επίδραση της Συγκέντρωσης της TM-β-CD

Η συγκέντρωση του CS θεωρείται μια σημαντική παράμετρος επειδή επηρεάζει σημαντικά τον εναντιομερή διαχωρισμό των αναλυτών. Η περιοχή συγκέντρωσης που εξετάστηκε ήταν από 5 mM έως 35 mM της TM-β-CD. Στους **Πίνακες 4.4** και **4.5** παρουσιάζονται υπολογισμένες οι τιμές για την ηλεκτροωσμωτική ευκινησία (μEOF), τη διαχωριστική ικανότητα (R_s) και την αποδοτικότητα (N), για κάθε συγκέντρωση της CD. Συγκεκριμένα, όταν στον BGE, ως μοναδικό χειρόμορφο πρόσθετο ήταν η TM-β-CD, οι τιμές της R_s για την IBU, τη FLU και την KET αυξήθηκαν ελαφρώς με την αύξηση της συγκέντρωσης του CS. Συγκεκριμένα, οι τιμές R_s αυξήθηκαν από 0 και για τους τρεις αναλύτες σε 0,8, <0,4 και 0,7, αντίστοιχα. Αντίθετα, στην περίπτωση των CAR και FEN, παρατηρήθηκε μια πιο σταδιακή αύξηση της R_s , από 0 σε 2,0 και 1,3, αντίστοιχα. Η αύξηση αυτή πιθανώς να οφείλεται στην αύξηση της συμπλοκοποίησης μεταξύ της TM-β-CD και των εναντιομερών. Για τους αναλύτες INDO και NAP, παρόλο που αρχικά παρατηρήθηκε αύξηση της R_s (από 1,4 και 3,8 σε 2,1 και 4,0, αντίστοιχα για 5 mM, έως 10 mM TM-β-CD), περαιτέρω αύξηση στη συγκέντρωση του TM-β-CD οδήγησε σε σημαντική μείωση της R_s . Στην περίπτωση αυτή, όταν η συγκέντρωση της TM-β-CD έφτασε σε τιμές μεγαλύτερες από 10 mM, οι συγκεκριμένοι αναλύτες πιθανόν να ήταν πλήρως συμπλοκοποιημένοι, και έτσι, η περαιτέρω αύξηση στη συγκέντρωση είχε αρνητικές επιπτώσεις στη R_s . Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι, ο αριθμός των θεωρητικών πλακών (N) και για τα δύο εναντιομερή ήταν πολύ χαμηλός (μόνο μερικές δεκάδες χιλιάδες). Ως εκ τούτου, σε μια προσπάθεια να βελτιωθεί η αποδοτικότητα και η διαχωριστική ικανότητα, προτάθηκε η αξιολόγηση ενός δυαδικού συστήματος για το διαχωρισμό των NSAIDs.

4.2.3 Επίδραση της Συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac

Λόγω του χαμηλού αριθμού των θεωρητικών πλακών και του μη πλήρους εναντιομερούς διαχωρισμού των NSAIDs, κρίθηκε αναγκαία η προσθήκη ενός δευτέρου χειρόμορφου μορίου μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα. Μελετήθηκε η προσθήκη του L-AlaC₄Lac, το οποίο, λόγω του χειρόμορφου κέντρου στο κατιόν του (L-AlaC₄⁺), θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με τους αρνητικά φορτισμένους αναλύτες. Κατά τη μελέτη της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac εξετάστηκαν συγκεντρώσεις των 5, 10, 15 και 20 mM L-AlaC₄Lac σε συνδυασμό με 5, 10, 15, 20, 25, 30 και 35 mM TM-β-CD, με σκοπό να εξεταστεί η επίδραση της συγκέντρωσης του χειρόμορφου AAII στον εναντιομερή διαχωρισμό (R_s , N , μ_{eof}). Όπως αποδείχθηκε και φανερώνεται στους **Πίνακες 4.4** και **4.5**, μια αύξηση στη συγκέντρωση του L-AlaC₄Lac από 0 σε 5 mM, οδήγησε σε μικρή αύξηση της ηλεκτροοσμωτικής ευκινησίας, σχεδόν για όλους τους αναλύτες σε όλες τις συγκεντρώσεις της TM-β-CD. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυτών και του χειρόμορφου κατιόντος του IL (L-AlaC₄⁺) [167]. Η παρουσία κατιόντων στο ρυθμιστικό διάλυμα μειώνει την αλληλεπίδραση μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων αναλυτών και της TM-β-CD, και αυτό, με τη σειρά του, μειώνει τους χρόνους ανάλυσης. Με αύξηση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac από 5 mM έως 20 mM, μειώθηκε η ηλεκτροοσμωτική ευκινησία, πιθανώς λόγω της προσρόφησης χειρόμορφων κατιόντων IL (L-AlaC₄⁺) στα τοιχώματα του τριχοειδούς σωλήνα [35, 37, 39, 209].

Μια άλλη σημαντική παρατήρηση, σε αυτή τη μελέτη, ήταν η βελτίωση του εναντιομερούς διαχωρισμού με την προσθήκη του L-AlaC₄Lac σε συγκεντρώσεις πάνω από 5 mM, για την πλειονότητα των αναλυτών. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη μειωμένη ηλεκτροοσμωτική ευκινησία, η οποία, με τη σειρά της, επέτρεπε την αύξηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του L-AlaC₄Lac, της TM-β-CD και του αναλύτη. Ως εκ τούτου, εύκολα συμπεραίνεται ότι η συνεργιστική επίδραση ήταν σημαντική για τους περισσότερους από τους αναλύτες που εξετάστηκαν, και κυρίως για τις IBU, FLU, CAR, KET, και FEN. Ωστόσο, σε μερικές περιπτώσεις, παρατηρήθηκε μείωση στο διαχωρισμό, όταν η συγκέντρωση του L-AlaC₄Lac αυξήθηκε από 15 mM σε 20 mM. Αυτό οφείλεται στην αλληλεπίδραση του L-AlaC₄Lac με την TM-β-CD, η οποία οδήγησε στη μείωση του εγκλεισμού των αναλυτών μέσα στην κοιλότητα της TM-β-CD. Ένας άλλος παράγοντας που θα μπορούσε να συμβάλει στη

μείωση της διαχωριστικής ικανότητας είναι η αυξημένη θερμότητα Joule. Το φαινόμενο της θερμότητας Joule, παρόλο που είναι πολύ σημαντικό, είναι ανεπιθύμητο στην ηλεκτροφόρηση, επειδή μειώνει την ποιότητα του διαχωρισμού με διάφορους τρόπους (διεύρυνση κορυφών, μείωση της R_s). Η επίδραση της συγκέντρωσης του AAIL στη διαχωριστική ικανότητα όλων των αναλυτών φαίνεται καθαρά στο **Σχήμα 4.16**.

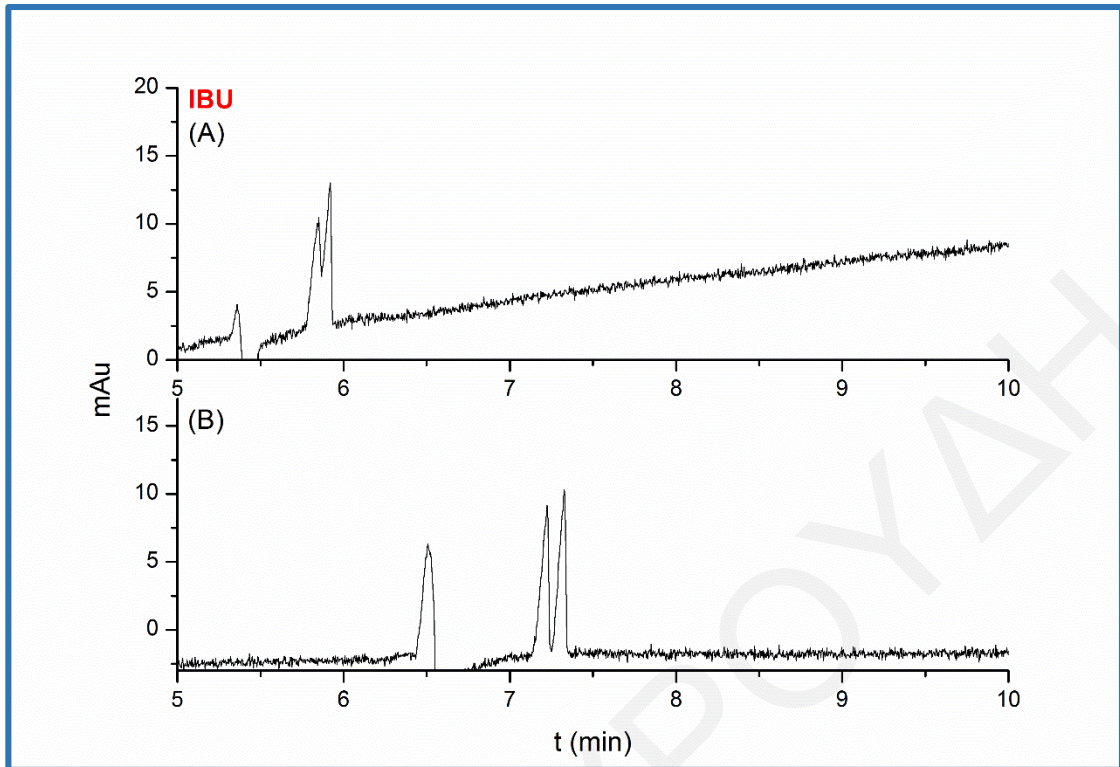
Πίνακας 4.4. Ηλεκτροοσμωτική ευκίνησια (μ_{EOF}) και διαχωριστική ικανότητα (R_s) που λήφθηκαν για τα IBU, FLU, KET, CAR, INDO, NAP και FEN. Συνθήκες: BGE 5 mM Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH 5,0, V = 30 kV, T = 20 °C, έγχυση δείγματος: 30 mbar για 3 s. Το BGE περιέχει διάφορες συγκεντρώσεις του CS (TM- β -CD) και του πρόσθετου (L-AlaC₄Lac).

CS [CD] (mM)	Πρόσθετο [CIL] (mM)	IBU		FLU		KET		CAR		INDO		NAP		FEN	
		μ_{eof}^*	R_s	μ_{eof}^*	R_s	μ_{eof}^*	R_s	μ_{eof}^*	R_s	μ_{eof}^*	R_s	μ_{eof}^*	R_s	μ_{eof}^*	R_s
5	0	3,35	0,0	3,29	0,0	3,29	0,0	3,38	0,0	3,33	1,4	3,31	3,8	3,25	0,0
	5	3,53	0,0	3,44	0,0	3,41	0,0	3,49	<0,4	3,49	1,5	3,49	3,8	3,46	0,0
	10	3,04	0,0	3,15	0,0	3,10	0,0	3,06	<0,4	3,07	1,6	3,05	4,3	3,14	0,0
	15	2,92	0,0	2,89	0,0	2,85	0,0	2,73	0,6	2,67	2,1	2,59	6,8	2,59	<0,4
	20	2,70	0,0	2,67	0,0	2,83	0,0	2,72	0,7	2,70	1,9	2,67	4,9	2,67	<0,4
10	0	3,43	0,0	3,33	0,0	2,65	0,0	2,58	1,0	2,57	2,1	2,54	4,0	2,55	0,4
	5	3,49	<0,4	3,40	0,0	3,50	0,0	3,55	1,1	3,30	2,0	3,52	3,2	3,53	0,5
	10	3,17	<0,4	3,15	0,0	3,15	0,0	3,13	1,2	3,11	2,2	3,07	4,0	3,04	0,6
	15	2,98	<0,4	2,78	0,0	2,91	0,0	2,88	1,4	2,81	2,3	2,79	4,3	2,72	0,8
	20	2,54	<0,4	2,52	0,0	2,60	0,0	2,55	1,8	2,53	2,3	2,49	4,6	2,48	0,9
15	0	3,37	0,0	3,30	0,0	3,25	0,0	3,20	1,5	3,15	1,5	3,07	3,3	3,04	0,7
	5	3,32	<0,4	3,18	0,0	3,26	0,0	3,24	1,7	3,22	1,6	3,20	3,1	3,19	0,9
	10	2,94	0,4	2,92	0,0	2,87	0,0	2,94	1,7	2,94	1,6	2,92	3,8	2,91	0,9
	15	2,80	0,8	2,72	0,0	2,70	<0,4	2,78	2,0	2,76	1,6	2,73	4,0	2,72	1,1
	20	2,45	0,8	2,22	<0,4	2,45	<0,4	2,39	2,2	2,35	1,8	2,31	4,4	2,29	1,3
20	0	3,18	0,4	3,14	0,0	3,07	0,0	3,06	1,6	3,02	1,1	2,97	2,8	2,95	0,9
	5	3,32	0,4	3,29	<0,4	3,36	<0,4	3,35	1,8	3,35	1,2	3,32	3,1	3,30	1,1
	10	2,94	0,7	2,88	<0,4	2,88	0,4	2,85	2,0	2,80	1,4	2,75	3,5	2,74	1,2
	15	2,56	0,9	2,51	<0,4	2,55	0,6	2,54	2,0	2,53	1,6	2,50	3,5	2,49	1,3
	20	2,68	0,9	2,55	<0,4	2,66	0,7	2,64	2,1	2,61	1,6	2,54	3,8	2,52	1,6
25	0	2,99	0,6	2,91	0,0	2,98	0,6	2,96	1,7	2,95	0,9	2,89	2,6	2,88	1,2
	5	3,15	0,6	3,00	0,4	3,07	0,7	3,06	1,9	3,03	1,1	2,99	3,0	2,99	1,2
	10	2,78	0,9	2,68	0,6	2,73	0,8	2,70	2,1	2,69	1,2	2,67	3,1	2,65	1,4
	15	2,43	1,0	2,50	0,7	2,50	1,1	2,51	2,3	2,51	1,1	2,49	3,4	2,49	1,5
	20	2,29	1,1	2,14	0,9	2,20	1,2	2,17	1,6	2,16	1,4	2,12	3,6	2,10	1,8
30	0	2,95	0,8	2,76	<0,4	2,86	0,8	2,84	1,9	2,79	0,9	2,74	2,5	2,72	1,2
	5	2,92	0,8	2,90	0,8	2,89	1,0	2,86	2,0	2,90	1,0	2,89	2,7	2,88	1,5
	10	2,83	1,0	2,78	0,9	2,81	1,1	2,82	2,2	2,79	1,0	2,77	2,8	2,76	1,4
	15	2,45	1,3	2,36	1,0	2,41	1,2	2,39	2,7	2,37	1,1	2,34	3,3	2,33	2,0
	20	2,21	1,2	2,21	1,0	2,23	1,4	2,23	2,4	2,22	1,3	2,21	3,2	2,20	1,9
35	0	3,03	0,8	2,81	<0,4	2,93	0,7	2,87	2,0	2,83	0,7	2,80	2,5	2,80	1,3
	5	3,02	0,9	2,94	0,8	3,00	1,1	2,96	2,1	2,96	0,7	2,94	2,7	2,93	1,4
	10	2,66	1,0	2,61	0,8	2,64	1,4	2,63	2,2	2,62	0,8	2,60	2,8	2,60	1,6
	15	2,30	1,1	2,27	1,0	2,30	1,4	2,30	2,6	2,29	0,8	2,27	3,0	2,25	1,9
	20	2,21	1,2	2,18	1,1	2,21	1,8	2,20	2,5	2,18	0,9	2,17	3,2	2,16	2,0

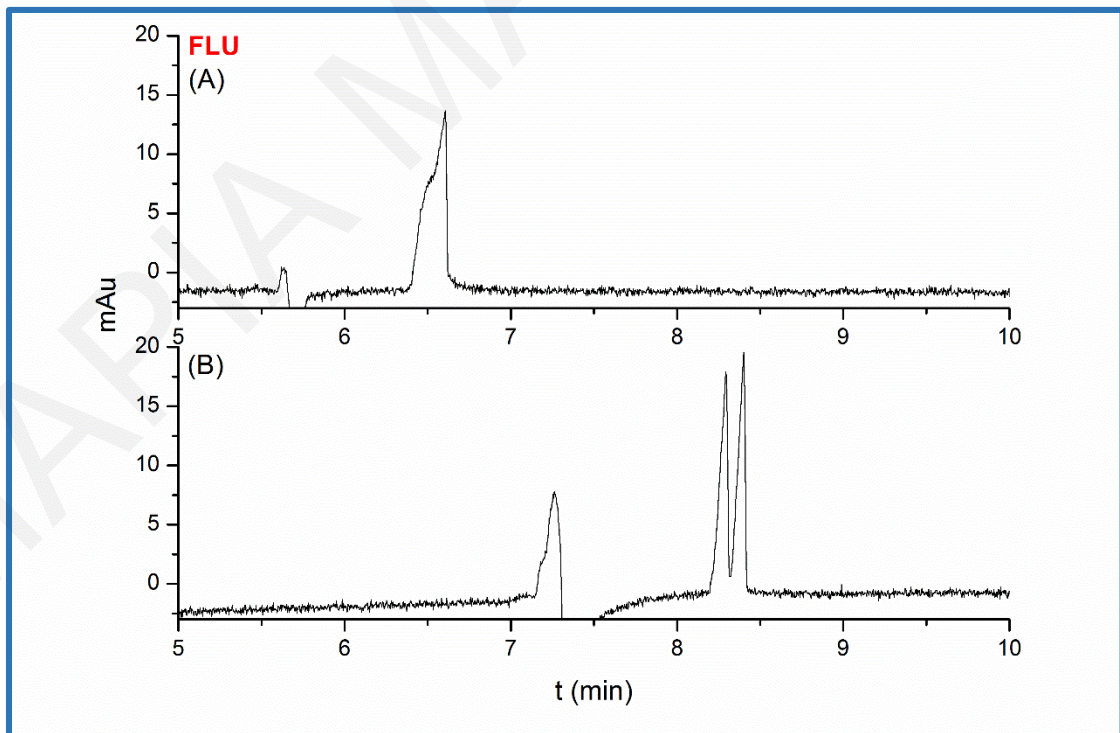
*($10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

Πίνακας 4.5. Τιμές της αποδοτικότητας και για τα δύο εναντιομερή (N_1 και N_2) που λήφθηκαν για την KET, CAR, INDO, NAP και FEN. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4.

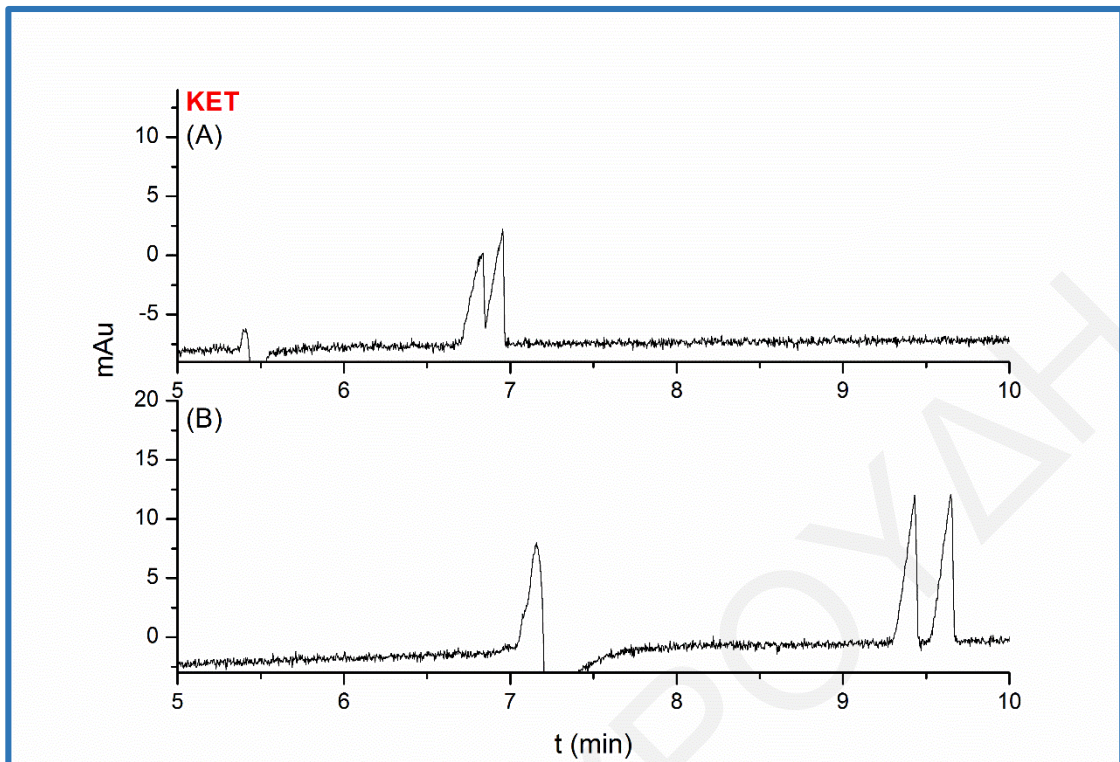
CS [CD] (mM)	Πρόσθετο [CIL] (mM)	KET		CAR		INDO		NAP		FEN	
		N_1 ($\times 10^4$)	N_2 ($\times 10^4$)	N_1 ($\times 10^4$)	N_2 ($\times 10^4$)	N_1 ($\times 10^4$)	N_2 ($\times 10^4$)	N_1 ($\times 10^4$)	N_2 ($\times 10^4$)	N_1 ($\times 10^4$)	N_2 ($\times 10^4$)
5	0	-	-	-	-	3,9	3,8	3,5	3,2	-	-
	5	-	-	-	-	5,9	6,5	4,3	4,5	-	-
	10	-	-	-	-	4,6	5,4	3,6	4,1	-	-
	15	-	-	-	-	6,2	7,2	6,6	6,8	-	-
	20	-	-	-	-	5,6	6,3	3,7	4,1	-	-
10	0	-	-	-	-	3,2	2,9	3,6	3,0	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	5,2	4,8	-	-
	10	-	-	-	-	5,5	6,3	5,3	5,3	-	-
	15	-	-	-	-	8,5	8,5	6,5	6,4	-	-
	20	-	-	9,6	11	5,5	6,9	5,4	5,3	-	-
15	0	-	-	4,5	6,8	5,4	5,7	6,1	5,3	-	-
	5	-	-	9,6	12	7,6	8,0	8,9	7,5	-	-
	10	-	-	11	15	7,5	8,7	11	8,8	-	-
	15	-	-	13	18	8,2	8,5	11	9,8	-	-
	20	-	-	13	15	6,2	6,8	10	8,1	-	-
20	0	-	-	6,9	7,0	-	-	5,7	4,6	-	-
	5	-	-	11	13	-	-	8,9	8,2	-	-
	10	-	-	11	13	-	-	11	9,1	-	-
	15	-	-	12	15	10	11	12	9,8	-	-
	20	-	-	13	15	-	-	12	11	17	16
25	0	-	-	7,4	7,4	-	-	7,1	6,0	-	-
	5	-	-	11	12	-	-	11	10	-	-
	10	-	-	15	15	-	-	13	11	-	-
	15	-	-	15	16	-	-	15	13	14	14
	20	-	-	14	16	-	-	11	10	13	13
30	0	-	-	9,9	8,6	-	-	9,0	15	-	-
	5	-	-	16	15	-	-	14	12	13	14
	10	-	-	15	15	-	-	12	11	-	-
	15	-	-	15	14	-	-	12	12	13	13
	20	-	-	14	14	-	-	13	11	13	14
35	0	-	-	9,1	7,8	-	-	7,0	6,0	-	-
	5	-	-	15	14	-	-	14	12	-	-
	10	-	-	15	14	-	-	14	13	13	13
	15	-	-	15	14	-	-	12	12	14	14
	20	9,2	9,7	17	14	-	-	15	14	14	15



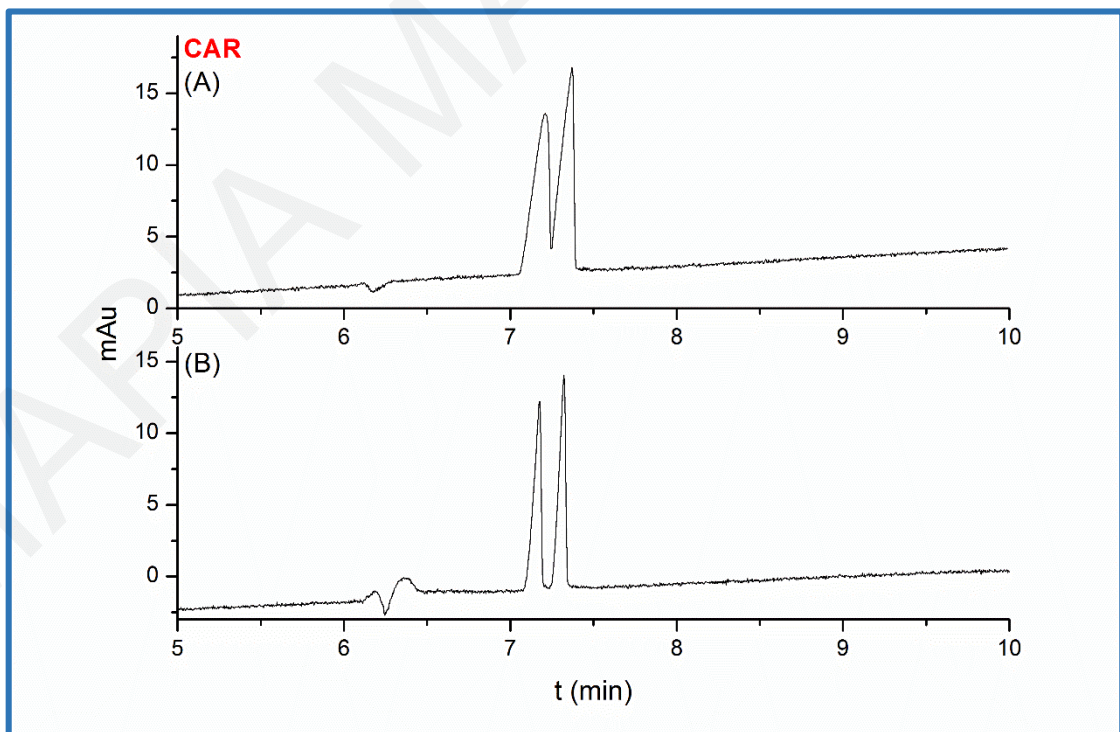
Σχήμα 4.9. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας (A) 30 mM TM-β-CD και (B) 30 mM TM-β-CD/15 mM L-AlaC₄Lac για το διαχωρισμό της IBU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4.



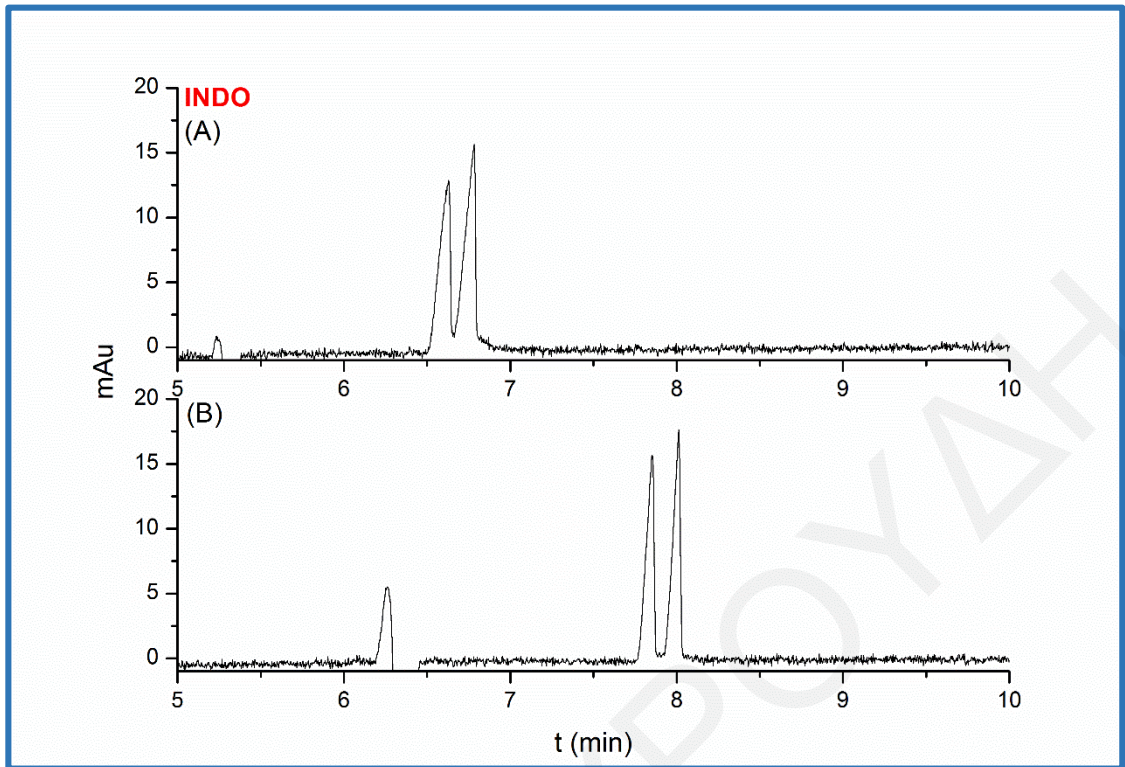
Σχήμα 4.10. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας (A) 35 mM TM-β-CD και (B) 35 mM TM-β-CD/20 mM L-AlaC₄Lac για το διαχωρισμό της FLU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4.



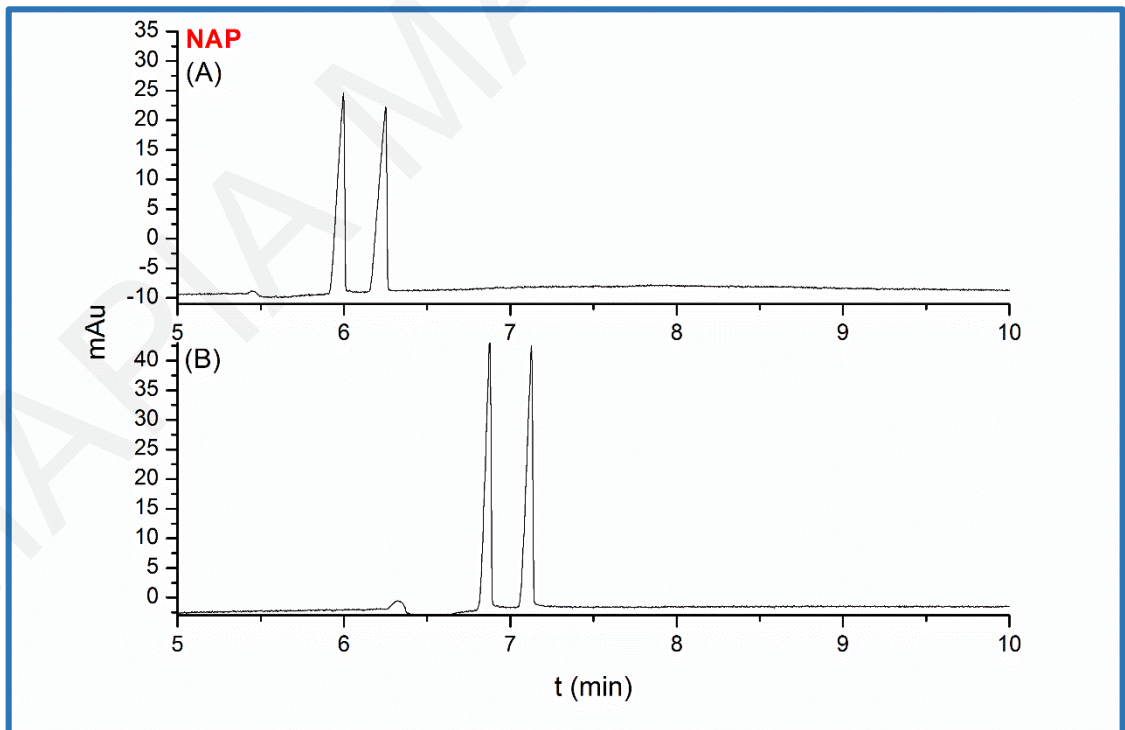
Σχήμα 4.11. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας (A) 35 mM TM- β -CD και (B) 35 mM TM- β -CD/20 mM L-AlaC₄Lac για το διαχωρισμό της KET. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4.



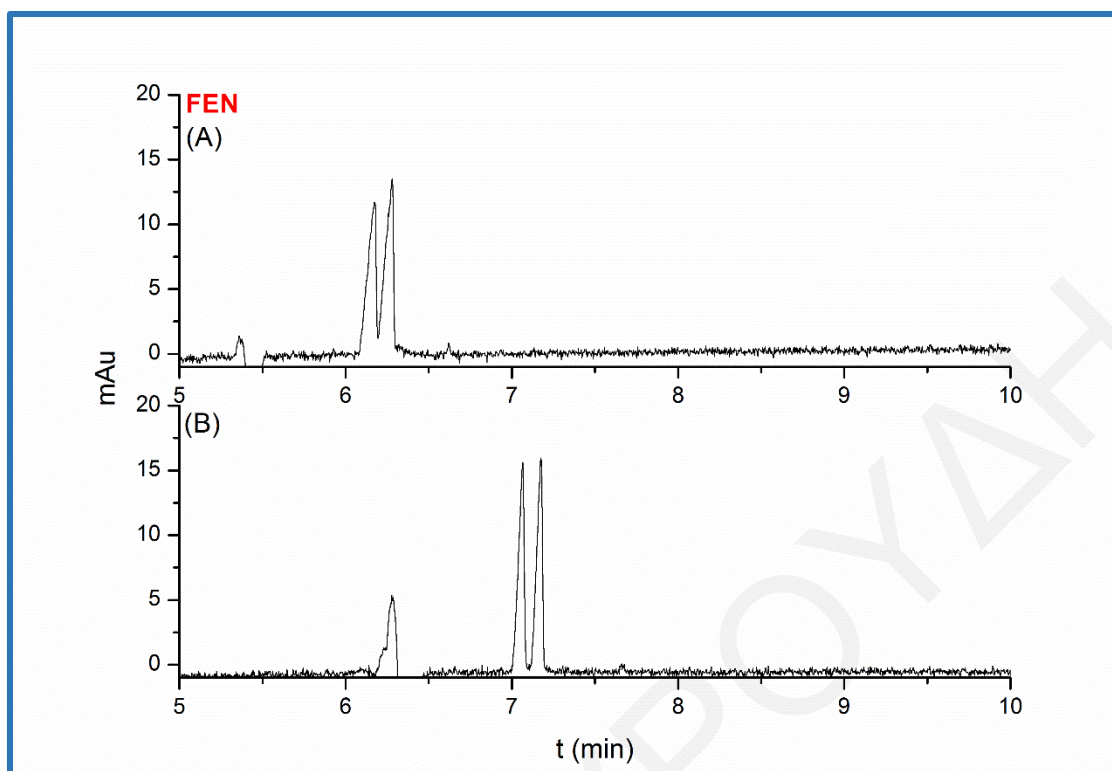
Σχήμα 4.12. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας (A) 10 mM TM- β -CD και (B) 10 mM TM- β -CD/20 mM L-AlaC₄Lac για το διαχωρισμό της CAR. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4.



Σχήμα 4.13. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας (A) 20 mM TM-β-CD και (B) 20 mM TM-β-CD/15 mM L-AlaC₄Lac για το διαχωρισμό της INDO. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4.



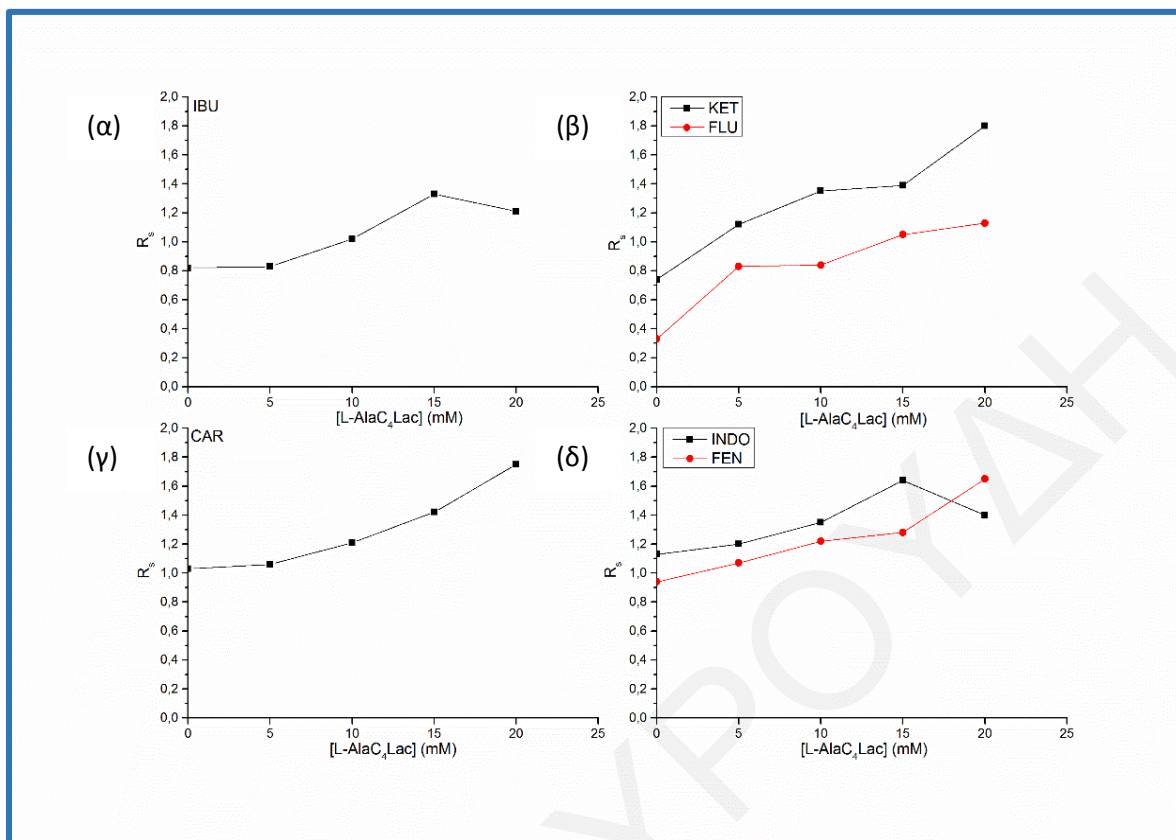
Σχήμα 4.14. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας (A) 25 mM TM-β-CD και (B) 25 mM TM-β-CD/15 mM L-AlaC₄Lac για το διαχωρισμό της NAP. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4.



Σχήμα 4.15. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας (A) 20 mM TM-β-CD και (B) 20 mM TM-β-CD/20 mM L-AlaC₄Lac για το διαχωρισμό της FEN. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4.

Η αποδοτικότητα είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που λήφθηκε υπόψη κατά την αξιολόγηση της συνεργιστικής δράσης του δυαδικού συστήματος. Με την προσθήκη του L-AlaC₄Lac στον BGE, οι τιμές της αποδοτικότητας βελτιώθηκαν σημαντικά. Οι τιμές για την αποδοτικότητα υπολογίστηκαν μόνο όταν η διαχωριστική ικανότητα ήταν μεγαλύτερη από 1,5 (Πίνακας 4.5). Ένα τυπικό παράδειγμα, το οποίο επιβεβαιώνει τη βελτίωση της αποδοτικότητας των δύο εναντιομερών με την προσθήκη και την αύξηση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac, παρουσιάζεται στο **Σχήμα 4.17**.

Συγκεκριμένα, οι τιμές της αποδοτικότητας των εναντιομερών της NAP (N₁ και N₂) αυξήθηκαν από $7,1 \times 10^4$ και $6,0 \times 10^4$ σε 11×10^4 και 10×10^4 , αντίστοιχα, όταν 5 mM L-AlaC₄Lac προστέθηκαν στον BGE. Μια περαιτέρω αύξηση στη συγκέντρωση (μέχρι 15 mM) οδήγησε σε ακόμη πιο υψηλές τιμές απόδοσης (15×10^4 και 13×10^4). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο πλήρης διαχωρισμός ($R_s > 1,5$) και οι υψηλές τιμές της αποδοτικότητας που λήφθηκαν μας επέτρεψαν να προσδιορίσουμε τις βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού για κάθε αναλύτη. Οι συνθήκες αυτές, καθώς και τα βέλτιστα ηλεκτροφερογράμματα απεικονίζονται για τον κάθε αναλύτη ξεχωριστά στα **Σχήματα 4.9-4.15**.



Σχήμα 4.16. Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac στη διαχωριστική ικανότητα για το διαχωρισμό των: (α) IBU, με 30 mM TM-β-CD (β) FLU και KET, με 35 mM TM-β-CD (γ) CAR, με 10 mM TM-β-CD και (δ) INDO και FEN, με 20 mM TM-β-CD. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.9.

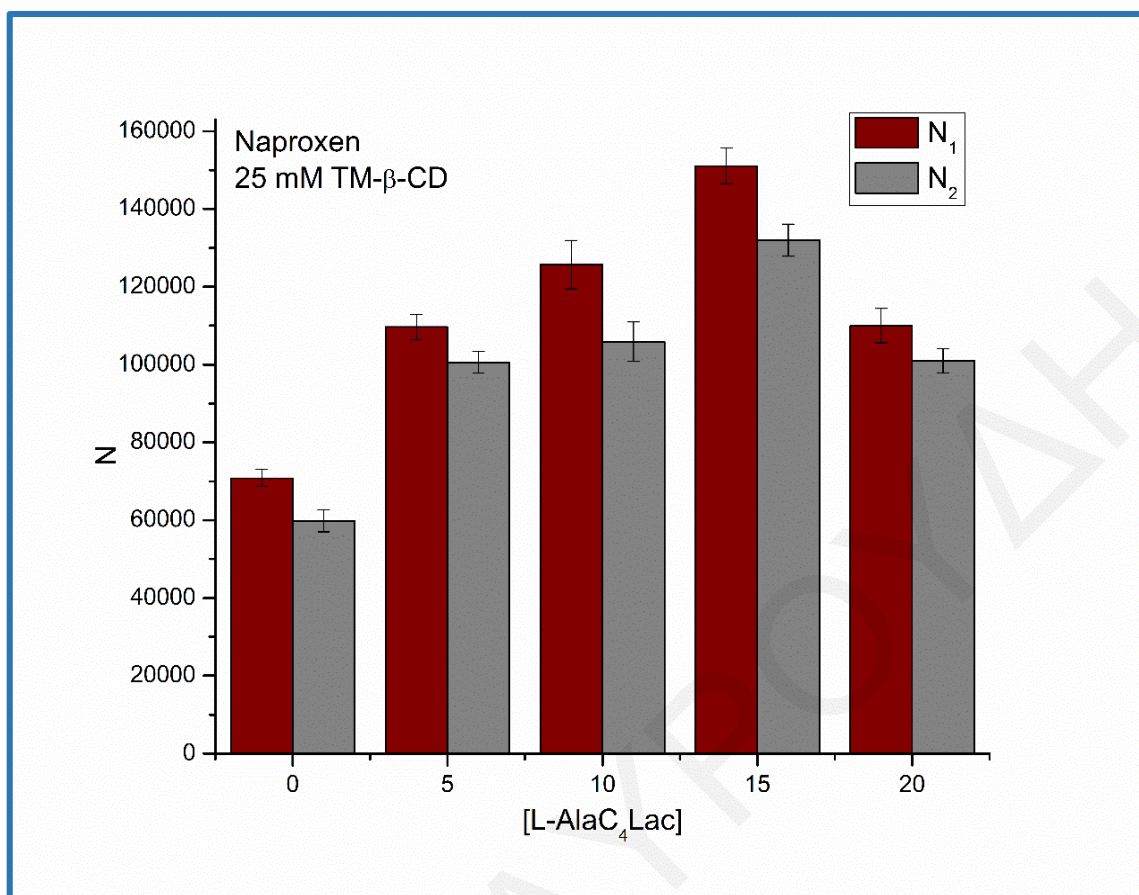
4.2.4 Επίδραση του pH

Σε αυτή τη μελέτη, το pH ήταν ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που έπρεπε να εξεταστεί, αφού οι αλλαγές στο pH μπορούν να επηρεάσουν το φορτίο του αναλύτη, καθώς και το L-AlaC₄Lac στο δυαδικό σύστημα TM-β-CD/L-AlaC₄Lac. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ως βέλτιστο ρυθμιστικό διάλυμα για τη συγκεκριμένη ομάδα αναλυτών επιλέχθηκε το CH₃COONa/CH₃COOH. Το pH κυμάνθηκε από 4,5 έως 5,5, με τις υπόλοιπες ηλεκτροφορητικές συνθήκες να παραμένουν σταθερές. Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4.6**, οι καλύτερες διαχωριστικές ικανότητες, για όλους τους εξεταζόμενους αναλύτες, λήφθηκαν όταν το pH του ρυθμιστικού διαλύματος ήταν 5,0. Όταν το pH ήταν, είτε μικρότερο από 4,5 είτε μεγαλύτερο από 5,5, η διαχωριστική ικανότητα ήταν αρκετά χαμηλή, λόγω ασταθούς γραμμής βάσης, αφού το ρεύμα βρισκόταν σε οριακό σημείο. Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι χρόνοι μετανάστευσης των αναλυτών αυξήθηκαν με μείωση του pH, κυρίως λόγω της

μείωσης της EOF. Σε χαμηλές τιμές pH, η μείωση στη R_s μπορεί να αποδοθεί στο χαμηλότερο βαθμό ιονισμού του αναλύτη, το οποίο μπορεί, με τη σειρά του, να προκαλέσει δυσκολίες με τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αναλύτη και του χειρόμορφου κατιόντος του L-AlaC₄Lac. Από την άλλη πλευρά, η αύξηση του pH μειώνει την ποσότητα των θετικά φορτισμένων αμινομάδων, με αποτέλεσμα να υπάρχουν λιγότερες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κατιόντος L-AlaC₄⁺ και των αρνητικά φορτισμένων αναλυτών. Το βέλτιστο pH, σε αυτή τη μελέτη, μας παρέχει σημαντικές πληροφορίες για το μηχανισμό αλληλεπίδρασης μεταξύ των αναλυτών, του L-AlaC₄Lac και της TM-β-CD. Στο παρόν σύστημα, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τι είδους αλληλεπιδράσεις αναπτύσσονται μεταξύ των τριών οντοτήτων. Μια πιθανή αλληλεπίδραση περιλαμβάνει τους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των ομάδων υδροξυλίου της καρβοξυλομάδας των NSAIDs και της λειτουργικής αμινομάδας του χειρόμορφου κατιόντος του L-AlaC₄Lac. Μια άλλη πιθανή αλληλεπίδραση περιλαμβάνει την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ της ομάδας του καρβοξυλίου των αναλυτών και της αμινομάδας του AAIL.

Πίνακας 4.6. Επίδραση του pH στο χειρόμορφο διαχωρισμό των επτά NSAIDs. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4 και 4.7 (στο βέλτιστο σύστημα του κάθε αναλύτη).

Αναλύτης	R_s		
	pH=4,5	pH=5,0	pH=5,5
IBU	0,7	1,3	1,2
FLU	1,0	1,1	0,8
KET	1,1	1,8	1,0
CAR	1,4	1,8	1,2
INDO	1,2	1,6	0,8
NAP	3,0	3,4	2,8
FEN	1,0	1,6	1,2



Σχήμα 4.17. Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac στην αποδοτικότητα για το NAP. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.9.

4.2.5 Αξιολόγηση της Μεθόδου

Μετά τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων για τον κάθε αναλύτη ξεχωριστά, οι μέθοδοι αξιολογήθηκαν με τα κριτήρια της επαναληψιμότητας (run-to-run), της ενδιάμεσης πιστότητας (day-to-day) και της batch-to-batch επαναληψιμότητας.

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου υπολογίστηκε με τη μέτρηση των τιμών RSD, όσον αφορά την EOF, τους χρόνους μετανάστευσης και τις τιμές της αποδοτικότητας των δύο εναντιομερών για κάθε υπό μελέτη NSAID. Πρότυπο ρακεμικό μείγμα του κάθε αναλύτη συγκέντρωσης 0,2 mg/ml εισήχθη στο σύστημα CE και αναλύθηκε κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες. Πραγματοποιήθηκαν δέκα επαναλαμβανόμενες μετρήσεις μέσα στην ίδια μέρα (run-to-run) για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας. Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.7, οι τιμές RSD για την EOF δεν ξεπερνούσαν το 0,45%, καθώς οι τιμές RSDs για το πρώτο εναντιομερές ήταν κάτω του 0,82% και για το δεύτερο κάτω του 0,85%.

Για τον υπολογισμό της ενδιάμεσης πιστότητας πραγματοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενες μετρήσεις σε πέντε διαδοχικές μέρες, στις βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού του NAP. Οι τιμές RSDs που προέκυψαν ήταν 0,73 για την EOF και 0,92/0,98 για τους χρόνους κατακράτησης των δύο εναντιομερών της NAP.

Όσον αφορά την batch-to-batch πιστότητα, συντέθηκαν τρεις παρτίδες του AAIL L-AlaC₄Lac. Κάθε παρτίδα L-AlaC₄Lac χρησιμοποιήθηκε στις βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού του NAP και πραγματοποιήθηκαν πέντε διαδοχικές μετρήσεις. Για κάθε παρτίδα υπολογίστηκε ο μέσος όρος του t_{EOF} , του t_1 και του t_2 . Οι τιμές %-RSD υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τους τρεις μέσους όρους από τις τρεις παρτίδες. Η batch-to-batch RSD ήταν κάτω από 0,58 για το t_{EOF} και κάτω από 0,85/0,88 για τους χρόνους μετανάστευσης των δύο εναντιομερών. Επομένως, η χρήση των AAIL, και συγκεκριμένα των L- και D-AlaC₄Lac, ως CSs στην CE παρέχουν εξαιρετικές επαναληψιμότητες.

Πίνακας 4.7. Επαναληψιμότητα των χρόνων μετανάστευσης και αποδοτικότητα των βέλτιστων μεθόδων διαχωρισμού για κάθε αναλύτη. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Πίνακα 4.4.

Αναλύτης	Βέλτιστο Σύστημα*	RSD _{eof}	RSD _{t₁}	RSD _{t₂}	RSD _{N1} (x 10 ⁴)	RSD _{N2} (x 10 ⁴)	RSD _{Rs}
IBU	30/15	0,42	0,82	0,85	-	-	3,83
FLU	35/20	0,45	0,80	0,83	-	-	3,46
KETO	35/20	0,31	0,75	0,77	0,33	0,38	3,77
CAR	10/20	0,33	0,74	0,77	0,40	0,39	2,16
INDO	20/15	0,39	0,77	0,79	0,41	0,13	2,04
NAP	25/15	0,38	0,70	0,73	0,45	0,41	2,09
FEN	20/20	0,34	0,78	0,80	0,52	0,49	3,44

*[TM-β-CD] (mM)/[L-AlaC₄Lac] (mM)

Οι τιμές RSD καταδεικνύουν μια εξαιρετική επαναληψιμότητα για το δυαδικό σύστημα TM-β-CD/L-AlaC₄Lac στους εναντιομερείς διαχωρισμούς των NSAIDs. Να σημειωθεί ότι οι βέλτιστες συνθήκες για κάθε αναλύτη προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τη διαχωριστική ικανότητα, την αποδοτικότητα και το χρόνο ανάλυσης.

Επιπλέον, εξετάστηκε η σταθερότητα του AAIL, φυλάσσοντας το L-AlaC₄Lac σε θερμοκρασία δωματίου για περίοδο έξι μηνών. Καμία επίδραση στον εναντιομερή διαχωρισμό του NAP, αλλά ούτε και διεύρυνση των κορυφών, δεν παρατηρήθηκε, όταν το AAIL προστέθηκε στον BGE.

4.2.6 Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος για τον εναντιομερή διαχωρισμό επτά NSAIDs. Η αποτελεσματικότητα του AAIL (L-AlaC₄Lac) ως πρόσθετο στο ρυθμιστικό διάλυμα αξιολογήθηκε για την εναντιομερή ανάλυση των εν λόγω ενώσεων. Όπως αποδείχτηκε, το συγκεκριμένο AAIL διαδραματίζει βασικό ρόλο στον εναντιοεκλεκτικό διαχωρισμό των επτά 2-αρυλπροπιονικών οξέων. Ειδικότερα, η προσθήκη L-AlaC₄Lac στο ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε TM-β-CD ως CS, οδήγησε στον πλήρη εναντιομερή διαχωρισμό σχεδόν όλων των αναλυτών και στη βελτίωση της αποδοτικότητας των κορυφών. Οι διαχωριστικές ικανότητες ήταν πολύ καλύτερες όταν χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός του CS με το AAIL, σε σχέση με την περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε μόνο η TM-β-CD. Η βελτίωση αυτή υποδηλώνει την ύπαρξη συνεργιστικής δράσης μεταξύ των δύο προσθέτων. Ως εκ τούτου, είναι σαφές από αυτή τη μελέτη ότι η προσθήκη του L-AlaC₄Lac μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα συνιστάται για τον επαναλήψιμο, πλήρη, αποδοτικό και γρήγορο εναντιομερή διαχωρισμό των NSAIDs.

4.3 Μελέτη της Συνεργιστικής Δράσης του L-AlaC₄Lac με Τρία Παράγωγα της β-CD για το Χειρόμορφο Διαχωρισμό Δύο Κουμαρινικών Παραγώγων

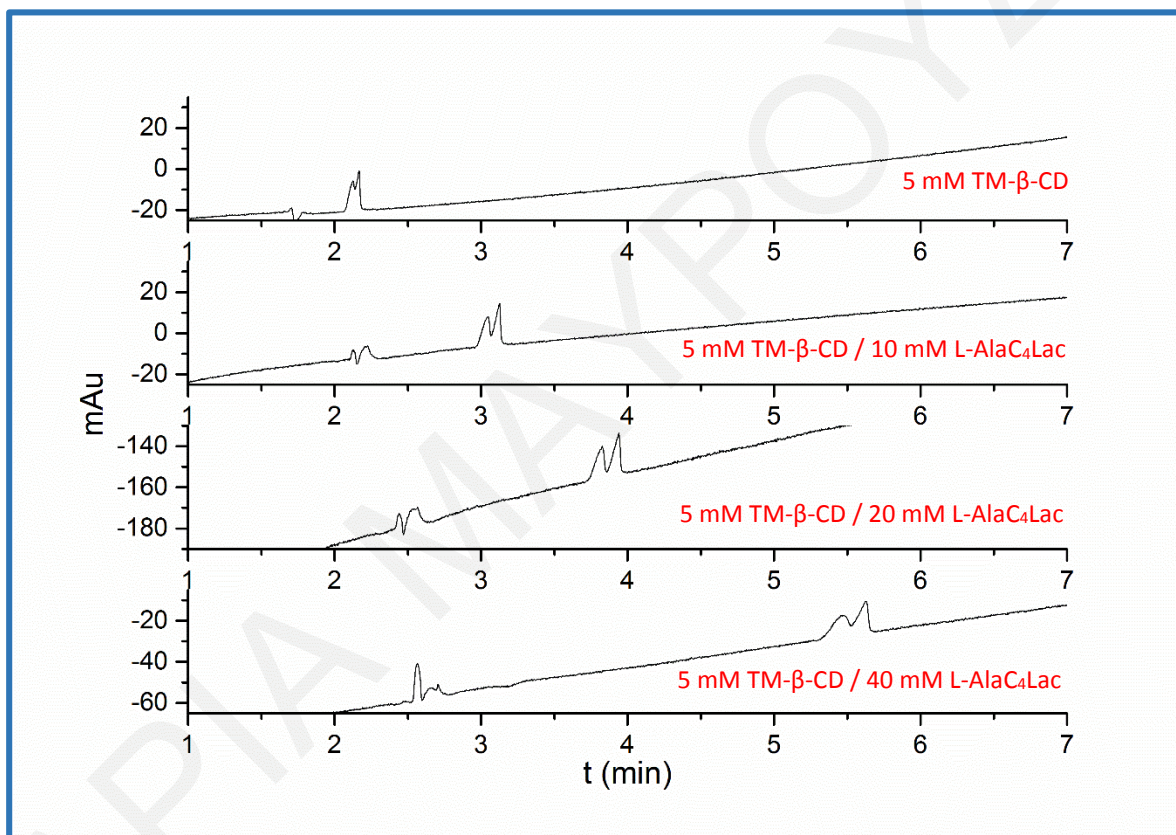
Μέχρι τώρα, η συνεργιστική δράση του L-AlaC₄Lac με άλλα παράγωγα της β-CD για σκοπούς σύγκρισης, δεν έχει μελετηθεί. Σε αυτή τη μελέτη εξετάστηκε η εναντιοεκλεκτικότητα παραγώγων της β-CD ως προς δύο αναλύτες φαρμακευτικού ενδιαφέροντος και διερευνήθηκε η συνεργιστική τους δράση με το L-AlaC₄Lac. Αυτή είναι η πρώτη φορά που καταγράφεται και συγκρίνεται η εναντιοεκλεκτική ικανότητα δυαδικών συστημάτων που αποτελούνται από παράγωγα της β-CD και του L-AlaC₄Lac ως προς το

χειρόμορφο διαχωρισμό των κουμαρινικών παραγώγων στην CE. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο χειρόμορφος διαχωρισμός των κουμαρινικών αντιπηκτικών, COU και WAR. Όσον αφορά τη WAR, το S- εναντιομερές είναι φαρμακολογικά δραστικότερο απ' ό,τι το R- εναντιομερές. Η COU είναι ένα ανάλογο της WAR και για το λόγο αυτό απασχολούν τον τομέα των χειρόμορφων διαχωρισμών. Και οι δύο αναλύτες είναι ηλεκτροαρνητικοί λόγω της κετο-ενολικής ομάδας. Επίσης, η υδροξυλομάδα στον αρωματικό δακτύλιο έχει τιμή $pK_a = 5,1$ και $4,5$ για τη WAR και COU, αντίστοιχα. Συνεπώς, σε pH πάνω από $5,1$ και οι δύο αναλύτες είναι αρνητικά φορτισμένοι. Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι β -CD, HP- β -CD και TM- β -CD ως CSs και μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης του L-AlaC₄Lac στον εναντιομερή διαχωρισμό.

Αρχικά, αξιολογήθηκε ο χειρόμορφος διαχωρισμός της WAR. Δοκιμάστηκαν οι β -CD, HP- β -CD και TM- β -CD σε συγκεντρώσεις 5, 10 και 20 mM. Από τις τρεις CDs που μελετήθηκαν, μόνο η TM- β -CD παρουσίασε κάποια στοιχειώδη εναντιοεκλεκτικότητα. Συγκεκριμένα, η μέγιστη τιμή R_s που λήφθηκε ήταν 1,3 όταν χρησιμοποιήθηκαν 20 mM TM- β -CD, ενώ μικρότερες τιμές R_s λήφθηκαν για τις άλλες συγκεντρώσεις της CD. Συνεπώς, η TM- β -CD είναι ο μόνος CS που παρουσιάζει εναντιοεκλεκτικότητα ως προς την WAR. Εντούτοις, και για τα τρία παράγωγα της β -CD, έγινε μελέτη της επίδρασης της προσθήκης του L-AlaC₄Lac στον BGE. Η προσθήκη του AAIL στον BGE, ο οποίος περιείχε β -CD, δεν παρουσίασε κανένα διαχωρισμό. Αντίθετα, όταν προστέθηκε το L-AlaC₄Lac στον BGE σε συνδυασμό είτε με την TM- β -CD (**Σχήμα 4.18-4.19**) ή την HP- β -CD (**Σχήμα 4.20-4.21**), βελτιώθηκε σημαντικά ο διαχωρισμός των εναντιομερών της WAR. Η μέγιστη διαχωριστική ικανότητα ($R_s = 2.6$) επιτεύχθηκε με χρήση του συνδυασμού 20 mM TM- β -CD και 40 mM L-AlaC₄Lac. Είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι με την προσθήκη 10 mM HP- β -CD και 40 mM L-AlaC₄Lac, η διαχωριστική ικανότητα από 0,0 αυξήθηκε δραματικά σε τιμή R_s ίση με 1,0 (**Σχήμα 4.20**). Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των 5 mM της HP- β -CD (**Σχήμα 4.21**).

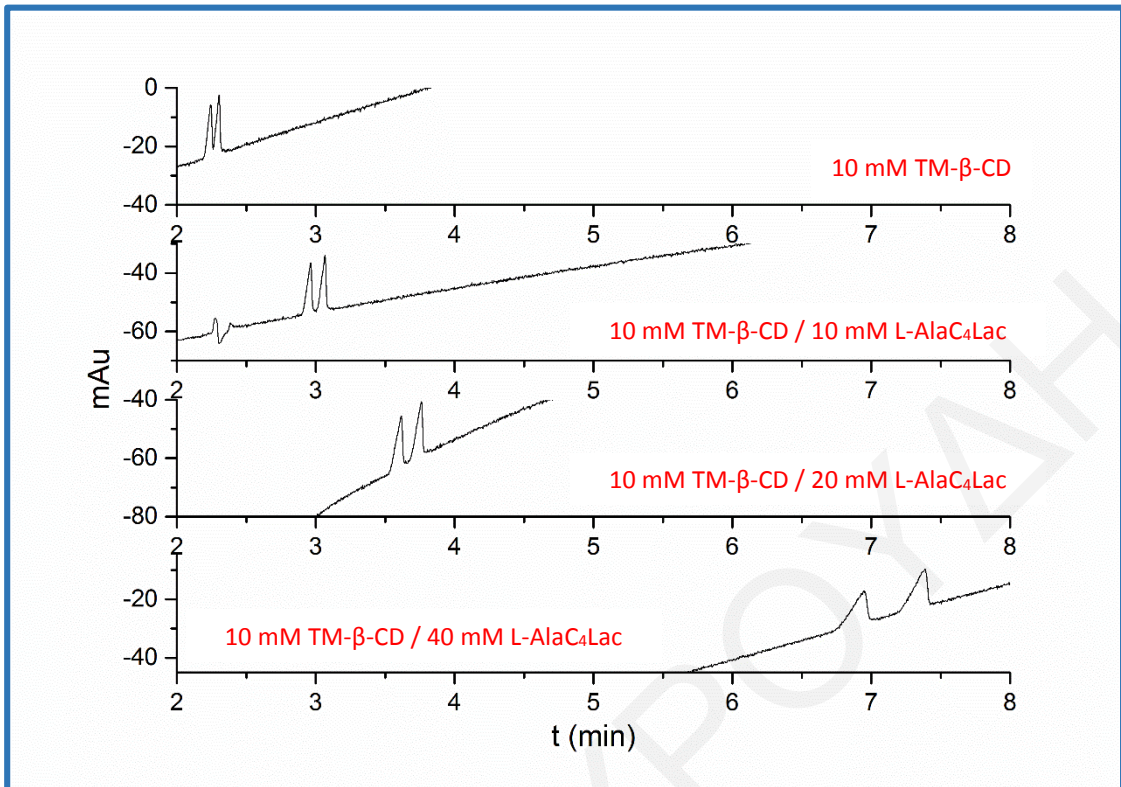
Όσον αφορά την COU, η χρήση των β -CD και HP- β -CD δεν παρουσίασε καμία εναντιοεκλεκτικότητα σε καμία από τις υπό μελέτη συγκεντρώσεις (5, 10 και 20 mM). Ωστόσο, στη συγκέντρωση 20 mM TM- β -CD επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός των δύο εναντιομερών της COU. Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε η επίδραση του L-AlaC₄Lac στο διαχωρισμό. Όπως φαίνεται στα **Σχήματα 4.22-4.24**, η προσθήκη του L-AlaC₄Lac σε BGE

που περιείχε TM-β-CD, βελτίωσε περαιτέρω το διαχωρισμό και στις τρεις συγκεντρώσεις του CS. Ωστόσο, με την προσθήκη 40 mM L-AlaC₄Lac φάνηκε να υπάρχει μια σταθερότητα ή μικρή μείωση στο διαχωρισμό. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στην αλληλεπίδραση του L-AlaC₄Lac με την TM-β-CD, η οποία οδηγεί στη μείωση του εγκλεισμού της COU μέσα στην κοιλότητα της CD. Μια ανάλογη συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της προσθήκης 40 mM L-AlaC₄Lac στον BGE, ο οποίος περιείχε 10 mM HP-β-CD, όπου η διαχωριστική ικανότητα από 0,0 αυξήθηκε σε 0,9 (Σχήμα 4.25). Παρόμοια αύξηση παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των 5 mM HP-β-CD (Σχήμα 4.26).

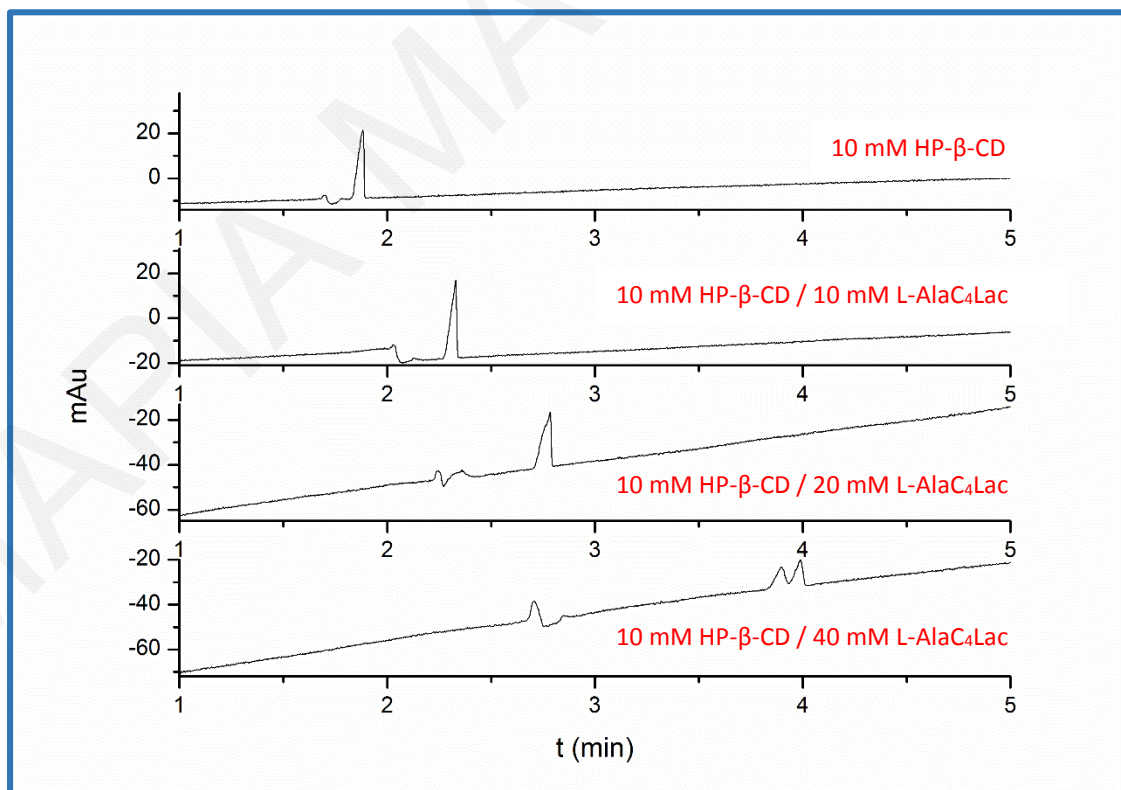


Σχήμα 4.18. Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac στο διαχωρισμό της WAR.
Συνθήκες: BGE 5 mM Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH 5, 30 kV, 20 °C.

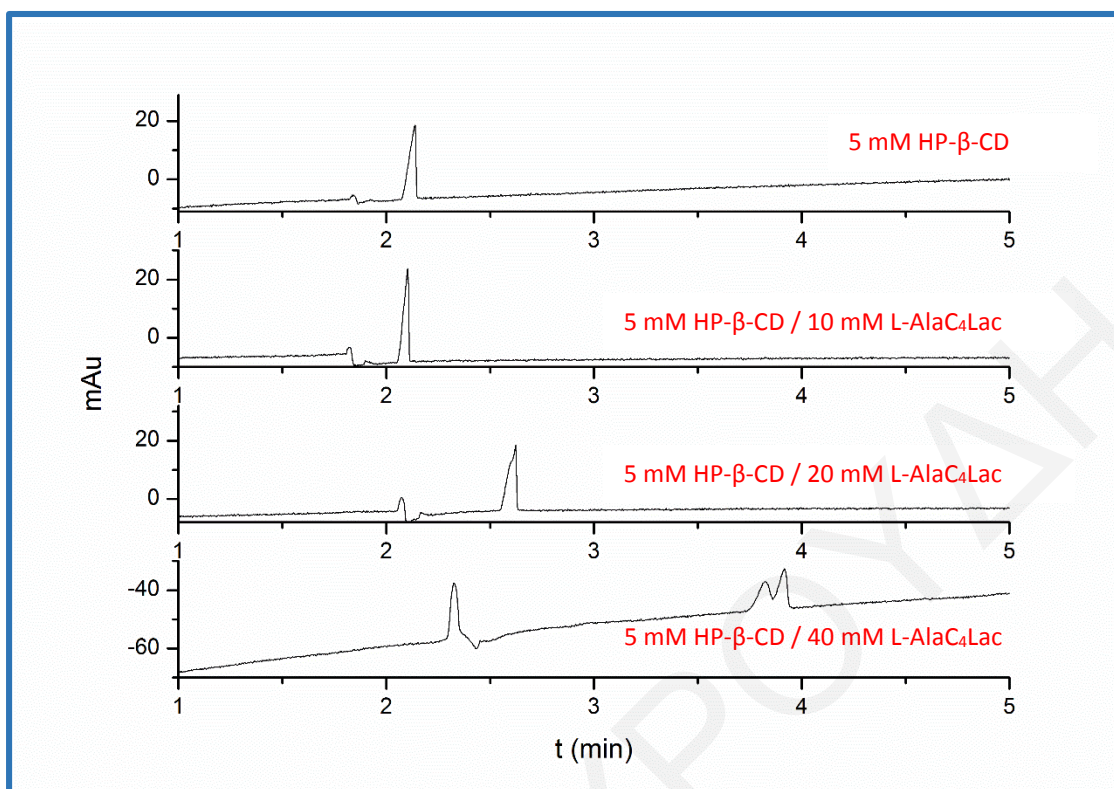
Αξίζει να σημειωθεί ότι, παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν και στην περίπτωση των NSAIDs. Επομένως, ο μηχανισμός διαχωρισμού όξινων αναλυτών με δυαδικά συστήματα της TM-β-CD και του L-AlaC₄Lac πιθανόν να είναι ο ίδιος. Επιπλέον, η παρουσία του χειρόμορφου κέντρου στο κατιόν του AAIL πιθανόν να αυξάνει την εναντιοεκλεκτικότητα του συμπλόκου AAIL/ TM-β-CD, και κατά συνέπεια, να αυξάνεται η διαχωριστική ικανότητα.



Σχήμα 4.19. Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac στο διαχωρισμό της WAR. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.18.

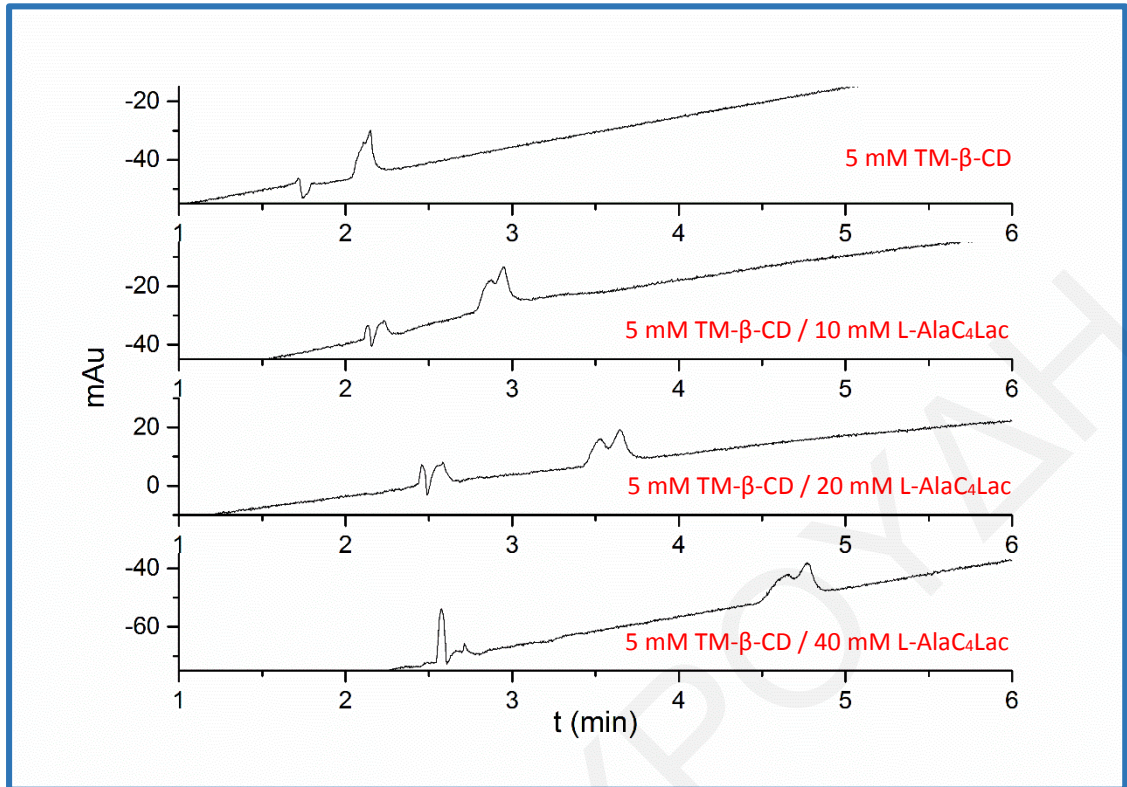


Σχήμα 4.20. Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac στο διαχωρισμό της WAR. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.18.

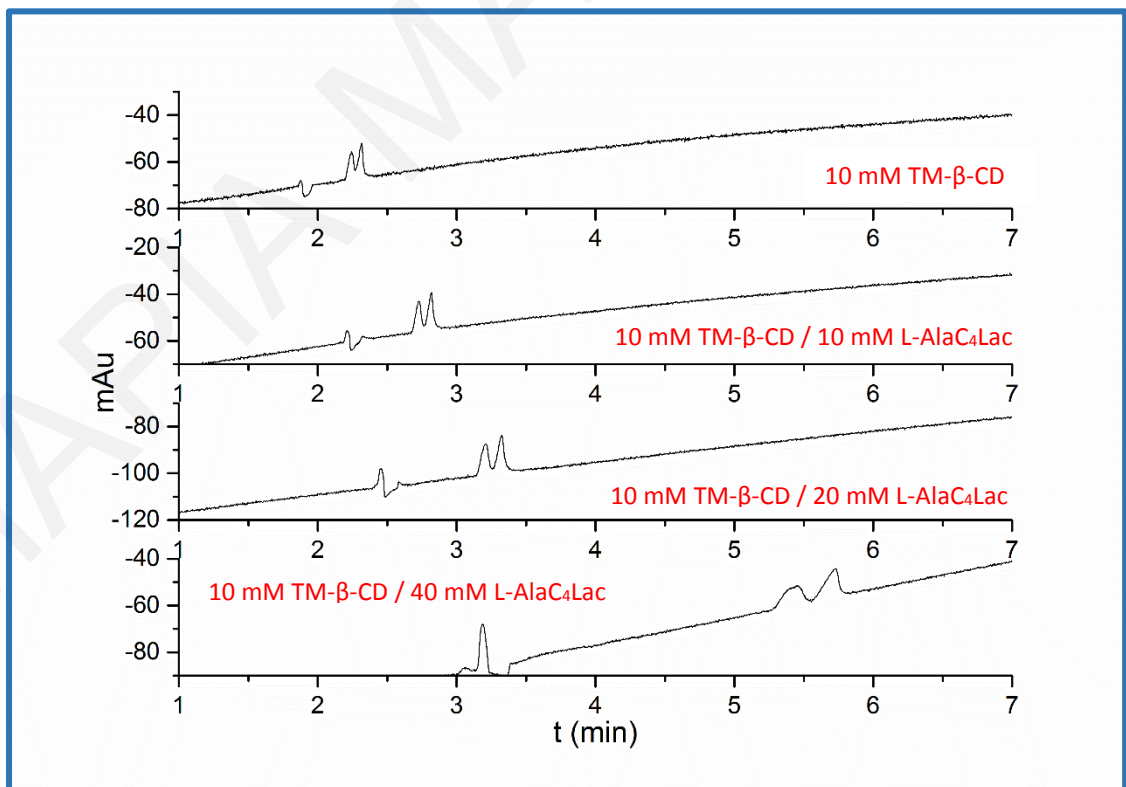


Σχήμα 4.21. Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac στο διαχωρισμό της WAR. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.18.

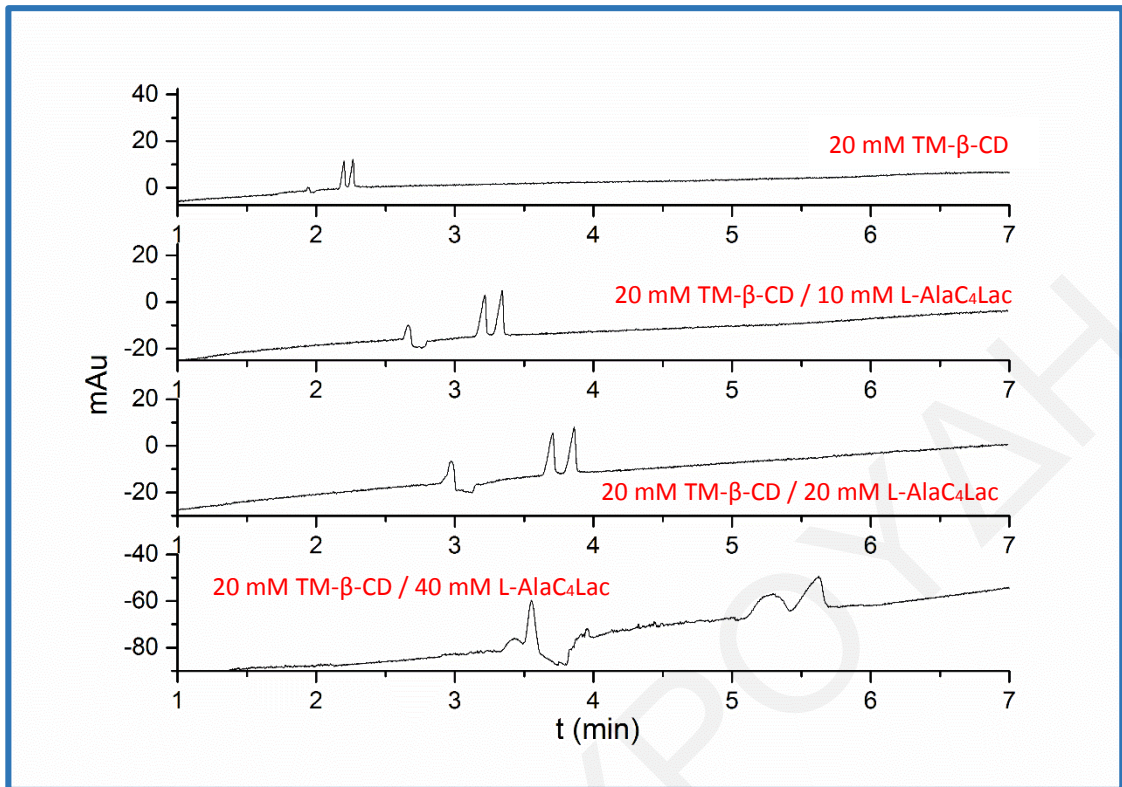
Η β-CD δεν εμφάνισε καμία εναντιοεκλεκτικότητα ως προς την COU, όπως και στην περίπτωση της WAR. Όπως φαίνεται, τα παράγωγα των CDs προσφέρουν περισσότερες αλληλεπιδράσεις, τόσο με τον αναλύτη, όσο και με το AAIL, με αποτέλεσμα να είναι αποδοτικότερα στους εναντιομερείς διαχωρισμούς όξινων αναλυτών, σε σχέση με την φυσική β-CD. Επιπλέον, η προσθήκη του AAIL οδήγησε μόνο στην αύξηση του χρόνου έκλυσης της κορυφής, χωρίς καμία ένδειξη διαχωρισμού. Η μεταβολή στο χρόνο οφείλεται στην επικάλυψη των αρνητικά φορτισμένων σιλανομάδων της στήλης από τα κατιόντα του AAIL.



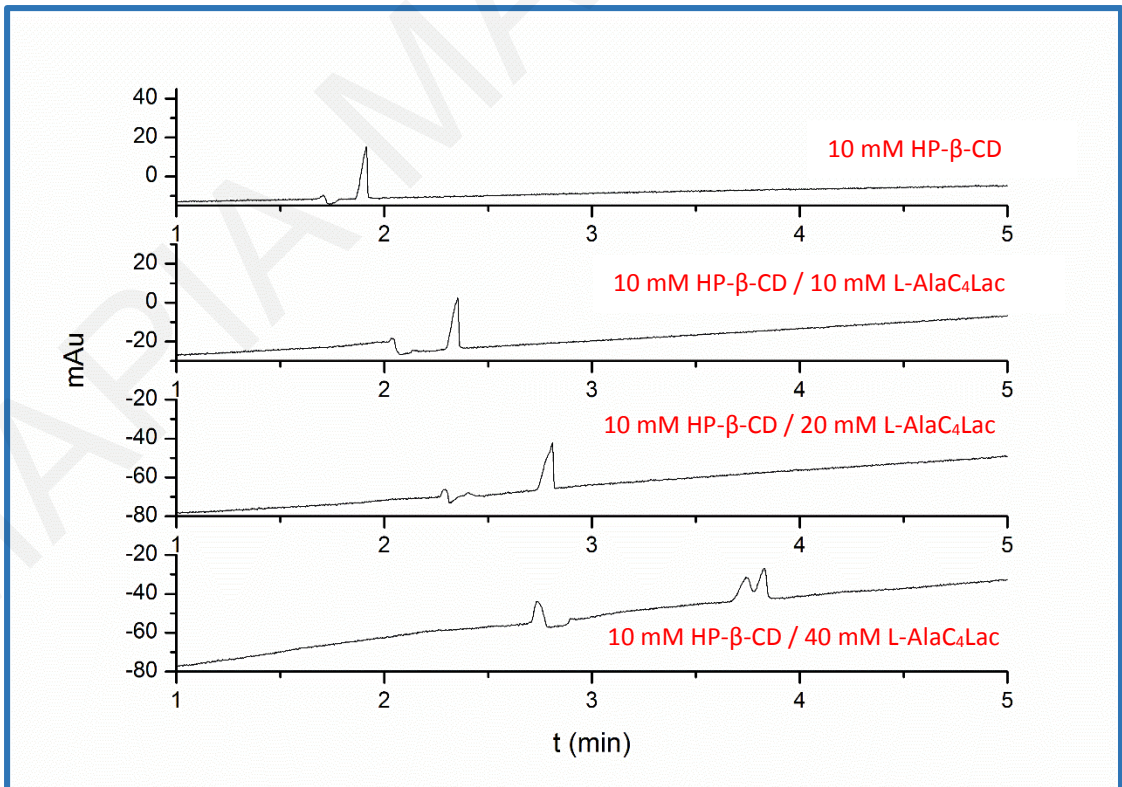
Σχήμα 4.22. Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac στο διαχωρισμό της COU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.18.



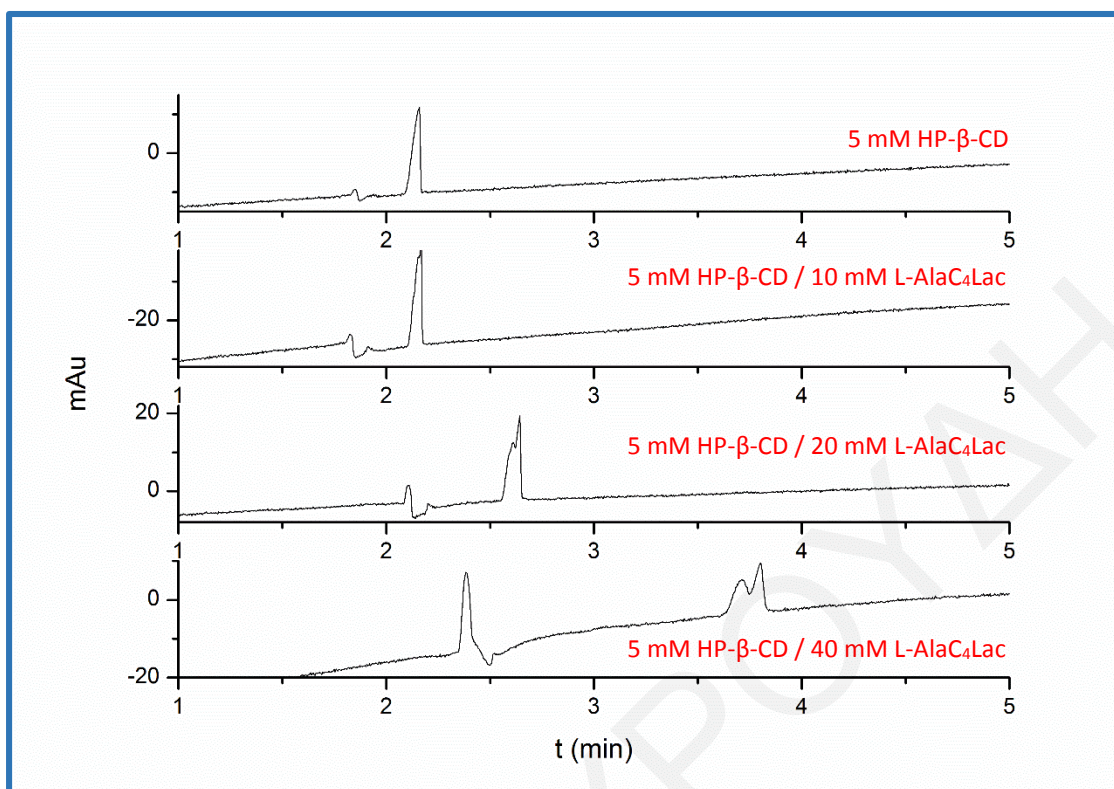
Σχήμα 4.23. Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac στο διαχωρισμό της COU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.18.



Σχήμα 4.24. Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac στο διαχωρισμό της COU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.18.



Σχήμα 4.25. Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac στο διαχωρισμό της COU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.18.



Σχήμα 4.26. Επίδραση της συγκέντρωσης του L-AlaC₄Lac στο διαχωρισμό της COU. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.18.

4.3.1 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, αυτή ήταν η πρώτη φορά που μελετήθηκαν τρία παράγωγα της β-CD σε συνδυασμό με το L-AlaC₄Lac στην CE για τον εναντιομερή διαχωρισμό κουμαρινικών παραγώγων. Ανάλογα με το παράγωγο της β-CD που χρησιμοποιήθηκε στο δυαδικό σύστημα με το L-AlaC₄Lac, οι αναλύτες παρουσίασαν διαφορετική συμπεριφορά βάση των τιμών R_s που υπολογίστηκαν. Για παράδειγμα, τα εναντιομερή των αναλυτών δεν ήταν δυνατό να διαχωριστούν με το σύστημα β-CD/ L-AlaC₄Lac. Οι καλύτεροι διαχωρισμοί επιτεύχθηκαν χρησιμοποιώντας τις TM-β-CD και HP-β-CD. Αυτό υποδηλώνει ότι οι στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις είναι ο κύριος λόγος διαχωρισμού των κουμαρινικών εναντιομερών. Με τους συγκεκριμένους αναλύτες, το σύστημα 20 mM TM-β-CD/10 mM L-AlaC₄Lac ήταν ικανό να διαχωρίσει πλήρως και τις δύο υπό μελέτη ουσίες πλήρως (R_s , $R_{s,WAR} = 1,8$ και $R_{s,COU} = 1,7$). Ωστόσο, στην περίπτωση του συστήματος 10 mM HP-β-CD/40 mM L-AlaC₄Lac, ο εναντιομερής διαχωρισμός των WAR και COU δεν ήταν πλήρης ($R_s = 1,0$ και $0,9$, αντίστοιχα).

Παρόλ' αυτά, τα πιο πάνω αποτελέσματα δίνουν κάποια ένδειξη για τον τρόπο αλληλεπίδρασης των αναλυτών με τα δυαδικά συστήματα CDs/AAILs. Για την εξακρίβωση των μηχανισμών και των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται, απαιτούνται μελέτες με χρήση κυρίως φασματοσκοπικών μεθόδων.

4.4 Χρήση Διάφορων Συστημάτων για την Ανάπτυξη μιας Νέας Αναλυτικής Μεθόδου για το Διαχωρισμό των Εναντιομερών της T4

Η T4 είναι η βασικότερη ορμόνη για τη ρύθμιση του μεταβολισμού στον οργανισμό. Η T4 υφίσταται ως δύο εναντιομερείς μορφές (L-T4 και D-T4), οι οποίες έχουν διαφορετικές βιολογικές, φαρμακολογικές και θεραπευτικές επιδράσεις. Η L-T4 χρησιμοποιείται κυρίως ως θεραπεία στον υποθυρεοειδισμό, ενώ η D-T4 χρησιμοποιείται ως αντιχοληστεριναιμικός παράγοντας. Σε αντίθεση με την L-T4, η D-T4 δεν παρουσιάζει δράση στο βασικό μεταβολικό ρυθμό, αλλά μια σημαντική μείωση της χοληστερόλης, των φωσφολιπιδίων και της απολιποπρωτεΐνης B και όλων των λιπιδίων. Η θεραπευτική χρήση της D-T4 απαιτεί μια οπτική καθαρότητα για την αποφυγή παρενεργειών λόγω ίχνους της L-T4. Επίσης, η κλινική χρήση της L-T4 απαιτεί έναν έλεγχο σχετικά με την οπτική καθαρότητα του εναντιομερούς κατά τη διάρκεια της φαρμακευτικής σύνθεσης. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η καταστολή της έκκρισης θυρεοειδούς ορμόνης (TSH) προκαλείται από την D-T4. Ως εκ τούτου, ο εναντιομερής διαχωρισμός της T4 θεωρείται υψίστης σημασίας.

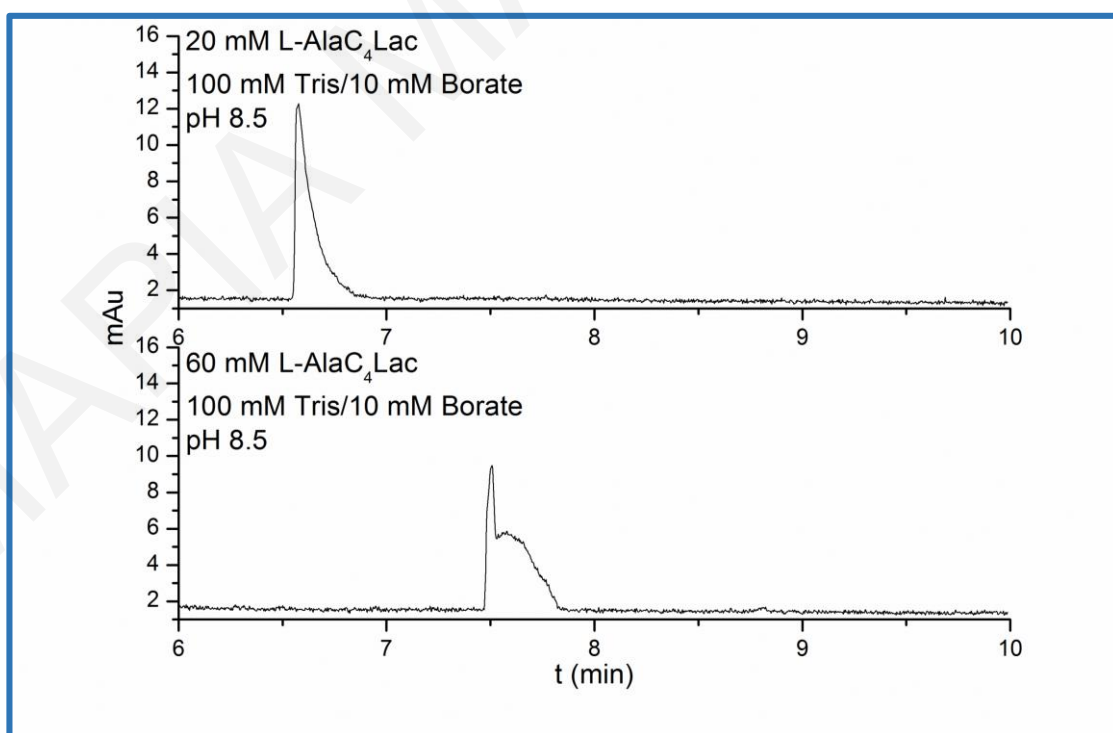
Με την πάροδο των χρόνων, έχουν αναπτυχθεί διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι για το διαχωρισμό της T4. Ωστόσο, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική μέθοδος είναι η HPLC [210-212]. Συγκεκριμένα, μόνο δύο μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για το χειρόμορφο διαχωρισμό της T4 με χρήση της CE [213, 214]. Οι Lee et al., το 2003, χρησιμοποιώντας ένα νέο χειρόμορφο πρόσθετο (cyclosophoraoses) στην CE, διαχώρισαν τη T4 με χρόνους ανάλυσης πέραν των 30 λεπτών [213]. Το 2009, μια άλλη ερευνητική ομάδα από την Ισπανία, χρησιμοποιώντας μια μέθοδο που στηρίζεται στο μηχανισμό του ligand-exchange, με χειρόμορφο επιλογέα το σύστημα Cu(II)/L-proline, διαχώρισε επιτυχώς και σε μικρότερους χρόνους ανάλυσης τα δύο εναντιομερή της θυροξίνης [214]. Ωστόσο, η χρήση του συγκεκριμένου μηχανισμού οδηγεί σε χαμηλές αποδοτικότητες. Έτσι, κρίνεται αναγκαία η εύρεση μιας νέας, γρήγορης και αποτελεσματικής μεθόδου για τον εναντιομερή διαχωρισμό μιας τόσο βιολογικά σημαντικής ένωσης. Η μέθοδος, λοιπόν που προτείνεται,

περιλαμβάνει τη χρήση ILS, τα οποία θα προστεθούν μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα για τη βελτίωση του διαχωρισμού, μαζί με διάφορους CSs (CDs, INs).

4.4.1 Επίδραση του Είδους του BGE

Εξετάστηκαν διάφορα BGEs για το χειρόμορφο διαχωρισμό του DL-T4 σε ένα ευρύ φάσμα τιμών pH, ανάλογα με τη σταθερότητά τους. Αρχικά, μελετήθηκαν τα BGEs, 20 mM MES σε pH 7 και 100 mM Tris σε pH 8. Τα συγκεκριμένα BGEs αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας διάφορους CSs και πρόσθετα. Η εφαρμοζόμενη τάση ρυθμίστηκε στα 30 kV, η θερμοκρασία στους 20 °C και ο όγκος έγχυσης του δείγματος ήταν 30 mbar για 3 sec. Κανένας διαχωρισμός δεν επιτεύχθηκε σε pHs 7 και 8, ενώ παράλληλα η βασική γραμμή ήταν ασταθής και ο χρόνος μετανάστευσης πολύ μεγάλος. Ως εκ τούτου, μελετήθηκε ένα πιο βασικό BGE (100 mM Tris/10 mM Borate σε pH 8,5), στο οποίο η T4 εμφανίζει ανιονική συμπεριφορά. Παρόλο που δεν επιτεύχθηκε εναντιομερής διαχωρισμός της T4, ο συνδυασμός του Tris/Borate επιλέχθηκε ως το βέλτιστο BGE για τις περαιτέρω μελέτες, λόγω του ότι τα προβλήματα που αναφέρθηκαν πιο πάνω δεν παρατηρήθηκαν.

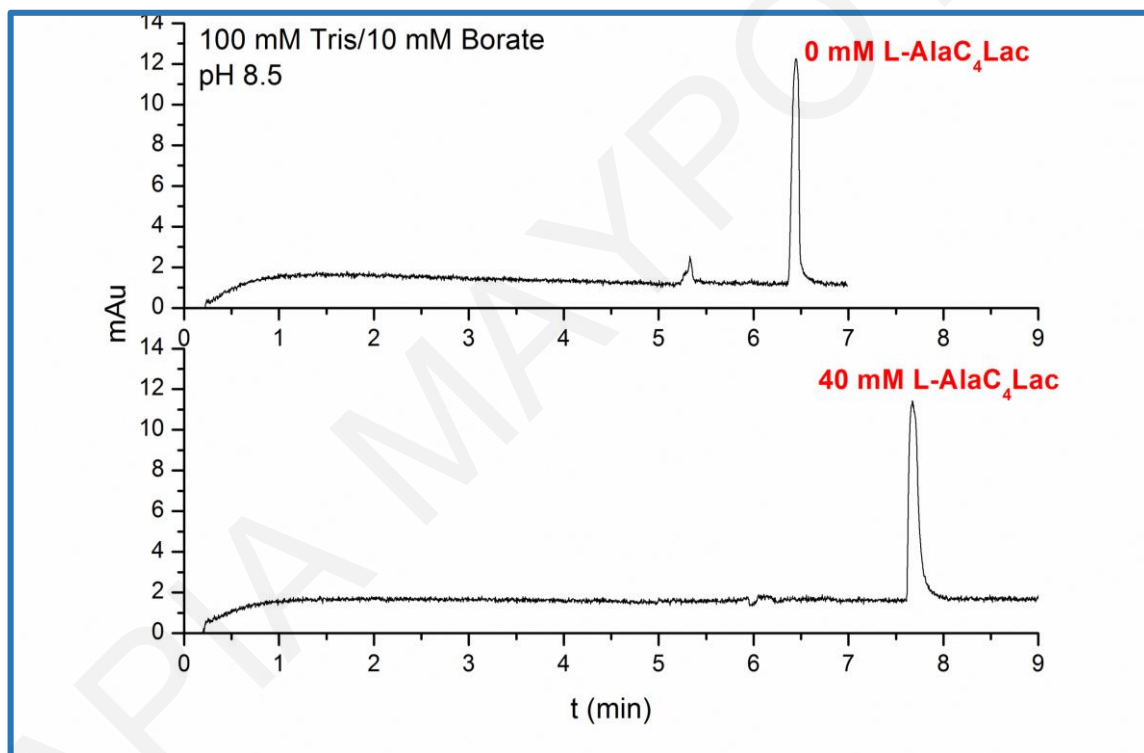
4.4.2 Χρήση των CDs για το Διαχωρισμό των Εναντιομερών της T4



Σχήμα 4.27. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν με χρήση 3% HP-β-CD σε συνδυασμό με συγκεντρώσεις 20 mM και 60 mM του L-AlaC₄Lac.

Αρχικά, μελετήθηκε ο χειρόμορφος διαχωρισμός της T4 με τη χρήση διάφορων παραγώγων της CD. Στη μελέτη αυτή δοκιμάστηκαν τέσσερις διαφορετικοί τύποι CDs. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν η TM-β-CD, η HP-β-CD, η θεικική-β-CD (Sulphated-β-CD, S-β-CD) και η HP-γ-CD σε συγκεντρώσεις από 3 έως 6%.

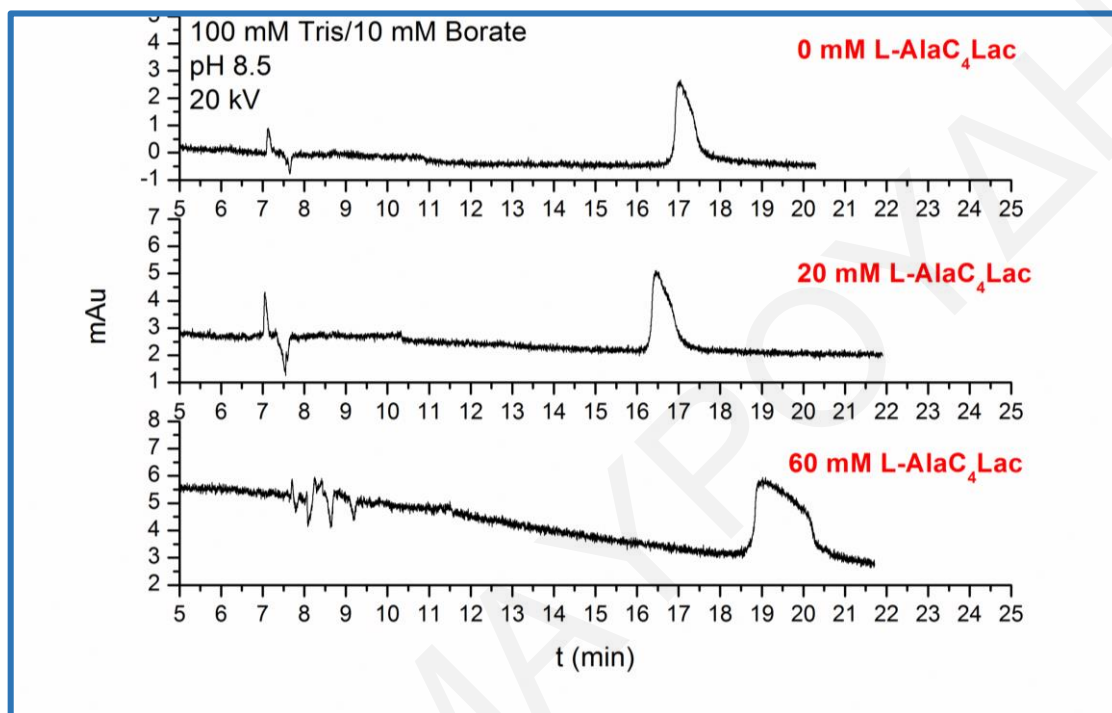
Όταν έγινε χρήση της HP-β-CD σε συγκέντρωση 3%, δεν παρατηρήθηκε καμία στοιχειώδης εναντιοεκλεκτικότητα ως προς τη T4. Συνεπώς, επιχειρήθηκε η προσθήκη 20 mM CIL, L-AlaC₄Lac στον BGE. Η συγκεκριμένη προσθήκη όμως προκάλεσε ‘tailing’ στην κορυφή της T4. Ωστόσο, περαιτέρω αύξηση στη συγκέντρωση του L-AlaC₄Lac (60 mM) έδωσε ένα μικρό ώμο με ‘tailing’ (Σχήμα 4.27).



Σχήμα 4.28. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν με χρήση 6% HP-β-CD ή/και σε συνδυασμό με συγκέντρωση 40 mM του L-AlaC₄Lac.

Ακολούθως, η συγκέντρωση του CS αυξήθηκε στο 6% και στον BGE προστέθηκαν 40 mM L-AlaC₄Lac. Με τη συγκεκριμένη προσθήκη, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.28, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση στο χρόνο μετανάστευσης της κορυφής, δείχνοντας με αυτόν τον τρόπο την αύξηση των αλληλεπιδράσεων του αναλύτη με τα πρόσθετα. Ως εκ τούτου, μελετήθηκε και η εφαρμοζόμενη τάση, μειώνοντας το δυναμικό από 30 kV σε 10 kV. Το μόνο που παρατηρήθηκε ήταν μια μικρή διεύρυνση στην κορυφή, λόγω του μεγάλου

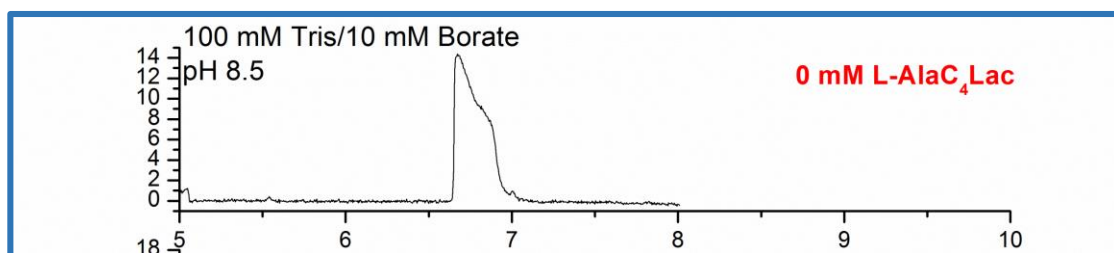
χρόνου συγκράτησης της ουσίας. Ανάλογες μελέτες πραγματοποιήθηκαν με την HP- γ -CD. Ωστόσο, το μόνο που παρατηρήθηκε ήταν το γεγονός ότι η T4 εκλουόταν σε πολύ μικρότερους χρόνους, δείχνοντας έτσι, ότι με την αύξηση του μεγέθους της κοιλότητας της CD, οι αλληλεπιδράσεις μειώνονται αισθητά.



Σχήμα 4.29. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν με χρήση 3% S- β -CD σε συνδυασμό με συγκεντρώσεις 20 mM και 60 mM του L-AlaC₄Lac εφαρμόζοντας δυναμικό 20 kV.

Όπως παρουσιάζεται στα **Σχήμα 4.29**, η S- β -CD έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με την HP- β -CD. Η μόνη διαφορά έγκειτο στο γεγονός ότι όλα τα πειράματα έπρεπε να εκτελεστούν με εφαρμογή δυναμικού μικρότερη από 30 kV, αφού στη συγκεκριμένη τιμή, λόγω και του αρνητικού φορτίου της S- β -CD, παρατηρείτο υψηλό ρεύμα.

Όσον αφορά την TM- β -CD, όταν χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 6%, παρατηρήθηκε όμως στην κορυφή (**Σχήμα 4.30**). Έγιναν διάφορες προσπάθειες μεταβάλλοντας παραμέτρους, όπως το δυναμικό, τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση του L-AlaC₄Lac, χωρίς όμως να ληφθεί κάποιο αξιόλογο αποτέλεσμα.



Σχήμα 4.30. Ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκε με χρήση 6% TM-β-CD.

4.4.3 Χρήση των INs για το Διαχωρισμό των Εναντιομερών της T4

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, μελετήθηκε η πιθανή χρήση των INs ως CS για το χειρόμορφο διαχωρισμό της T4. Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο της διατριβής αυτής, τα μόρια των συγκεκριμένων πολυσακχαριτών αποτελούνται από πολλές μονάδες σακχάρων (όπως και οι CDs) και θα μπορούσαν να προταθούν ως CSs. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις τύποι INs, οι οποίες είναι η IQ, η HD, η TEX και η Inutec SP1. Οι INs IQ και HD διαφέρουν μόνο ως προς την αναμειξιμότητά τους με το νερό. Συγκεκριμένα, η IQ παρουσιάζει εξαιρετική διαλυτότητα στο νερό (αυξημένη απορρόφηση μορίων του νερού) και περιλαμβάνει λίγο περισσότερα ελεύθερα μόρια φρουκτόζης, γλυκόζης και σακχαρόζης από την HD. Ο βαθμός πολυμερισμού και για τις δύο INs είναι 8-12. Οι INs TEX και Inutec SP1 έχουν βαθμό πολυμερισμού άνω των 23 μονομερών φρουκτόζης, αλλά όχι περισσότερα από 30 μονομερή. Η διαφορά τους έγκειται στο γεγονός ότι η Inutec SP1 είναι ημι-συνθετικό (semi-synthetic) παράγωγο της φυσικής IN που προέρχεται από το ρίζωμα του φυτού *chicory intibus*. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, η IN δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό για το σκοπό αυτό, πιθανότατα λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς της στο νερό, που έχει ως αποτέλεσμα να γίνεται δυσκολότερη η επεξεργασία της. Στην CE, δεν έχει δημοσιευτεί μέχρι σήμερα οποιαδήποτε μελέτη, στην οποία να έχει χρησιμοποιηθεί η IN ως CS. Έτσι, αποτέλεσε μεγάλη πρόκληση η περαιτέρω μελέτη της.

Οι τέσσερις διαφορετικοί τύποι INs (IQ, HD, TEX και Inutec SP1) εξετάστηκαν σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0,5% έως 4%. Ωστόσο, παρουσιάστηκαν αρκετά προβλήματα με τη διαλυτότητα των TEX και Inutec SP1 και έτσι, η χρήση τους στον BGE δεν ήταν εφικτή. Για τις υπόλοιπες INs, οι μελέτες συγκέντρωσης που πραγματοποιήθηκαν

δεν έδωσαν καμία θετική ένδειξη ότι θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως CSs. Η μόνη μεταβολή που παρατηρήθηκε ήταν η μικρή αύξηση στο χρόνο συγκράτησης.

4.4.4 Συμπεράσματα

Όλες οι πιο πάνω προσπάθειες που έγιναν, μέχρι τώρα, απέδειξαν ότι ο χειρόμορφος διαχωρισμός της T4 δεν ήταν δυνατό να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας διάφορες CDs, είτε ως οι μοναδικοί CSs στον BGE, είτε σε συνδυασμό με το L-AlaC₄Lac. Επιπρόσθετα, ο χειρόμορφος διαχωρισμός της T4 δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί ούτε με τη χρήση διάφορων παραγώγων των INs. Ως εκ τούτου, η ικανότητα των INs να δράσουν ως CSs φαίνεται να είναι αδύνατη. Ωστόσο, η συγκεκριμένη μελέτη για τον εναντιομερή διαχωρισμό της T4 παραμένει μια πρόκληση για το Εργαστήριο της Ενόργανης Ανάλυσης.

5 Γενικά Συμπεράσματα

Από τη μελέτη της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής εξήχθησαν σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με τη χρήση των AAILs και άλλων πρόσθετων στους διαχωρισμούς. Τα AAILs χρησιμοποιήθηκαν, για πρώτη φορά, στον BGE και αξιολογήθηκε η ικανότητά τους για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό των NSAIDs. Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η ικανότητα τριών AAILs για το μη εναντιομερή διαχωρισμό των NSAIDs. Τα AAILs διέφεραν ως προς τη διαμόρφωση του κατιόντος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το είδος του BGE, το pH, καθώς και η συγκέντρωση του AAIL ήταν καθοριστικοί παράγοντες για το διαχωρισμό των NSAIDs. Συνεπώς, στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι αλληλεπιδράσεις που μπορούν να αναπτυχθούν για την επίτευξη του διαχωρισμού, πιθανόν να περιλαμβάνουν στερεοχημικές παρεμποδίσεις (λόγω της τριτ-βουτυλο-ομάδας), ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (μεταξύ κατιόντος του CIL και αρνητικά φορτισμένων αναλυτών) και δεσμούς υδρογόνου (λόγω της τάσης για δεσμούς υδρογόνου της καρβοξυλικής ομάδας των 2-αρυλπροπιονικών οξέων). Ένας περιορισμός που προκύπτει από αυτή τη μελέτη, είναι η χρήση αυτών των CILs για το διαχωρισμό αρνητικά φορτισμένων αναλυτών σε $\text{pH} < 8,5$. Αξίζει να σημειωθεί ότι, το τελευταίο διάστημα, σε αρκετές μελέτες, χρησιμοποιήθηκαν AAILs, σε συνδυασμό με CSs, για την επίτευξη χειρόμορφων διαχωρισμών. Επομένως, σε αυτή τη διδακτορική διατριβή, λόγω της σημαντικότητας των εναντιομερών διαχωρισμών, κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη της χρήσης του L-AlaC₄Lac ως πρόσθετου στον BGE, ο οποίος περιέχει ένα CS (TM-β-CD), αξιολογώντας, έτσι, τη συνεργιστική τους δράση ως προς τον εναντιομερή διαχωρισμό των NSAIDs.

Η αποτελεσματικότητα του AAIL (L-AlaC₄Lac) ως πρόσθετου στο ρυθμιστικό διάλυμα αξιολογήθηκε για τον εναντιομερή προσδιορισμό των εν λόγω ενώσεων. Όπως αποδείχτηκε, το συγκεκριμένο AAIL διαδραματίζει βασικό ρόλο στον εναντιοεκλεκτικό διαχωρισμό επτά 2-αρυλπροπιονικών οξέων. Συγκεκριμένα, η προσθήκη L-AlaC₄Lac στο ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε TM-β-CD ως CS, οδήγησε στον πλήρη εναντιομερή διαχωρισμό σχεδόν όλων των αναλυτών και στη βελτίωση της αποδοτικότητας των κορυφών. Οι διαχωριστικές ικανότητες ήταν πολύ καλύτερες όταν χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός του CS με το AAIL, σε σύγκριση με την περίπτωση, στην οποία χρησιμοποιήθηκε μόνο η TM-β-CD στον BGE. Η βελτίωση αυτή υποδηλώνει την ύπαρξη συνεργιστικής δράσης μεταξύ των δύο πρόσθετων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η προσθήκη του AAIL αυξάνει τις

αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται με τους αναλύτες βελτιώνοντας, έτσι, τη διαχωριστική ικανότητα.

Εκτός από το συνδυασμό των AAILs με την TM-β-CD, μελετήθηκε η συνεργιστική τους δράση και με άλλα παράγωγα της β-CD για τον εναντιομερή διαχωρισμό όξινων αναλυτών. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή ήταν η πρώτη φορά που εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές CDs σε συνδυασμό με το AAIL, L-AlaC₄Lac, ως δυαδικά συστήματα στην CE. Όταν έγινε χρήση της TM-β-CD, η διαχωριστική ικανότητα έφτασε πάνω από 1,5 και για τους δύο αναλύτες (WAR και COU). Επιπρόσθετα, όταν χρησιμοποιήθηκε η HP-β-CD, η προσθήκη του L-AlaC₄Lac βελτίωσε σημαντικά το διαχωρισμό και των δύο αναλυτών. Οι τιμές της διαχωριστικής ικανότητας αυξήθηκαν από 0,0 στο 1,0 και 0,9 για τους αναλύτες WAR και COU, αντίστοιχα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η προσθήκη του AAIL στον BGE βελτίωσε τη διαχωριστική ικανότητα, υποδηλώνοντας έτσι, την πιθανή ανάπτυξη συνέργειας μεταξύ των CDs και του L-AlaC₄Lac. Ωστόσο, για την εξακρίβωση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται, καθώς και τη διευκρίνιση του μηχανισμού διαχωρισμού απαιτούνται περαιτέρω μελέτες. Συμπερασματικά, τα AAILs έδειξαν ότι μπορούν να λειτουργήσουν εκλεκτικά και να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με CSs, για τη βελτίωση διάφορων διαχωρισμών (χειρόμορφων και μη).

Με βάση τα πιο πάνω αποτελέσματα, τα AAILs έδειξαν ότι μπορούν να αυξήσουν την εκλεκτικότητα και την αποδοτικότητα που παρουσιάζουν διάφοροι CSs, βελτιώνοντας έτσι το διαχωρισμό. Τα AAILs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα σε κινητές φάσεις που περιέχουν CSs με μικρή εναντιοεκλεκτικότητα. Η εύκολη και γρήγορη σύνθεση τους, το γεγονός ότι βασίζονται σε φυσικά πρόδρομα μόρια (αμινοξέα και γαλακτικό οξύ) και το σχετικά χαμηλό τους κόστος, τα καθιστούν ιδανικά πρόσθετα στην CE.

Στο τελευταίο μέρος της συγκεκριμένης έρευνας, παρουσιάστηκαν μελέτες που έγιναν στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΔΙΑΚΡΑΤΙΚΕΣ/KY-POY/0713. Μελετήθηκε ο εναντιομερής διαχωρισμός της T4, με χρήση διάφορων CSs και δυαδικών συστημάτων. Επιπλέον, μελετήθηκε η ικανότητα διάφορων τύπων INs να δράσουν ως CSs στο διαχωρισμό της DL-T4. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μέχρι τώρα, έδειξαν ότι η IN και τα παράγωγά της δεν μπόρεσαν να λειτουργήσουν ως CSs τη T4 στην CE. Επιπρόσθετα, ο χειρόμορφος διαχωρισμός της T4 δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας τα δυαδικά συστήματα που μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

6 Μελλοντική Εργασία

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής εξήχθησαν κάποια σημαντικά συμπεράσματα, τα οποία οδηγούν σε νέους ερευνητικούς προβληματισμούς. Η χρήση των AAILs ως χειρόμορφων προσθέτων έδειξε ότι μπορεί να βελτιώσει τη διαχωριστική ικανότητα των χειρόμορφων διαχωρισμών, μέσω συνεργιστικής δράσης με CSs, όπως είναι οι CDs. Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των συγκεκριμένων δυαδικών συστημάτων L-AlaC₄Lac/CDs με τα εναντιομερή όξινων αναλυτών δεν έχουν διερευνηθεί. Έτσι, μελλοντικά, προτείνεται όπως μελετηθούν, με χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών, οι αλληλεπιδράσεις και ο μηχανισμός συμπλοκοποίησης των CDs με το L-AlaC₄Lac και τους ανιοντικούς αναλύτες. Για παράδειγμα, η φασματομετρία μάζας είναι ένας τρόπος διερεύνησης των συμπλόκων υποδοχέα/φιλοξενούμενο (*host/guest complexes*) [215, 216]. Η μελέτη όμως με ¹H NMR είναι, ίσως, η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη σε τέτοιες περιπτώσεις συμπλοκοποίησης. Παρόλο που έχουν γίνει αρκετές μελέτες με τις CDs ως *hosts* [79, 215-218], το συγκεκριμένο δυαδικό σύστημα δεν έχει ακόμη μελετηθεί. Συνεπώς, θα είχε μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον η πλήρης κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των CDs, των AAILs και των διάφορων εναντιομερών.

Όσον αφορά το τελευταίο μέρος της εργασίας, οι διάφοροι τύποι INs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως CSPs και να εξεταστεί η εναντιοεκλεκτική τους ικανότητα. Επιπλέον, για τον εναντιομερή διαχωρισμό της T4, θα μπορούσε να γίνει περαιτέρω διερεύνηση για εύρεση νέων CSs (π.χ. CFs και νέων πρόσθετων), που πιθανότατα να παρουσιάζουν εναντιοεκλεκτική ικανότητα ως προς τον αναλύτη αυτό.

7 Βιβλιογραφία

- [1] L.A. Nguyen, H. He, C. Pham-Huy, Chiral Drugs: An Overview, *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 2 (2006) 85-100.
- [2] C. Wolf, *Dynamic Stereochemistry of Chiral Compounds: Principles and Applications*, The Royal Society of Chemistry, (2008) 1-5.
- [3] Chiral Technology: A Global Strategic Business Report, in, *Global Industry Analysts, COMPANIES AND MARKETS.COM*, 2012.
- [4] G.K.E. Scriba, Fundamental aspects of chiral electromigration techniques and application in pharmaceutical and biomedical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 55 (2011) 688-701.
- [5] C. Li, Y. Jiang, Analysis of repaglinide enantiomers in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis using 2,6-di-o-methyl- β -cyclodextrin as a chiral selector, *J. Chromatogr. Sci.*, 50 (2012) 739-743.
- [6] B. Chankvetadze, Enantioseparation of chiral drugs and current status of electromigration techniques in this field, *J. Sep. Sci.*, 24 (2001) 691-705.
- [7] L. Valtcheva, J. Mohammad, G. Pettersson, S. Hjertén, Chiral separation of β -blockers by high-performance capillary electrophoresis based on non-immobilized cellulase as enantioselective protein, *J. Chromatogr. A*, 638 (1993) 263-267.
- [8] Z. Guo, H. Wang, Y. Zhang, Chiral separation of ketoprofen on an achiral C8 column by HPLC using norvancomycin as chiral mobile phase additives, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41 (2006) 310-314.
- [9] J. Ye, W. Yu, G. Chen, Z. Shen, S. Zeng, Enantiomeric separation of 2-arylpropionic acid nonsteroidal anti-inflammatory drugs by HPLC with hydroxypropyl- β -cyclodextrin as chiral mobile phase additive, *Biomed. Chromatogr.*, 24 (2010) 799-807.
- [10] R. Shellie, P.J. Marriott, *Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography with Fast Enantioseparation*, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 5426-5430.
- [11] J. Ding, T. Welton, D.W. Armstrong, Chiral ionic liquids as stationary phases in gas chromatography, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 6819-6822.
- [12] H.Y. Xie, Y.Z. He, Green analytical methodologies combining liquid-phase microextraction with capillary electrophoresis, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 29 (2010) 629-635.
- [13] H. Wu, B. Yuan, Y.M. Liu, Chiral capillary electrophoresis-mass spectrometry of tetrahydroisoquinoline-derived neurotoxins: Observation of complex stereoisomerism, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 3118-3123.
- [14] M.C. Mavroudi, I.J. Stavrou, C.P. Kapnissi-Christodoulou, Chiral selectors in CE: Recent developments and applications (2012-mid 2014), *Electrophoresis*, 36 (2015) 101-123.
- [15] H. Nishi, Enantiomer separation of drugs by electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A*, 735 (1996) 57-76.
- [16] K. Kalíková, M. Riesová, E. Tesařová, Recent chiral selectors for separation in HPLC and CE, *Central European Journal of Chemistry*, 10 (2012) 450-471.
- [17] J.L. Anderson, D.W. Armstrong, High-Stability Ionic Liquids. A New Class of Stationary Phases for Gas Chromatography, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 4851-4858.
- [18] J. Fliieger, A. Czajkowska-Zelazko, Comparison of chaotropic salt and ionic liquid as mobile phase additives in reversed-phase high-performance liquid chromatography of biogenic amines, *J. Sep. Sci.*, 34 (2011) 733-739.
- [19] M. Vaher, M. Borissova, M. Koel, M. Kaljurand, Ionic liquids as background electrolyte additives and coating materials in capillary electrophoresis, *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences: Chemistry*, 56 (2007) 187-198.
- [20] P.L. Laamanen, S. Busi, M. Lahtinen, R. Matilainen, A new ionic liquid dimethyldinonylammonium bromide as a flow modifier for the simultaneous determination of eight carboxylates by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1095 (2005) 164-171.
- [21] M.P. Marszał, M.J. Markuszewski, R. Kaliszan, Separation of nicotinic acid and its structural isomers using 1-ethyl-3-methylimidazolium ionic liquid as a buffer additive by capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41 (2006) 329-332.

- [22] M. Vaheer, M. Koel, M. Kaljurand, Ionic liquids as electrolytes for nonaqueous capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 23 (2002) 426-430.
- [23] M.C. Mavroudi, C.P. Kapnissi-Christodoulou, Evaluation of amino acid ester-based ionic liquids as buffer additives in CE for the separation of 2-arylpropionic acids nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Electrophoresis*, 35 (2014) 2573-2578.
- [24] M.C. Mavroudi, C.P. Kapnissi-Christodoulou, Combined use of 1-alanine tert butyl ester lactate and trimethyl- β -cyclodextrin for the enantiomeric separations of 2-arylpropionic acids nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Electrophoresis*, 36 (2015) 2442-2450.
- [25] C.P. Kapnissi-Christodoulou, M.C. Mavroudi, I.J. Stavrou, Chiral ionic liquids in chromatographic and electrophoretic separations, *J. Chromatogr. A*, 1363 (2014) 2-10.
- [26] D.W. Armstrong, L. He, Y.-S. Liu, Examination of Ionic Liquids and Their Interaction with Molecules, When Used as Stationary Phases in Gas Chromatography, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 3873-3876.
- [27] L. He, W. Zhang, L. Zhao, X. Liu, S. Jiang, Effect of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the eluent on the separation of ephedrine by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1007 (2003) 39-45.
- [28] M.J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, A. Berthod, Ionic liquids versus triethylamine as mobile phase additives in the analysis of β -blockers, *J. Chromatogr. A*, 1119 (2006) 202-208.
- [29] X. Wu, W. Wei, Q. Su, L. Xu, G. Chen, Simultaneous separation of basic and acidic proteins using 1-butyl-3-methylimidazolium-based ion liquid as dynamic coating and background electrolyte in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 29 (2008) 2356-2362.
- [30] M. Vaheer, M. Koel, J. Kazarjan, M. Kaljurand, Capillary electrophoretic analysis of neutral carbohydrates using ionic liquids as background electrolytes, *Electrophoresis*, 32 (2011) 1068-1073.
- [31] M. Borissova, K. Palk, M. Koel, Micellar electrophoresis using ionic liquids, *J. Chromatogr. A*, 1183 (2008) 192-195.
- [32] S.M. Mwangela, A. Numan, N.L. Gill, R.A. Agbaria, I.M. Warner, Separation of Achiral and Chiral Analytes Using Polymeric Surfactants with Ionic Liquids as Modifiers in Micellar Electrokinetic Chromatography, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 6089-6096.
- [33] S.M. Mwangela, N. Siminialayi, K.A. Fletcher, I.M. Warner, A comparison of ionic liquids to molecular organic solvents as additives for chiral separations in micellar electrokinetic chromatography, *J. Sep. Sci.*, 30 (2007) 1334-1342.
- [34] L. Li, H. Du, H. Yu, L. Xu, T. You, Application of ionic liquid as additive in determination of three β -agonists by capillary electrophoresis with amperometric detection, *Electrophoresis*, 34 (2013) 277-283.
- [35] Y. Cui, X. Ma, M. Zhao, Z. Jiang, S. Xu, X. Guo, Combined Use of Ionic Liquid and Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin for the Enantioseparation of Ten Drugs by Capillary Electrophoresis, *Chirality*, 25 (2013) 409-414.
- [36] J. Zhang, Y. Du, Q. Zhang, J. Chen, G. Xu, T. Yu, X. Hua, Investigation of the synergistic effect with amino acid-derived chiral ionic liquids as additives for enantiomeric separation in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1316 (2013) 119-126.
- [37] L. Zuo, H. Meng, J. Wu, Z. Jiang, S. Xu, X. Guo, Combined use of ionic liquid and β -CD for enantioseparation of 12 pharmaceuticals using CE, *J. Sep. Sci.*, 36 (2013) 517-523.
- [38] Q. Zhang, Y. Du, Evaluation of the enantioselectivity of glycogen-based synergistic system with amino acid chiral ionic liquids as additives in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1306 (2013) 97-103.
- [39] J. Zhang, Y. Du, Q. Zhang, Y. Lei, Evaluation of vancomycin-based synergistic system with amino acid ester chiral ionic liquids as additives for enantioseparation of non-steroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis, *Talanta*, 119 (2014) 193-201.
- [40] T. Kosjek, E. Heath, A. Krbavčič, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples, *Environ. Int.*, 31 (2005) 679-685.
- [41] D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance, *Environ. Sci. Technol.*, 36 (2002) 1202-1211.

- [42] A.C. Alonso, T. Zaidi, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91 (1994) 5562-5566.
- [43] J. Gal, Louis Pasteur, language, and molecular chirality. I. Background and Dissymmetry, *Chirality*, 23 (2011) 1-16.
- [44] R.S. Cahn, C. Ingold, V. Prelog, Specification of Molecular Chirality, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 5 (1966) 385-415.
- [45] V. Prelog, G. Helmchen, Basic Principles of the CIP-System and Proposals for a Revision, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 21 (1982) 567-583.
- [46] T.H. Donald, L. Bingyun, Chiral Drug Separation, in: *Encyclopedia of Chemical Processing*, Taylor & Francis, 2007, pp. 449-458.
- [47] <http://www.companiesandmarkets.com>, Bright outlook for the global chiral technology market, in: *Chiral Technology: A Global Strategic Business Report*, Global Industry Analysts, 2012.
- [48] E.J. Ariëns, Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 26 (1984) 663-668.
- [49] B. Waldeck, Three-Dimensional Pharmacology, a Subject Ranging from Ignorance to Overstatements, *Pharmacol. Toxicol.*, 93 (2003) 203-210.
- [50] B. Waldeck, Biological significance of the enantiomeric purity of drugs, *Chirality*, 5 (1993) 350-355.
- [51] S. Fabro, R.L. Smith, R.T. Williams, Toxicity and Teratogenicity of Optical Isomers of Thalidomide, *Nature*, 215 (1967) 296-296.
- [52] D.F. Smith, The Stereoselectivity of Drug Action, *Pharmacol. Toxicol.*, 65 (1989) 321-331.
- [53] T. Eriksson, S. Björkman, B. Roth, Å. Fyge, P. Höglund, Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide, *Chirality*, 7 (1995) 44-52.
- [54] T. Eriksson, S. Björkman, P. Höglund, Clinical pharmacology of thalidomide, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 57 (2001) 365-376.
- [55] S. Wnendt, M. Finkam, W. Winter, J. Ossig, G. Raabe, K. Zwingenberger, Enantioselective inhibition of TNF- α release by thalidomide and thalidomide-analogues, *Chirality*, 8 (1996) 390-396.
- [56] A. Van Eeckhaut, Y. Michotte, Pharmacological importance of chiral separations, in: *Chiral Separations by Capillary Electrophoresis*, CRC Press, 2009, pp. 1-23.
- [57] S. Björkman, Determination of the enantiomers of indoprofen in blood plasma by high-performance liquid chromatography after rapid derivatization by means of ethyl chloroformate, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 339 (1985) 339-346.
- [58] A.M. Evans, Comparative Pharmacology of S(+)-Ibuprofen and (RS)-Ibuprofen, *Clin. Rheumatol.*, 20 (2001) 9-14.
- [59] J. Hou, J. Zheng, S.A. Shamsi, Separation and determination of warfarin enantiomers in human plasma using a novel polymeric surfactant for micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1159 (2007) 208-216.
- [60] W.F. Young, C.A. Gorman, N.-S. Jiang, D. Machacek, I.D. Hay, L-Thyroxine contamination of pharmaceutical D-thyroxine: Probable cause of therapeutic effect, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 36 (1984) 781-787.
- [61] FDA'S policy statement for the development of new stereoisomeric drugs, in: *Chirality*, Alan R. Liss, Inc., 1992, pp. 338-340.
- [62] J.E. Rekoske, Chiral separations, *AIChE J.*, 47 (2001) 2-5.
- [63] V. Schurig, Chiral separations using gas chromatography, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21 (2002) 647-661.
- [64] T.J. Ward, K.D. Ward, Chiral Separations: Fundamental Review 2010, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 4712-4722.
- [65] T.E. Beesley, R.P.W. Scott, The mechanism of solute retention, in: *Chiral Chromatography*, Wiley, 1998, pp. 29-52.
- [66] B. Chankvetadze, *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, Wiley, 1997.

- [67] L.H. Easson, E. Stedman, Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action: Molecular dissymmetry and physiological activity, *Biochem. J.*, 27 (1933) 1257-1266.
- [68] V.A. Davankov, The nature of chiral recognition: Is it a three-point interaction?, *Chirality*, 9 (1997) 99-102.
- [69] A. Berthod, Chiral recognition mechanisms, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 2093-2099.
- [70] X. Zhang, C. Zhang, G. Sun, X. Xu, Y. Tan, H. Wu, R. Cao, J. Liu, J. Wu, Cyclodextrins and their derivatives in the resolution of chiral natural products: A review, *Instrum Sci. Technol.*, 40 (2012) 194-215.
- [71] L. Song, Z. Guo, Y. Chen, Separation and determination of chiral composition in penicillamine tablets by capillary electrophoresis in a broad pH range, *Electrophoresis*, 33 (2012) 2056-2063.
- [72] L. Sánchez-Hernández, N.S. Serra, M.L. Marina, A.L. Crego, Enantiomeric separation of free l - And d -amino acids in hydrolyzed protein fertilizers by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food. Chem.*, 61 (2013) 5022-5030.
- [73] P. Řezanka, H. Ryšavá, M. Havlík, M. Jakubek, D. Sýkora, V. Král, Enantioseparation of tröger's base derivatives by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors, *Chirality*, 25 (2013) 379-383.
- [74] P. Řezanka, D. Sýkora, M. Novotný, M. Havlík, V. Král, Nonaqueous capillary electrophoretic enantioseparation of water insoluble tröger's base derivatives using β -cyclodextrin as chiral selector, *Chirality*, 25 (2013) 810-813.
- [75] C.A. Hadjistasi, I.J. Stavrou, R.I. Stefan-Van Staden, H.Y. Aboul-Enein, C.P. Kapnissi-Christodoulou, Chiral separation of the clinically important compounds fucose and pipercolic acid using ce: Determination of the most effective chiral selector, *Chirality*, 25 (2013) 556-560.
- [76] A.R. Fakhari, H. Tabani, S. Nojavan, H. Abedi, Electromembrane extraction combined with cyclodextrin-modified capillary electrophoresis for the quantification of trimipramine enantiomers, *Electrophoresis*, 33 (2012) 506-515.
- [77] S.M. El-Gizawy, O.H. Abdelmageed, S.M. Derayea, M.A. Omar, A.M. Abdel-Megied, Chiral separation of perindopril erbumine enantiomers using high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, *Analytical Methods*, 6 (2014) 825-830.
- [78] E. Sánchez-López, A. Salgado, A.L. Crego, M.L. Marina, Investigation on the enantioseparation of duloxetine by capillary electrophoresis, NMR, and mass spectrometry, *Electrophoresis*, 35 (2014) 2842-2847.
- [79] S. Samakashvili, A. Salgado, G.K.E. Scriba, B. Chankvetadze, Comparative enantioseparation of ketoprofen with trimethylated α -, β -, and γ -cyclodextrins in capillary electrophoresis and study of related selector-selectand interactions using nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Chirality*, 25 (2013) 79-88.
- [80] M. Kawamura, T. Uchiyama, T. Kuramoto, Y. Tamura, K. Mizutani, Formation of a cyclinulooligosaccharide from inulin by an extracellular enzyme of *Bacillus circulans* OKUMZ 31B, *Carbohydr. Res.*, 192 (1989) 83-90.
- [81] M. Kawamura, T. Uchiyama, Purification and some properties of cyclinulooligosaccharide fructanotransferase from *Bacillus circulans* OKUMZ 31B, *Carbohydr. Res.*, 260 (1994) 297-304.
- [82] M. Sawada, Y. Takai, M. Shizuma, T. Takeda, H. Adachi, T. Uchiyama, Measurement of chiral amino acid discrimination by cyclic oligosaccharides: a direct FAB mass spectrometric approach, *Chem. Commun.*, (1998) 1453-1454.
- [83] P. Sun, C. Wang, Z.S. Breitbach, Y. Zhang, D.W. Armstrong, Development of New HPLC Chiral Stationary Phases Based on Native and Derivatized Cyclofructans, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 10215-10226.
- [84] P. Sun, C. Wang, N.L.T. Padivitage, Y.S. Nanayakkara, S. Perera, H. Qiu, Y. Zhang, D.W. Armstrong, Evaluation of aromatic-derivatized cyclofructans 6 and 7 as HPLC chiral selectors, *Analyst*, 136 (2011) 787-800.
- [85] C. Wang, P. Sun, D. Armstrong, Cyclofructans, a New Class of Chiral Stationary Phases, in: A. Berthod (Ed.) *Chiral Recognition in Separation Methods*, Springer Berlin Heidelberg, 2010, pp. 77-96.

- [86] A. Aranyi, A. Bagi, I. Ilisz, Z. Pataj, F. Fülöp, D.W. Armstrong, A. Péter, High-performance liquid chromatographic enantioseparation of amino compounds on newly developed cyclofructan-based chiral stationary phases, *J. Sep. Sci.*, 35 (2012) 617-624.
- [87] T. Gondová, J. Petrovaj, P. Kutschy, D.W. Armstrong, Stereoselective separation of spiroindoline phytoalexins on R-naphthylethyl cyclofructan 6-based chiral stationary phase, *J. Chromatogr. A*, 1272 (2013) 100-105.
- [88] Y. Shu, Z.S. Breitbach, M.K. Dissanayake, S. Perera, J.M. Aslan, N. Alatrash, F.M. MacDonnell, D.W. Armstrong, Enantiomeric Separations of Ruthenium (II) Polypyridyl Complexes Using HPLC With Cyclofructan Chiral Stationary Phases, *Chirality*, 27 (2015) 64-70.
- [89] J. Vozka, K. Kalíková, L. Janečková, D.W. Armstrong, E. Tesařová, Chiral HPLC Separation on Derivatized Cyclofructan Versus Cyclodextrin Stationary Phases, *Analytical Letters*, 45 (2012) 2344-2358.
- [90] R.M. Woods, D.C. Patel, Y. Lim, Z.S. Breitbach, H. Gao, C. Keene, G. Li, L. Kürti, D.W. Armstrong, Enantiomeric separation of biaryl atropisomers using cyclofructan based chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A*, 1357 (2014) 172-181.
- [91] C. Jiang, M.-Y. Tong, Z.S. Breitbach, D.W. Armstrong, Synthesis and examination of sulfated cyclofructans as a novel class of chiral selectors for CE, *Electrophoresis*, 30 (2009) 3897-3909.
- [92] Y.J. Zhang, M.X. Huang, Y.P. Zhang, D.W. Armstrong, Z.S. Breitbach, J.J. Ryoo, Use of sulfated cyclofructan 6 and sulfated cyclodextrins for the chiral separation of four basic pharmaceuticals by capillary electrophoresis, *Chirality*, 25 (2013) 735-742.
- [93] S. Perera, Y.-C. Na, T. Doundoulakis, V.J. Ngo, Q. Feng, Z.S. Breitbach, C.J. Lovely, D.W. Armstrong, The Enantiomeric Separation of Tetrahydrobenzimidazoles Cyclodextrins- and Cyclofructans, *Chirality*, 25 (2013) 133-140.
- [94] V. Maier, K. Kalíková, A. Příbylka, J. Vozka, J. Smuts, M. Švidrnoch, J. Ševčík, D.W. Armstrong, E. Tesařová, Isopropyl derivative of cyclofructan 6 as chiral selector in liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1338 (2014) 197-200.
- [95] S. Immel, G.E. Schmitt, F.W. Lichtenthaler, Cyclofructins with six to ten β -(1 \rightarrow 2)-linked fructofuranose units: Geometries, electrostatic profiles, lipophilicity patterns, and potential for inclusion complexation, *Carbohydr. Res.*, 313 (1998) 91-105.
- [96] Y. Zhang, Z.S. Breitbach, C. Wang, D.W. Armstrong, The use of cyclofructans as novel chiral selectors for gas chromatography, *Analyst*, 135 (2010) 1076-1083.
- [97] J. Wang, I.M. Warner, Chiral Separations Using Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography and a Polymerized Chiral Micelle, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 3773-3776.
- [98] E. Billiot, S. Thibodeaux, S. Shamsi, I.M. Warner, Evaluating Chiral Separation Interactions by Use of Diastereomeric Polymeric Dipeptide Surfactants, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 4044-4049.
- [99] S.A. Shamsi, J. Macossay, I.M. Warner, Improved Chiral Separations Using a Polymerized Dipeptide Anionic Chiral Surfactant in Electrokinetic Chromatography: Separations of Basic, Acidic, and Neutral Racemates, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 2980-2987.
- [100] J. He, S.A. Shamsi, Application of polymeric surfactants in chiral micellar electrokinetic chromatography (CMEKC) and CMEKC coupled to mass spectrometry, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 970 (2013) 319-348.
- [101] D.A. Tsioupi, R.I. Stefan-van Staden, C.P. Kapnissi-Christodoulou, Chiral selectors in CE: Recent developments and applications, *Electrophoresis*, 34 (2013) 178-204.
- [102] D.A. Tsioupi, I.N. Nicolaou, L. Moore, C.P. Kapnissi-Christodoulou, Chiral separation of Huperzine A using CE - Method validation and application in pharmaceutical formulations, *Electrophoresis*, 33 (2012) 516-522.
- [103] S. Dixit, J.H. Park, Application of antibiotics as chiral selectors for capillary electrophoretic enantioseparation of pharmaceuticals: A review, *Biomed. Chromatogr.*, 28 (2014) 10-26.
- [104] I. Ilisz, Z. Pataj, A. Aranyi, A. Péter, Macrocyclic antibiotic selectors in direct HPLC enantioseparations, *Separation and Purification Reviews*, 41 (2012) 207-249.
- [105] E. Domínguez-Vega, V. Pérez-Fernández, A.L. Crego, M.Á. García, M.L. Marina, Recent advances in CE analysis of antibiotics and its use as chiral selectors, *Electrophoresis*, 35 (2014) 28-49.

- [106] Z. Wang, C. Mu, J. Kang, Z. Hu, Separation and determination of stereoisomeric impurity of folinic acid diastereomers by CE with vancomycin as a selector, *Chromatographia*, 75 (2012) 1211-1215.
- [107] Y. Okamoto, J. Noguchi, E. Yashima, Enantioseparation on 3,5-dichloro- and 3,5-dimethylphenylcarbamates of polysaccharides as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography, *Reactive and Functional Polymers*, 37 (1998) 183-188.
- [108] T. Kubota, C. Yamamoto, Y. Okamoto, Preparation of chiral stationary phase for HPLC based on immobilization of cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate derivatives on silica gel, *Chirality*, 15 (2003) 77-82.
- [109] H. Nishi, Enantioselectivity in chiral capillary electrophoresis with polysaccharides, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 327-347.
- [110] E. Francotte, A. Junker-Buchheit, Preparative chromatographic separation of enantiomers, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 576 (1992) 1-45.
- [111] Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada, Chromatographic resolution : XI. Controlled chiral recognition of cellulose triphenylcarbamate derivatives supported on silica gel, *J. Chromatogr. A*, 363 (1986) 173-186.
- [112] Y. Okamoto, Y. Kaida, Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A*, 666 (1994) 403-419.
- [113] A. D'Hulst, N. Verbeke, Chiral separation by capillary electrophoresis with oligosaccharides, *J. Chromatogr. A*, 608 (1992) 275-287.
- [114] A.M. Stalcup, N.M. Agyei, Heparin: A Chiral Mobile-Phase Additive for Capillary Zone Electrophoresis, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 3054-3059.
- [115] H. Nishi, Y. Kuwahara, Enantiomer separation by capillary electrophoresis utilizing noncyclic mono-, oligo- and polysaccharides as chiral selectors, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 48 (2001) 89-102.
- [116] H. Nishi, Y. Kuwahara, Enantiomer separation by capillary electrophoresis utilizing carboxymethyl derivatives of polysaccharides as chiral selectors, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 27 (2002) 577-585.
- [117] H.L. Chum, V.R. Koch, L.L. Miller, R.A. Osteryoung, Electrochemical scrutiny of organometallic iron complexes and hexamethylbenzene in a room temperature molten salt, *J. Am. Chem. Soc.*, 97 (1975) 3264-3265.
- [118] J.G. Huddleston, A.E. Visser, W.M. Reichert, H.D. Willauer, G.A. Broker, R.D. Rogers, Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation, *Green Chemistry*, 3 (2001) 156-164.
- [119] J. Dupont, C.S. Consorti, P.A.Z. Suarez, R.F. de Souza, Preparation of 1-Butyl-3-Methyl Imidazolium-Based Room Temperature Ionic Liquids, in: *Organic Syntheses*, John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- [120] D. Han, K.H. Row, Recent applications of ionic liquids in separation technology, *Molecules*, 15 (2010) 2405-2426.
- [121] T.D. Ho, C. Zhang, L.W. Hantao, J.L. Anderson, Ionic Liquids in Analytical Chemistry: Fundamentals, Advances, and Perspectives, *Anal. Chem.*, 86 (2013) 262-285.
- [122] J.L. Anderson, J. Ding, T. Welton, D.W. Armstrong, Characterizing Ionic Liquids On the Basis of Multiple Solvation Interactions, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 14247-14254.
- [123] K.R. Seddon, A. Stark, M.J. Torres, Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids, *Pure Appl. Chem.*, 72 (2000) 2275-2287.
- [124] M.J. Earle, K.R. Seddon, Ionic liquids. Green solvents for the future, *Pure Appl. Chem.*, 72 (2000) 1391-1398.
- [125] D. Holbrey John, B. Turner Megan, D. Rogers Robin, Selection of Ionic Liquids for Green Chemical Applications, in: *Ionic Liquids as Green Solvents*, American Chemical Society, 2003, pp. 2-12.
- [126] P. Wasserscheid, J. Joni, Green Organic Synthesis in Ionic Liquids, in: *Handbook of Green Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010.

- [127] D. Zhao, M. Wu, Y. Kou, E. Min, Ionic liquids: applications in catalysis, *Catal. Today*, 74 (2002) 157-189.
- [128] Z. Wang, P. Lin, G.A. Baker, J. Stetter, X. Zeng, Ionic Liquids as Electrolytes for the Development of a Robust Amperometric Oxygen Sensor, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 7066-7073.
- [129] C. Yao, T. Li, P. Twu, W.R. Pitner, J.L. Anderson, Selective extraction of emerging contaminants from water samples by dispersive liquid-liquid microextraction using functionalized ionic liquids, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 1556-1566.
- [130] J. G. Huddleston, R. D. Rogers, Room temperature ionic liquids as novel media for 'clean' liquid-liquid extraction, *Chem. Commun.*, (1998) 1765-1766.
- [131] Y.L. Li, M.L. Gross, Ionic-liquid matrices for quantitative analysis by MALDI-TOF mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15 (2004) 1833-1837.
- [132] J.M. Earle, R.K. Seddon, J.C. Adams, G. Roberts, Friedel-Crafts reactions in room temperature ionic liquids, *Chem. Commun.*, (1998) 2097-2098.
- [133] I. Meracz, T. Oh, Asymmetric Diels-Alder reactions in ionic liquids, *Tetrahedron Lett.*, 44 (2003) 6465-6468.
- [134] R.P. Swatloski, J.D. Holbrey, R.D. Rogers, Ionic liquids are not always green: hydrolysis of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, *Green Chemistry*, 5 (2003) 361-363.
- [135] S. Hu, X. Zhang, M. Xu, S. Li, Application of ionic liquids in biomass utilization, *Progress in Chemistry*, 23 (2011) 731-738.
- [136] A. Berthod, M.J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, Ionic liquids in separation techniques, *J. Chromatogr. A*, 1184 (2008) 6-18.
- [137] C.F. Poole, S.K. Poole, Ionic liquid stationary phases for gas chromatography, *J. Sep. Sci.*, 34 (2011) 888-900.
- [138] Y. Wang, M. Tian, W. Bi, K.H. Row, Application of Ionic Liquids in High Performance Reversed-Phase Chromatography, *Int. J. Mol. Sci.*, 10 (2009) 2591-2610.
- [139] Q. Wang, G.A. Baker, S.N. Baker, L.A. Colon, Surface confined ionic liquid as a stationary phase for HPLC, *Analyst*, 131 (2006) 1000-1005.
- [140] H. Han, J. Li, X. Wang, X. Liu, S. Jiang, Synthesis of ionic liquid-bonded organic-silica hybrid monolithic column for capillary electrochromatography, *J. Sep. Sci.*, 34 (2011) 2323-2328.
- [141] L. Yu, W. Qin, S.F.Y. Li, Ionic liquids as additives for separation of benzoic acid and chlorophenoxy acid herbicides by capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta*, 547 (2005) 165-171.
- [142] H.-L. Su, W.-C. Kao, K.-W. Lin, C.-y. Lee, Y.-Z. Hsieh, 1-Butyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids and an anionic surfactant: Excellent background electrolyte modifiers for the analysis of benzodiazepines through capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 2973-2979.
- [143] E.G. Yanes, S.R. Gratz, M.J. Baldwin, S.E. Robison, A.M. Stalcup, Capillary Electrophoretic Application of 1-Alkyl-3-methylimidazolium-Based Ionic Liquids, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 3838-3844.
- [144] L. Huang, J.-M. Lin, L. Yu, L. Xu, G. Chen, Improved simultaneous enantioseparation of β -agonists in CE using β -CD and ionic liquids, *Electrophoresis*, 30 (2009) 1030-1036.
- [145] Y. François, A. Varenne, J. Sirieix-Plenet, P. Gareil, Determination of aqueous inclusion complexation constants and stoichiometry of alkyl(methyl)-methylimidazolium-based ionic liquid cations and neutral cyclodextrins by affinity capillary electrophoresis, *J. Sep. Sci.*, 30 (2007) 751-760.
- [146] B. Ni, Q. Zhang, A.D. Headley, Functionalized chiral ionic liquid as recyclable organocatalyst for asymmetric Michael addition to nitrostyrenes, *Green Chem.*, 9 (2007) 737-739.
- [147] M. Vasiliou, S. Leder, P. Gaertner, K. Mereiter, K. Bica, Coordinating chiral ionic liquids, *Org. Biomol. Chem.*, 11 (2013) 8092-8102.
- [148] W.-H. Wang, X.-B. Wang, K. Kodama, T. Hirose, G.-Y. Zhang, Novel chiral ammonium ionic liquids as efficient organocatalysts for asymmetric Michael addition of aldehydes to nitroolefins, *Tetrahedron*, 66 (2010) 4970-4976.
- [149] F. Tang, Q. Zhang, D. Ren, Z. Nie, Q. Liu, S. Yao, Functional amino acid ionic liquids as solvent and selector in chiral extraction, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 4669-4674.

- [150] H. Meng, S. Li, L. Xiao, C. Li, Functionalized assembly of solid membranes for chiral separation using polyelectrolytes and chiral ionic liquid, *AIChE J.*, 59 (2013) 4772-4779.
- [151] D.K. Bwambok, H.M. Marwani, V.E. Fernand, S.O. Fakayode, M. Lowry, I. Negulescu, R.M. Strongin, I.M. Warner, Synthesis and characterization of novel chiral ionic liquids and investigation of their enantiomeric recognition properties, *Chirality*, 20 (2008) 151-158.
- [152] M.B. Foreiter, H.Q.N. Gunaratne, P. Nockemann, K.R. Seddon, G. Srinivasan, Novel chiral ionic liquids: Physicochemical properties and investigation of the internal rotameric behaviour in the neat system, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16 (2014) 1208-1226.
- [153] S.L. De Rooy, M. Li, D.K. Bwambok, B. El-Zahab, S. Challa, I.M. Warner, Ephedrinium-based protic chiral ionic liquids for enantiomeric recognition, *Chirality*, 23 (2011) 54-62.
- [154] C.D. Tran, D. Oliveira, S. Yu, Chiral ionic liquid that functions as both solvent and chiral selector for the determination of enantiomeric compositions of pharmaceutical products, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 1349-1356.
- [155] C.D. Tran, D. Oliveira, Fluorescence determination of enantiomeric composition of pharmaceuticals via use of ionic liquid that serves as both solvent and chiral selector, *Anal. Biochem.*, 356 (2006) 51-58.
- [156] D.K. Bwambok, S.K. Challa, M. Lowry, I.M. Warner, Amino Acid-Based Fluorescent Chiral Ionic Liquid for Enantiomeric Recognition, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 5028-5037.
- [157] L.M. Yuan, Y. Han, Y. Zhou, X. Meng, Z. Li, M. Zi, Y. Chang, (R)-N,N,N-trimethyl-2-aminobutanol-bis(trifluoromethane-sulfon)imidate chiral ionic liquid used as chiral selector in HPCE, HPLC, and CGC, *Anal. Lett.*, 39 (2006) 1439-1449.
- [158] N. Costa, S. Matos, M.D.R.G. Da Silva, M.M.A. Pereira, Cyclodextrin-based ionic liquids as enantioselective stationary phases in gas chromatography, *ChemPlusChem*, 78 (2013) 1466-1474.
- [159] X. Sun, J. Xu, X. Zhao, Y. Zhai, J. Xing, Study of chiral ionic liquid as stationary phases for GC, *Chromatographia*, 76 (2013) 1013-1019.
- [160] Q. Liu, K. Wu, F. Tang, L. Yao, F. Yang, Z. Nie, S. Yao, Amino Acid Ionic Liquids as Chiral Ligands in Ligand-Exchange Chiral Separations, *Chemistry – A European Journal*, 15 (2009) 9889-9896.
- [161] H. Zhang, L. Qi, Y. Shen, J. Qiao, L. Mao, L-Lysine-derived ionic liquids as chiral ligands of Zn(II) complexes used in ligand-exchange CE, *Electrophoresis*, 34 (2013) 846-853.
- [162] X. Mu, L. Qi, H. Zhang, Y. Shen, J. Qiao, H. Ma, Ionic liquids with amino acids as cations: Novel chiral ligands in chiral ligand-exchange capillary electrophoresis, *Talanta*, 97 (2012) 349-354.
- [163] B. Sun, X. Mu, L. Qi, Development of new chiral ligand exchange capillary electrophoresis system with amino acid ionic liquids ligands and its application in studying the kinetics of l-amino acid oxidase, *Anal. Chim. Acta*, 821 (2014) 97-102.
- [164] C.D. Tran, I. Mejac, Chiral ionic liquids for enantioseparation of pharmaceutical products by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1204 (2008) 204-209.
- [165] Z. Ma, L. Zhang, L. Lin, P. Ji, X. Guo, Enantioseparation of rabeprazole and omeprazole by nonaqueous capillary electrophoresis with an ephedrine-based ionic liquid as the chiral selector, *Biomed. Chromatogr.*, 24 (2010) 1332-1337.
- [166] J. Yu, L. Zuo, H. Liu, L. Zhang, X. Guo, Synthesis and application of a chiral ionic liquid functionalized β -cyclodextrin as a chiral selector in capillary electrophoresis, *Biomed. Chromatogr.*, 27 (2013) 1027-1033.
- [167] Y. François, A. Varenne, E. Juillerat, D. Villemin, P. Gareil, Evaluation of chiral ionic liquids as additives to cyclodextrins for enantiomeric separations by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1155 (2007) 134-141.
- [168] B. Wang, J. He, V. Bianchi, S.A. Shamsi, Combined use of chiral ionic liquid and cyclodextrin for MEKC: Part I. Simultaneous enantioseparation of anionic profens, *Electrophoresis*, 30 (2009) 2812-2819.
- [169] B. Wang, J. He, V. Bianchi, S.A. Shamsi, Combined use of chiral ionic liquid and CD for MEKC: Part II. Determination of binding constants, *Electrophoresis*, 30 (2009) 2820-2828.

- [170] M. Zhao, Y. Cui, J. Yu, S. Xu, X. Guo, Combined use of hydroxypropyl- β -cyclodextrin and ionic liquids for the simultaneous enantioseparation of four azole antifungals by CE and a study of the synergistic effect, *J. Sep. Sci.*, 37 (2014) 151-157.
- [171] G.-h. Tao, L. He, N. Sun, Y. Kou, New generation ionic liquids: cations derived from amino acids, *Chem. Commun.*, (2005) 3562-3564.
- [172] G.-h. Tao, L. He, W.-s. Liu, L. Xu, W. Xiong, T. Wang, Y. Kou, Preparation, characterization and application of amino acid-based green ionic liquids, *Green Chemistry*, 8 (2006) 639-646.
- [173] T. Payagala, D.W. Armstrong, Chiral ionic liquids: A compendium of syntheses and applications (2005–2012), *Chirality*, 24 (2012) 17-53.
- [174] S.M. Masselter, A.J. Zemmann, Influence of organic solvents in coelectroosmotic capillary electrophoresis of phenols, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1047-1053.
- [175] S. Li, J.S. Fritz, Organic modifiers for the separation of organic acids and bases by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 964 (2002) 91-98.
- [176] J. Iredale, A.F. Aubry, I. Wainer, The effects of pH and alcoholic organic modifiers on the direct separation of some acidic, basic and neutral compounds on a commercially available ovomucoid column, *Chromatographia*, 31 (1991) 329-334.
- [177] L. Zhao, P. Ai, A.-H. Duan, L.-M. Yuan, Single-walled carbon nanotubes for improved enantioseparations on a chiral ionic liquid stationary phase in GC, *Anal. Bioanal. Chem.*, 399 (2011) 143-147.
- [178] Y.X. Yang, J. Li, X.Y. Jiang, Chiral ionic liquids as chiral selectors for separation of tryptophan enantiomers by ligand exchange chromatography, *J. Cent. South Univ.*, 20 (2013) 1173-1177.
- [179] H. Qing, X. Jiang, J. Yu, Separation of tryptophan enantiomers by ligand-exchange chromatography with novel chiral ionic liquids ligand, *Chirality*, 26 (2014) 160-165.
- [180] P. Kodali, A.M. Stalcup, Normal phase chiral separation of hexahelicene isomers using a chiral surface confined ionic liquid stationary phase, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, 37 (2014) 893-906.
- [181] Z. Zhou, X. Li, X. Chen, X. Hao, Synthesis of ionic liquids functionalized β -cyclodextrin-bonded chiral stationary phases and their applications in high-performance liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta*, 678 (2010) 208-214.
- [182] X. Mu, L. Qi, H. Zhang, Y. Shen, J. Qiao, H. Ma, Ionic liquids with amino acids as cations: Novel chiral ligands in chiral ligand-exchange capillary electrophoresis, *Talanta*, 97 (2012) 349-354.
- [183] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, Principles of instrumental analysis, Saunders College Pub., 1998.
- [184] D.N. Heiger, High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction, 2 ed., Hewlett-Packard Company France, 1992.
- [185] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1298-1302.
- [186] E. Köpke, Y.C. Tung, S. Shaikh, A.C. Alonso, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease, *J. Biol. Chem.*, 268 (1993) 24374-24384.
- [187] J.P. Landers, Handbook of Capillary Electrophoresis, Second Edition, Taylor & Francis, 1996.
- [188] H. Lodén, Y. Hedeland, M. Hedeland, U. Bondesson, C. Pettersson, Development of a chiral non-aqueous capillary electrophoretic system using the partial filling technique with UV and mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A*, 986 (2003) 143-152.
- [189] D.N. Heiger, High performance capillary electrophoresis: an introduction : a primer, Agilent Technologies, 2000.
- [190] R. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn, Capillary Electrophoresis: Principles and Practice, Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [191] L. Holland, N. Chetwyn, M. Perkins, S. Lunte, Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis, *Pharmaceutical Research*, 14 (1997) 372-387.
- [192] C.K. Lim, S. F. Y. Li Capillary Electrophoresis—Principles, Practice and Applications, *Journal of Chromatography Library*, Vol. 52 Elsevier, Amsterdam, 1992; 582+XXVI pp., Dfl. 395, ISBN 044-89433-0, *J. Appl. Toxicol.*, 13 (1993) 305-305.

- [193] S. Terabe, Micellar electrokinetic chromatography for high-performance analytical separation, *The Chemical Record*, 8 (2008) 291-301.
- [194] S. Terabe, Capillary Separation: Micellar Electrokinetic Chromatography, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2 (2009) 99-120.
- [195] S. Terabe, Twenty-five years of micellar electrokinetic chromatography, *Procedia Chemistry*, 2 (2010) 2-8.
- [196] C.C.W.S.A. Shamsi, I.M. Warner, Chiral micelle polymers for chiral separations in capillary electrophoresis, *Adv. Chromatogr.*, 37 (1997) 363.
- [197] G. Gübitz, M.G. Schmid, Recent advances in chiral separation principles in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 25 (2004) 3981-3996.
- [198] C.P. Kapnissi-Christodoulou, X. Zhu, I.M. Warner, Analytical separations in open-tubular capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 24 (2003) 3917-3934.
- [199] S. Eeltink, G.P. Rozing, W.T. Kok, Recent applications in capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 24 (2003) 3935-3961.
- [200] C.P. Kapnissi, C. Akbay, J.B. Schlenoff, I.M. Warner, Analytical Separations Using Molecular Micelles in Open-Tubular Capillary Electrochromatography, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 2328-2335.
- [201] M. Li, X. Liu, F. Jiang, L. Guo, L. Yang, Enantioselective open-tubular capillary electrochromatography using cyclodextrin-modified gold nanoparticles as stationary phase, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 3725-3729.
- [202] J. Hu, L. Yin, L. Jia, Chitosan-silica hybrid-coated open tubular column for hydrophilic interaction capillary electrochromatography, *J. Sep. Sci.*, 34 (2011) 565-573.
- [203] T. Wakita, B. Chankvetadze, C. Yamamoto, Y. Okamoto, Chromatographic enantioseparation on a wall-coated open tubular capillary column containing covalently bound cellulose (3,5-dichlorophenyl carbamate) as chiral selector, *J. Sep. Sci.*, 25 (2002) 167-169.
- [204] G.-h. Tao, L. He, W.-s. Liu, L. Xu, W. Xiong, T. Wang, Y. Kou, Preparation, characterization and application of amino acid-based green ionic liquids, *Green Chem.*, 8 (2006) 639-646.
- [205] B. Chen, Y. Du, Evaluation of the enantioseparation capability of the novel chiral selector clindamycin phosphate towards basic drugs by micellar electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 1806-1812.
- [206] E.K. Alev DOĞAN Potentiometric Studies on the Protonation Constants and Solvation of Some α -Amino Acid Benzyl- and t-Butyl- Esters in Ethanol-Water Mixtures, *Turk J Chem*, 29 (2005) 41-47.
- [207] L.J.P. R. W. Hay, P. J. Morris, The basic hydrolysis of amino acid esters, *Australian journal of Chemistry*, 19 (1966) 1197-1205.
- [208] R. Hay, L. Porter, Proton ionisation constants and kinetics of base hydrolysis of some α -amino acid esters in aqueous solution, *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic*, (1967) 1261-1264.
- [209] Y. Zhang, H. Yu, Y. Wu, W. Zhao, M. Yang, H. Jing, A. Chen, Combined use of [TBA][L-ASP] and hydroxypropyl- β -cyclodextrin as selectors for separation of Cinchona alkaloids by capillary electrophoresis, *Anal. Biochem.*, 462 (2014) 13-18.
- [210] H. Gika, M. Lämmerhofer, I. Papadoyannis, W. Lindner, Direct separation and quantitative analysis of thyroxine and triiodothyronine enantiomers in pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*, 800 (2004) 193-201.
- [211] T.á. Gondová, J. Petrovaj, M. Suchá, D.W. Armstrong, Stereoselective HPLC determination of thyroxine enantiomers in pharmaceuticals, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 34 (2011) 2304-2314.
- [212] M.-K. Lee, A.P. Kumar, Y.-I. Lee, Kinetic method for enantiomeric determination of thyroid hormone (d,l-thyroxine) using electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS), *Int. J. Mass spectrom.*, 272 (2008) 180-186.
- [213] S. Lee, S. Jung, Enantioseparation using cyclodextrins as a novel chiral additive in capillary electrophoresis, *Carbohydr. Res.*, 338 (2003) 1143-1146.

- [214] J. Kang, D. Kutscher, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González, A. Sanz-Medel, Enantioselective determination of thyroxine enantiomers by ligand-exchange CE with UV absorbance and ICP-MS detection, *Electrophoresis*, 30 (2009) 1774-1782.
- [215] K. Lomsadze, A. Salgado, E. Calvo, J. Antonio López, B. Chankvetadze, Comparative NMR and MS studies on the mechanism of enantioseparation of propranolol with heptakis(2,3-diacetyl-6-sulfo)- β -cyclodextrin in capillary electrophoresis with aqueous and non-aqueous electrolytes, *Electrophoresis*, 32 (2011) 1156-1163.
- [216] E.D. Vega, K. Lomsadze, L. Chankvetadze, A. Salgado, G.K.E. Scriba, E. Calvo, J.A. López, A.L. Crego, M.L. Marina, B. Chankvetadze, Separation of enantiomers of ephedrine by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors: Comparative CE, NMR and high resolution MS studies, *Electrophoresis*, 32 (2011) 2640-2647.
- [217] K. Lomsadze, E.D. Vega, A. Salgado, A.L. Crego, G.K. Scriba, M.L. Marina, B. Chankvetadze, Separation of enantiomers of norephedrine by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors: Comparative CE and NMR studies, *Electrophoresis*, 33 (2012) 1637-1647.
- [218] K. Lomsadze, A.B. Martínez-Girón, M. Castro-Puyana, L. Chankvetadze, A.L. Crego, A. Salgado, M.L. Marina, B. Chankvetadze, About the role of enantioselective selector-selectand interactions and the mobilities of diastereomeric associates in enantiomer separations using CE, *Electrophoresis*, 30 (2009) 2803-2811.