



Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**«ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΧΕΙΡΟΜΟΡΦΩΝ
ΕΠΙΛΟΓΕΩΝ, ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ ΚΑΙ ΕΥΤΗΚΤΩΝ
ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΕΝΑΝΤΙΟΜΕΡΩΝ
ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΥΣ»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΟΥ ΚΑΤΕΡΙΝΑ

2023



Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**«ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΧΕΙΡΟΜΟΡΦΩΝ
ΕΠΙΛΟΓΕΩΝ, ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ ΚΑΙ ΕΥΤΗΚΤΩΝ
ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΕΝΑΝΤΙΟΜΕΡΩΝ
ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΥΣ»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΟΥ ΚΑΤΕΡΙΝΑ

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

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2023

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 2019 - Δεκέμβριος 2023). Πειράματα πραγματοποιήθηκαν επίσης στο ερευνητικό εργαστήριο του Τμήματος Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου του Graz (Graz University, Austria) υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Dr. Martin Schmid, στο πλαίσιο του προγράμματος Erasmus Placement.

Κατερίνα Ιωάννου

.....

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που ήταν στο πλάι μου και μου συμπαραστάθηκαν, σε όλο αυτό το ταξίδι για την πραγματοποίηση ενός σημαντικού και συνάμα δύσκολου προσωπικού μου στόχου, αυτού των διδακτορικών μου σπουδών. Η παρουσία και η υποστήριξη των ανθρώπων αυτών αποτέλεσαν την κινητήρια δύναμη για τη διεκπεραίωση του προσωπικού μου αυτού στόχου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την ερευνητική μου σύμβουλο Δρ. Κωνσταντίνα Καπνίση-Χριστοδούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου, για την ευκαιρία που μου παρείχε να πραγματοποιήσω τις διδακτορικές μου σπουδές ως μέρος της ερευνητικής της ομάδας, στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης. Την ευχαριστώ θερμά για τη συνεχή καθοδήγηση, την αμέριστη υποστήριξη, τις ουσιώδες συμβουλές, καθώς και την αδιάκοπη ενθάρρυνση και συμπαράσταση που μου προσέφερε όλο αυτό διάστημα. Επιπλέον, θα ήθελα να τονίσω την αμέριστη συμπαράσταση της και τις πολύτιμες συμβουλές της, όχι μόνο σε ερευνητικό επίπεδο, αλλά και σε προσωπικά θέματα που με απασχολούσαν κατά τη διάρκεια του διδακτορικού.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της εσωτερικής εξεταστικής μου επιτροπής, τον Καθηγητή Δρ. Ιωάννη Πασχαλίδη και τον Καθηγητή Δρ. Αναστάσιο Τασιόπουλο, για την πολύτιμη τους συμμετοχή στις επιτροπές αξιολόγησης της ερευνητικής μου διατριβής, καθώς, επίσης, και τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Δρ. Βικτωρία Σαμανίδου και την Λέκτορα Δρ. Αργυρώ Τσιπά 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.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Δρ. Martin G. Schmid του Τμήματος Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου του Graz, Graz, Austria που μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ στο εργαστήριο του και να έρθω σε επαφή με καινούρια ερευνητικά πεδία, αλλά και για την άψογη συνεργασία, την πολύτιμη βοήθεια και τη σημαντική συνεισφορά τους στην ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Πανεπιστήμιο Κύπρου για τη χρηματοδότηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους μεταδιδακτορικούς ερευνητές του Εργαστηρίου Ενόργανης Ανάλυσης, Δρ. Ιωάννη Σταύρου και Δρ. Αταλάντη Χρίστου και στους συμφοιτητές μου Ηλιάνα Αγαθοκλέους, Γεωργία Ιωάννου, Μάριο Χριστοδούλου και Μιχάλη Πέτρου. Τους ευχαριστώ πολύ για την άψογη συνεργασία, τις πολύτιμες συμβουλές, τις ευχάριστες στιγμές και για την αμέριστη στήριξη.

Δε θα μπορούσα βεβαίως να παραβλέψω την οικογένειά μου. Τους ευχαριστώ για την ψυχική υποστήριξη και την αμέριστη συμπαράσταση. Η πίστη τους στις δυνατότητες μου ήταν αυτή που με ώθησε να προχωρήσω και να θέτω όλο και υψηλότερους στόχους. Ευχαριστώ τον πατέρα μου Ανδρέα και τη μητέρα μου Ξένια, για την αδιάκοπη συμπαράσταση, την πίστη τους για τις επιλογές που έκανα, αλλά και για το ήθος και τις αξίες που μου δίδαξαν. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την αδελφή μου Αναστασία που ήταν πάντα δίπλα μου, αλλά και τους φίλους μου για την πολύπλευρη συμπαράστασή τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον άνδρα μου, Μιχάλη, για την υπομονή και πολύπλευρη συμπαράσταση που επέδειξε στα άγχη και τις ανησυχίες μου όλο αυτό το διάστημα και με υπομονή στάθηκε δίπλα μου και μου συμπαραστάθηκε ηθικά και ψυχικά σε όλη αυτή την πορεία. Τον ευχαριστώ που με στηρίζει και με νοιάζεται σε ό,τι, και αν κάνω στη ζωή μου.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, η παραγωγή των νέων ψυχοδραστικών ενώσεων (New Psychoactive Substances, NPSs) αυξάνεται με μεγάλη ταχύτητα λόγω της περιορισμένης ικανότητας ανίχνευσης και παρακολούθησης αυτών των ενώσεων, οδηγώντας έτσι σε παγκόσμιο πρόβλημα. Επιπρόσθετα, λόγω της ύπαρξης ενός στερεογονικού κέντρου στη δομή πολλών NPS, απαντώνται σε δύο εναντιομερείς μορφές με δυνητικά διαφορετική φαρμακολογική δράση. Συγκεκριμένα, μόνο ένας μικρός αριθμός δημοσιεύσεων ασχολείται με τις εναντιοεκλεκτικές επιδράσεις των NPS, αφού η σύνθεσή τους πραγματοποιείται σε μυστικά και παράνομα εργαστήρια. Έτσι, δεδομένης της αυξημένης ανάγκης για μελέτη της φαρμακολογικής δράσης των καθαρών εναντιομερών, καθίσταται αναγκαία η ανάπτυξη ενόργανων αναλυτικών μεθόδων για χειρόμορφο διαχωρισμό.

Σε πρώτο στάδιο, υπό τις συνθήκες αυτές, έλαβε χώρα μελέτη διαφόρων ηλεκτροφορητικών παραμέτρων, μεταξύ άλλων, το είδος και η συγκέντρωση του χειρόμορφου επιλογέα (Chiral Selector, CS), η συγκέντρωση και το pH του ηλεκτρολύτη υποβάθρου (Background Electrolyte, BGE), καθώς και η εφαρμοζόμενη τάση και προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για τον χειρόμορφο διαχωρισμό δέκα εναντιομερών ψυχοδραστικών ενώσεων.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση των ιοντικών υγρών που έχουν ως βάση τους εστέρες αμινοξέων (Amino Acid Based Ionic Liquids, AAILs) καθώς και εύτηκτων διαλυτών (Deep Eutectic Solvents, DESs) ως πρόσθετα στον ηλεκτρολύτη υποβάθρου ο οποίος περιείχε CS [κυκλοδεξτρίνες (Cyclodextrins, CDs), κυκλοφρουκτάνες (Cyclofructans, CFs)], με σκοπό την πιθανή βελτίωση του χειρόμορφου διαχωρισμού τριών αναλόγων αμφεταμίνης, τα οποία δεν είχαν διαχωριστεί σε προγενέστερο στάδιο με κανένα υπό μελέτη CS. Με εφαρμογή της προτεινόμενης ηλεκτροφορητικής μεθόδου, κατέστη δυνατός ο πλήρης χειρόμορφος διαχωρισμός των υπό μελέτη αμφεταμινών. Επιπρόσθετα, εξάχθηκαν σημαντικά συμπεράσματα για την πιθανή δράση των DESs (συνεργειακή/ανταγωνιστική) στα δυαδικά συστήματα CD/DES και CF/DES.

Ακολουθώντας, σε επόμενο στάδιο έλαβε χώρα βελτιστοποίηση μίας στερεοεκλεκτικής μεθόδου, για τον εναντιομερή διαχωρισμό φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης και

καθιόνης με χρήση ενός δυαδικού συστήματος το οποίο αποτελείτο από CM-β-CD και ChCl-EG, μέσω της μεθοδολογίας επιφανειών απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM). Η μέθοδος η οποία αναπτύχθηκε, αποδείχθηκε καταλληλότερη για την επίτευξη πλήρους διαχωρισμού φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης και καθιόνης, τονίζοντας τη σημαντικότητα των DESs ως πρόσθετα στην ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς (Capillary Electrophoresis, CE). Επιπλέον, η ικανοποιητική ακρίβεια που επέδειξε, υποδηλώνει και την επιτυχή της εφαρμογή στον εναντιομερή διαχωρισμό των NPSs, τα οποία διαφέρουν ελάχιστα στη δομή τους.

Στο τελικό στάδιο της εν λόγω διατριβής, επιτεύχθηκε με επιτυχία η παρασκευή, για πρώτη φορά, ενός υπερμοριακού εύτηκτου διαλύτη (Supramolecular Deep Eutectic Solvent, SUPRADES), ονόματι S-β-CD-CA, το οποίο αποτελείτο από θειϊκή β-κυκλοδεξτρίνη (Sulfated-β-CD, S-β-CD) και κιτρικό οξύ (Citric Acid, CA) ως δέκτη και δότη δεσμού υδρογόνου, αντίστοιχα. Ακολούθως, το προαναφερθέν SUPRADES, αξιολογήθηκε ως προς την ικανότητα χειρόμορφης αναγνώρισής του, τόσο για ψυχοδραστικές (αμφεταμίνες, καθιόνες) όσο και για κλινικές ενώσεις. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν τη βιωσιμότητα του S-β-CD-CA ως μοναδικός CS, ο οποίος έχει τη δυνατότητα να αυξήσει σημαντικά το εύρος των εφαρμογών για τα SUPRADESs στην CE.

Abstract

The rapid appearance of New Psychoactive Substances (NPS), and mainly synthetic analogs of cathinone and amphetamines, in global drug market, raised the concern of worldwide public health. As many pharmaceutical compounds, illicit drugs, including NPS, are chiral and the pharmacological and neurotoxic potential of the pure enantiomers could differ. Therefore, analytical methods, capable of differentiating enantiomers, are of great importance.

Under this framework, a simple and easy-to-prepare electrophoretic method was developed for the enantioseparation of amphetamine and cathinone derivatives. Different types of β -cyclodextrin and cyclofructan-based chiral selectors (CSs), both native and derivatized, were utilized, and the most effective ones, in terms of resolution and analysis time, were identified. In addition, several electrophoretic parameters, such as background electrolyte (BGE) concentration and pH, and CS concentration, were examined to optimize the separation conditions.

Subsequently, the effect of the combined use of amino acid-based ionic liquids (AAILs) and deep eutectic solvents (DESs) with either cyclodextrin- (CD) or cyclofructan- (CF) based CSs for the chiral separation of amphetamine derivatives, which had not been separated previously with any under-study CS, was investigated. By applying the proposed electrophoretic method, it became possible to achieve baseline enantiomeric separation of amphetamine analogs. In addition, important conclusions were drawn regarding the possible action of DES (synergistic/antagonistic) in combination with CDs and CFs.

Then, a comprehensive study was performed to determine an optimum enantioseparation method for fluorine-substituted amphetamine and cathinone derivatives using a binary system consisting of carboxymethyl- β -CD (CM- β -CD) and a DES, namely choline chloride-ethylene glycol (ChCl-EG). Under this framework, the optimization and modeling of the separation conditions in a binary system were performed with the objective of maximizing resolution and minimizing analysis time. This was achieved through the application of response surface methodology (RSM). The developed electrophoretic method resulted in a baseline separation of both fluorine-substituted amphetamine and cathinone derivatives. Overall, the results demonstrated

the synergistic effect of the CM- β -CD/DES dual system and highlighted the significance of DESs as additives in capillary electrophoresis (CE).

Finally, a novel supramolecular deep eutectic solvent consisting of sulfated- β -CD and citric acid (S- β -CD-CA) was reported for the first time. This innovative system was evaluated as a sole chiral selector in capillary electrophoresis for the enantioseparation of six fluorine-substituted amphetamine analogs, yielding remarkable outcomes. The results demonstrated a baseline enantioseparation of all investigated NPS analogs, and the clinical compound, namely nefopam. This outcome highlights the viability of S- β -CD-CA as a sole chiral selector, which has the potential to significantly broaden the range of applications for SUPRADESs in CE.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	1
1.1 Νέες Ψυχοδραστικές Ουσίες (NPSs)	1
1.1.1 Αμφεταμίνες	3
1.1.2 Καθινόνες	5
1.2 Χειρομορφία.....	8
1.3 Χειρόμορφες Ενώσεις	10
1.4 Χειρόμορφοι Διαχωρισμοί	12
1.4.1 Εναντιοεκλεκτικότητα	13
1.4.2 Κανόνας των τριών σημείων	13
1.4.3 Είδη μοριακών αλληλεπιδράσεων	14
1.5 Χειρόμορφοι Επιλογείς (CSs)	14
1.5.1 Κυκλοδεξτρίνες (CDs).....	15
1.5.2 Κυκλοφρουκτάνες (CFs)	17
1.6 Ιοντικά Υγρά (ILs)	18
1.7 Εύτηκτοι Διαλύτες (DESs).....	20
1.8 Μέθοδοι για εναντιομερή διαχωρισμό	24
1.8.1 Ηλεκτροφορητικές Τεχνικές-Βιβλιογραφική Ανασκόπηση	24
1.9 Πρωτοτυπία Μελέτης.....	26
2. Μεθοδολογία.....	28
2.1 Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδούς (CE).....	28
2.1.1 Οργανολογία.....	29
2.1.2 Ανίχνευση.....	30
2.1.3 Βασικές Αρχές CE.....	31
2.1.4 Τεχνικές CE	36
3. Πειραματικό Μέρος	39
3.1 Αξιολόγηση και σύγκριση CSs για τον εναντιομερή διαχωρισμό ψυχοδραστικών ενώσεων με χρήση της CE	41
3.1.1 Αντιδραστήρια.....	41
3.2 Μελέτη της επίδρασης AAILs και DESs στο χειρόμορφο διαχωρισμό αμφεταμινών	42
3.2.1 Αντιδραστήρια.....	42
3.2.2. Σύνθεση AAILs	43
3.2.3. Παρασκευή DESs	45

3.3 Εφαρμογή της RSM στη βελτίωση του εναντιομερούς διαχωρισμού φθοριομένων αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης.....	46
3.3.1 Αντιδραστήρια.....	46
3.3.2. Πειραματικός σχεδιασμός και στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	48
3.4 Παρασκευή του SUPRADES και χρήση του ως μοναδικός CS στην CE	49
3.4.1 Αντιδραστήρια.....	49
3.1.2 Ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.....	51
4. Αποτελέσματα.....	55
4.1 Αξιολόγηση και σύγκριση CSs για τον εναντιομερή διαχωρισμό ψυχοδραστικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής CE-DAD.....	56
4.1.1. Ανάπτυξη μεθόδου CE	58
4.1.2 Βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού	68
4.1.3 Αξιολόγηση μεθόδου.....	69
4.1.4 Ικανότητα χειρόμορφης αναγνώρισης των CSs (CF, CD) ως προς τους υπό μελέτη αναλύτες	70
4.1.5 Εφαρμογή της μεθόδου-Ταυτόχρονος χειρόμορφος διαχωρισμός.....	71
4.1.6 Σύγκριση αποτελεσμάτων και υπάρχουσας βιβλιογραφίας	72
4.1.7 Συμπεράσματα.....	73
4.2 Μελέτη της επίδρασης AAILs και DESs στο χειρόμορφο διαχωρισμό αμφεταμινών	74
4.2.1 Επίδραση της προσθήκης AAILs	76
4.2.2 Επίδραση του είδους και του ποσοστού των DESs - Μελέτη του δυαδικού συστήματος CD/DES.....	76
4.2.3 Επίδραση του είδους και του ποσοστού των DESs - Μελέτη του δυαδικού συστήματος CF/DES	81
4.2.4 Επίδραση της προσθήκης των αρχικών αντιδραστηρίων	83
4.2.5 Συμπεράσματα.....	84
4.3 Εφαρμογή της RSM στη βελτίωση του εναντιομερούς διαχωρισμού φθοριομένων αναλόγων αμφεταμίνης.....	85
4.3.1 Σχεδιασμός Βελτιστοποίησης (Optimization Design).....	87
4.3.2 Ανάλυση παλινδρόμησης και ανάλυση διακύμανσης αποτελεσμάτων.....	89
4.3.3 Ανάλυση επιφανειών απόκρισης.....	95
4.3.4 Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών και επικύρωση των μαθηματικών μοντέλων.....	99
4.3.5 Επικύρωση Μεθόδου.....	102
4.3.6 Ικανότητα χειρόμορφης αναγνώρισης του δυαδικού συστήματος CM-β-CD/ChCl-EG ως προς τους υπό μελέτη αναλύτες.....	103

4.3.7 Συμπεράσματα	104
4.4 Παρασκευή του SUPRADES (S-β-CD-CA) και χρήση του ως μοναδικός CS στην CE.....	104
4.4.1 Χαρακτηρισμός του SUPRADES, S-β-CD-CA	107
4.4.2 Εναντιομερής διαχωρισμός φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης με χρήση του S-β-CD-CA ως μοναδικός CS.....	108
4.4.3 Εναντιομερής διαχωρισμός αναλόγων καθινόνης με χρήση του S-β-CD-CA ως μοναδικός CS	111
4.4.4 Επικύρωση Μεθόδου.....	113
4.4.5 Εναντιομερής διαχωρισμός της NEF με χρήση του S-β-CD-CA ως CS... ..	113
4.4.6 Επικύρωση Μεθόδου.....	114
4.4.7 Συμπεράσματα.....	114
5. Γενικά Συμπεράσματα	116
6. Μελλοντική Εργασία	119
7. Βιβλιογραφία	120

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1.1. Αριθμός των νέων ψυχοδραστικών ενώσεων οι οποίες αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στην Ευρώπη, ανά κατηγορία, από το 2005 έως το 2022	3
Σχήμα 1.2. Δομή Αμφεταμίνης.	3
Σχήμα 1.3. (A) Δομή Καθινόνης και (B) Δομή Αμφεταμίνης.	5
Σχήμα 1.4. Οξεία και χρόνια κλινική εκδήλωση δηλητηρίασης από καθινόνη.	6
Σχήμα 1.5. Τροποποιήσεις και θέσεις στις οποίες πραγματοποιείται τροποποίηση.	7
Σχήμα 1.6. Ονοματολογία Εναντιομερών.	9
Σχήμα 1.7. S και R εναντιομερή.	10
Σχήμα 1.8. Η διαφορά μεταξύ της αλληλεπίδρασης των δύο εναντιομερών ενός χειρόμορφου φαρμάκου με τον υποδοχέα.	11
Σχήμα 1.9. Μοντέλο τριών σημείων αλληλεπίδρασης (α) Εναντιομερές που πληροί το μοντέλο των τριών σημείων (β) Εναντιομερές που δεν πληροί το μοντέλο των τριών σημείων.	13
Σχήμα 1.10. Σύμπλοκο εγκλεισμού. Αλληλεπίδραση host-guest.	16
Σχήμα 1.11. Δομές α-, β- και γ-CD.	17
Σχήμα 1.12. (A) Η D-φρουκτοφουρανόζη, δομική μονάδα των CFs και (B) Αναπαράσταση της δομής των CFs, R= H. CF-6, και για n = 1 η CF-7 και n = 2 η CF-8.	18
Σχήμα 1.13. Παρασκευή DES μέσω αλληλεπίδρασης HBD και HBA (Choline Chloride, ChCl).	21
Σχήμα 1.14. Οι κυριότεροι σταθμοί στην εξέλιξη των DESs.	22
Σχήμα 1.15. (A) Δυαδικό και (B) Τριμερές υπερμοριακό σύστημα.	23
Σχήμα 2.1. Κίνηση των ιόντων προς την κάθοδο.	29
Σχήμα 2.2. Τυπική διάταξη ενός συστήματος CE.	30
Σχήμα 2.3. Κατανομή φορτίου στη διεπιφάνεια της τριχοειδούς στήλης.	33
Σχήμα 2.4. Κατανομή ροής υγρών υπό την επίδραση (A) ηλεκτροσωμωτικής πίεσης και (B) υδροδυναμικής πίεσης.	36
Σχήμα 3.1. Σύστημα CE-DAD.	39
Σχήμα 3.2. Δομές των ψυχοδραστικών ενώσεων που μελετήθηκαν.	42
Σχήμα 3.3. Δομές των AAILs.	44

Σχήμα 3.4. Αντιπροσωπευτική πορεία σύνθεσης του L-AlaC ₄ Lac.	44
Σχήμα 3.5. Συνοπτικό διάγραμμα της πορείας που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των AAILs.	45
Σχήμα 3.6. Συνοπτικό διάγραμμα της πορείας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των DESs.	46
Σχήμα 3.7. Δομές των αλογονο-υποκατεστημένων αμφεταμινών και καθινονών που εξετάστηκαν.	47
Σχήμα 3.8. Γραφική αναπαράσταση για τον υπολογισμό της διαχωριστικής ικανότητας.	52
Σχήμα 3.9. Γραφική αναπαράσταση των μεγεθών f και g που χρησιμοποιούνται κατά τον υπολογισμό του παράγοντα Kaiser.	52
Σχήμα 4.1. Διάγραμμα ροής Στόχου 1 της Διδακτορικής Διατριβής.	57
Σχήμα 4.2. Επίδραση της συγκέντρωσης του BGE στους χρόνους μετανάστευσης και στη διαχωριστική ικανότητα των υπό μελέτη αναλυτών (5 mM β-CD, pH 2.5).	59
Σχήμα 4.3. Επίδραση της συγκέντρωσης του BGE στους χρόνους μετανάστευσης και στη διαχωριστική ικανότητα του αναλόγου 3-MMC (5 mM β-CD, pH 2.5).	60
Σχήμα 4.4. Μεταβολή της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας των αναλυτών.	61
Σχήμα 4.5. Γραφική απεικόνιση του αριθμού αναλόγων NPS που διαχωρίζονται με χρήση CDs και CFs.	65
Σχήμα 4.6. Επίδραση της συγκέντρωσης του CS στη διαχωριστική ικανότητα. Σύγκριση της χρήσης SCF-6 και SCF-7 ως CSs στην περίπτωση του αναλόγου (A) 4-MEC και (B) MDMA.	66
Σχήμα 4.7. Ταυτόχρονος χειρόμορφος διαχωρισμός μίγματος καθινονών. (1,1') 4-Μεθυλαιθκαθινόνη, (2,2') 3-Μεθυλμεθκαθινόνη, (3,3') 3,4-Διμεθυλμεθκαθινόνη, (4,4') 3,4-Μεθυλενοδιοξυμεθκαθινόνη. Συνθήκες: 1 mM SCF-7, 20 mM NaH ₂ PO ₄ , pH=2.5, T = 25 °C, V = 25 kV στην κάθοδο, έγχυση δείγματος = 50 mbar για 5 s, δείγμα: 0.2 mg/mL σε MeOH, ανίχνευση: 210 nm.	71
Σχήμα 4.8. Διάγραμμα ροής Στόχου 2 της Δ.Δ.	75
Σχήμα 4.9. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των μη-χειρόμορφων DESs στο χειρόμορφο διαχωρισμό της AMP, MA και 3-FEA σε BGE το οποίο περιέχει 15 mM CM-β-CD. (A) και (B) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της AMP, (C) και (D) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της MA, και (E) και (F) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της 3-FEA, όταν ο τύπος (0.50% v/v) και η συγκέντρωση του DESs μεταβάλλεται, αντίστοιχα.	77

Σχήμα 4.10. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των μη-χειρόμορφων DESs στο χειρόμορφο διαχωρισμό της AMP. 78

Σχήμα 4.11. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των χειρόμορφων DESs στο χειρόμορφο διαχωρισμό της AMP, MA και 3- FEA στον BGE ο οποίος περιέχει 15 mM CM- β-CD. (A) και (B) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της AMP, (C) και (D) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της MA, και (E) και (F) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της 3-FEA, όταν ο τύπος (0.015% v/v) και η συγκέντρωση του DESs μεταβάλλεται, αντίστοιχα. 80

Σχήμα 4.12. Επίδραση της συγκέντρωσης του DES, ChCl-D-Fru, στο χειρόμορφο διαχωρισμό των υπό μελέτη ενώσεων. 81

Σχήμα 4.13. Επίδραση της συγκέντρωσης του DES, ChCl-EG, στο χειρόμορφο διαχωρισμό της AMP, MA και 3- FEA στον BGE ο οποίος περιέχει 1 mM SCF-6. (A) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της AMP, (B) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της MA, και (C) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της 3-FEA, όταν η συγκέντρωση του DESs μεταβάλλεται..... 82

Σχήμα 4.14. Διάγραμμα ροής στόχου 3 της Δ.Δ..... 86

Σχήμα 4.15. Επιφάνειες απόκρισης και ισομετρικά διαγράμματα. 98

Σχήμα 4.16. Διάγραμμα ροής στόχου 4 της Δ.Δ..... 106

Σχήμα 4.17. Φάσματα ATR-FTIR (A) S-β-CD, (B) CA και (C) S-β-CD-CA. 107

Σχήμα 4.18. Τα ηλεκτροφερογράμματα (A) της ένωσης 4-FMA και (B) της ένωσης 4-FA, όταν χρησιμοποιήθηκε η βέλτιστη συγκέντρωση του SUPRADES (% v/v), αντίστοιχα (20 mM NaH₂PO₄, pH=2.5). 110

Σχήμα 4.19. Επίδραση του ποσοστού του S-β-CD-CA, στο χειρόμορφο διαχωρισμό του NEF (BGE: 100 mM Tris / 10 mM Borate, pH 8.0). 114

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2.1. Βασικότερες μέθοδοι CE και η αρχή στην οποία βασίζεται ο διαχωρισμός.....	36
Πίνακας 3.1. Τα DESs που παρασκευάστηκαν και οι αντίστοιχες τους μοριακές αναλογίες.....	46
Πίνακας 4.1. Αποτελέσματα χειρόμορφου διαχωρισμού δέκα αναλόγων NPS με χρήση CDs ως CSs (20 mM NaH ₂ PO ₄ , 15 mM CS, pH=2.5).....	62
Πίνακας 4.2. Τιμές διαχωριστικής ικανότητας δέκα αναλόγων NPS με χρήση CFs ως CSs.....	64
Πίνακας 4.3. Χρόνοι μετανάστευσης, εναντιοεκλεκτικότητα και τιμές διαχωριστικής ικανότητας, για το χειρόμορφο διαχωρισμό δέκα αναλόγων NPS υπό τις βέλτιστες συνθήκες.....	68
Πίνακας 4.4. Αποτελέσματα από την αξιολόγηση της ηλεκτροφορητικής μεθόδου...	70
Πίνακας 4.5. Επίπεδα ανεξάρτητων μεταβλητών.....	87
Πίνακας 4.6A. CCD πειραματικός σχεδιασμός και πειραματικά αποτελέσματα για τα ανάλογα φθορομεθαμφεταμίνης (fluormethamphetamine analogs-FMA analogs).....	88
Πίνακας 4.6B. CCD πειραματικός σχεδιασμός και πειραματικά αποτελέσματα για τα ανάλογα φθοροαιθαμφεταμίνης (fluorethamphetamine analogs-FEA analogs).....	88
Πίνακας 4.7. CCD πειραματικός σχεδιασμός και πειραματικά αποτελέσματα για τα ανάλογα φθορομεθακαθινόνης (fluormethcathinone analogs-FMC analogs).....	89
Πίνακας 4.8. Αποτελέσματα ANOVA φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης.....	91
Πίνακας 4.9. Αποτελέσματα ANOVA φθοριωμένων αναλόγων καθινόνης.....	94
Πίνακας 4.10. Πειραματικές τιμές των φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης υπό τις βέλτιστες συνθήκες.....	100
Πίνακας 4.11. Πειραματικές τιμές των φθοριωμένων αναλόγων καθινόνης υπό τις βέλτιστες συνθήκες.....	101
Πίνακας 4.12. Βέλτιστες συνθήκες. Προτεινόμενες και πειραματικές τιμές.....	101
Πίνακας 4.13. Χρόνοι μετανάστευσης, παράγοντας Kaiser και τιμές διαχωριστικής ικανότητας για το χειρόμορφο διαχωρισμό έξι φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης	

με	χρήση	της	S-β-CD-CA	ως
CS.....				109
Πίνακας 4.14.	Χρόνοι μετανάστευσης και τιμές διαχωριστικής ικανότητας για το χειρόμορφο διαχωρισμό πέντε αναλόγων καθιόνης με χρήση της S-β-CD-CA ως CS.....			112

Κατάλογος Συντμήσεων

- 2-CMC:** 2-chlormethcathinone, 2-χλωρομεθκαθινόνη
- 2-FA:** 2-fluoramphetamine, 2-φθοροαμφεταμίνη
- 2-FEA:** 2-fluorethamphetamine, 2-φθοροαιθαμφεταμίνη
- 2-FMA:** 2-fluormethamphetamine, 2-φθορομεθαμφεταμίνη
- 2-FMC:** 2-fluormethcathinone, 2-φθορομεθκαθινόνη
- 2-HP-β-CD:** 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin, 2-υδροξυπροπυλ-β-κυκλοδεξτρίνη
- 3,4-DMMC:** 3,4-dimethylmethcathinone, 3,4-διμεθυλομεθκαθινόνη
- 3-CMC:** 3-chlormethcathinone, 3-χλωρομεθκαθινόνη
- 3-FA:** 3-fluoramphetamine, 3-φθοροαμφεταμίνη
- 3-FEA:** 3-fluorethamphetamine, 3-φθοροαιθαμφεταμίνη
- 3-FMA:** 3-fluormethamphetamine, 3-φθορομεθαμφεταμίνη
- 3-FMC:** 3-fluormethcathinone, 3-φθορομεθκαθινόνη
- 3-MMC:** 3-methylmethcathinone, 3-μεθυλμεθκαθινόνη
- 4-CMC:** 4-chlormethcathinone, 4-χλωρομεθκαθινόνη
- 4-FA:** 4-fluoramphetamine, 4-φθοροαμφεταμίνη
- 4-FEA:** 4-fluorethamphetamine, 4-φθοροαιθαμφεταμίνη
- 4-FMA:** 4-fluormethamphetamine, 4-φθορομεθαμφεταμίνη
- 4-FMC:** 4-fluormethcathinone, 4-φθορομεθκαθινόνη
- 4-MEC:** 4-methylethcathinone, 4-μεθυλαιθκαθινόνη
- 4-MMC:** 4-methylmethcathinone, 4-μεθυλμεθκαθινόνη
- AAILs:** Amino Acid Based Ionic Liquids, ιοντικά υγρά από εστέρες αμινοξέων
- ADHD:** Attention-Deficit Hyperactivity Disorder, διαταραχή ελλειμματικής προσοχής
- AgLac:** Silver lactate, γαλακτικός άργυρος

- AMP:** Amphetamine, αμφεταμίνη
- API:** Active Pharmaceutical Ingredient, ενεργό φαρμακευτικό συστατικό
- BGE:** Background Electrolyte, ηλεκτρολύτης υποβάθρου
- CCD:** Central Composite Design, κεντρικά σχεδιασμένοι συνδυασμοί
- CDAs:** Chiral Derivatizing Agents, χειρόμορφα μέσα παραγωγοποίησης
- CDs:** Cyclodextrins, κυκλοδεξτρίνες
- CE:** Capillary Electrophoresis, ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς
- CFs:** Cyclofructans, κυκλοφρουκτάνες
- ChCh-Ur:** Choline chloride-urea, χλωριούχος χολίνη-ουρία
- ChCl:** Choline Chloride, χλωριούχος χολίνη
- ChCl-BG:** Choline chloride-1,3-butanediol, χλωριούχος χολίνη-1,3-βουτανεδιόλη
- ChCl-D-Fru:** Choline chloride-D-fructose, χλωριούχος χολίνη-D-φρουκτόζη
- ChCl-D-Glu:** Choline chloride-D-glucose, χλωριούχος χολίνη-D-γλυκόζη
- ChCl-D-Sor:** Choline chloride-D-sorbitol, χλωριούχος χολίνη-D-σορβιτόλη
- ChCl-EG:** Choline chloride-ethylene glycol, χλωριούχος χολίνη-αιθυλενογλυκόλη
- CILs:** Chiral Ionic Liquids, χειρόμορφα ιοντικά υγρά
- CMC:** Critical Micellar Concentration, κρίσιμη μυκηλιακή συγκέντρωση
- CM-β-CD:** Carboxymethyl-β-CDs, καρβοξυμεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη
- CSPs:** Chiral Stationary Phases, χειρόμορφες στατικές φάσεις
- CSs:** Chiral Selectors, χειρόμορφοι επιλογείς
- CZE:** Capillary Zone Electrophoresis, ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς
- DAD:** Diode-Array Detector, ανιχνευτών συστοιχίας διόδων
- DESSs:** Deep Eutectic Solvents, εύτηκτοι διαλύτες
- EKC:** Electrokinetic Chromatography, ηλεκτροκινητική χρωματογραφία τριχοειδούς

EMCDDA: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Ευρωπαϊκό κέντρο παρακολούθησης ναρκωτικών και εθισμού

EOF: Electroosmotic flow, ηλεκτροωσμωτική ροή

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy, φασματοσκοπίας υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier

GC: Gas Chromatography, αέρια χρωματογραφία

HBAs: Hydrogen Bond Acceptors, δέκτες δεσμών υδρογόνου

HBDs: Hydrogen Bond Donors, δότες δεσμού υδρογόνου

HDESs: Hydrophobic Deep Eutectic Solvents, υδρόφοβοι εύτηκτοι διαλύτες

HPLC: High Performancy Liquid Chromatography, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

HP-β-CD: Hydroxypropyl-β-CDs, υδροξυ-πρότυλ-β-κυκλοδεξτρίνη

ILs: Ionic Liquids, ιοντικά υγρά

IPCF-6: Isopropyl carbamate cyclofructan-6, ισοπρότυλο- καρβαμιδικό παράγωγο της CF-6

IPCF-7: Isopropyl carbamate cyclofructan-7, ισοπρότυλο- καρβαμιδικό παράγωγο της CF-7

L-AlaC₁Cl: L-Alanine methyl ester lactate, γαλακτικός μεθυλεστέρας της L-αλανίνης

L-AlaC₂Cl: L-Alanine ethyl ester lactate, γαλακτικός αιθυλεστέρας της L-αλανίνης

L-AlaC₄Cl: L-Alanine tert-butyl ester lactate, γαλακτικός τερτ βουτυλεστέρας της L-αλανίνης

MA: Methamphetamine, μεθαμφεταμίνη

MDMA: 3,4-methylenedioxyamphetamine, 3,4-μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνη

MDMC: 3,4-methylenedioxycathinone, 3,4-μεθυλενοδιόξυαθινόνη

MDPV: 3,4-methylenedioxypropionaldehyde, 3,4- μεθυλενοδιοξυπυροβαλερόνη

MEKC: Micellar Electrokinetic Chromatography, μικυλλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία τριχοειδούς

MeOH: Methanol, μεθανόλη

NADESSs: Natural Deep Eutectic Solvents, φυσικοί εύτηκτοι διαλύτες

NEF: Nefopam, νεφοπάμη

NPS: New Psychoactive Substances, νέες ψυχοδραστικές ουσίες

RSM: Response Surface Methodology, μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης

SCF-6: Sulfated cyclofructan-6, θειϊκή κυκλοφρουκτάνη-6

SCF-7: Sulfated cyclofructan-7, θειϊκή κυκλοφρουκτάνη-7

SUPRADESSs: Supramolecular deep eutectic solvents, υπερμοριακοί εύτηκτοι διαλύτες

THEDESSs: Therapeutic Deep Eutectic Solvents, θεραπευτικοί εύτηκτοι διαλύτες

UV-Vis: Ultraviolet-Visible, υπεριώδες-ορατού

1. Εισαγωγή

1.1 Νέες Ψυχοδραστικές Ουσίες (NPSs)

Οι Νέες Ψυχοδραστικές Ουσίες (Novel Psychoactive Substances ή New Psychoactive Substances, NPSs) είναι ουσίες κατάχρησης, οι οποίες δεν ελέγχονται από την Ενιαία Σύμβαση για τα Ναρκωτικά του 1961, ή τη Σύμβαση για τις Ψυχοδραστικές Ουσίες [1]. Είναι ενώσεις δομικά παρόμοιες με τα υφιστάμενα νομοθετικά ελεγχόμενα ναρκωτικά, οι οποίες συντίθενται σε παράνομα εργαστήρια, κυρίως στην Κίνα ή σε άλλες Ασιατικές χώρες [2]. Οι πιο απλές και συχνές τροποποιήσεις που γίνονται, οφείλονται κυρίως στην αλλαγή της θέσης του υποκαταστάτη, στην αλλαγή του υποκαταστάτη, ή στην προσθήκη νέου υποκαταστάτη στον αρωματικό δακτύλιο. Συγκεκριμένα, μία κοινή τροποποίηση που λαμβάνει χώρα κατά τη σύνθεση των NPSs, είναι η προσθήκη ενός αλογόνου, κυρίως ατόμων φθορίου ή χλωρίου, στον αρωματικό δακτύλιο [3–6]. Αυτό οδηγεί σε πολυάριθμα μη-απαγορευμένα ισομερή και αποφεύγεται έτσι η ταξινόμηση τους ως παράνομες ενώσεις και η ανίχνευσή τους σε υφιστάμενους ελέγχους ναρκωτικών [7–10]. Επίσης, τα NPS έχουν σχεδιαστεί για να μιμούνται τα αποτελέσματα των απαγορευμένων ναρκωτικών (ψυχοδραστικές ιδιότητες), όπως «έκσταση» (MDMA), κοκαΐνη, ηρωίνη, LSD και κάνναβη [10].

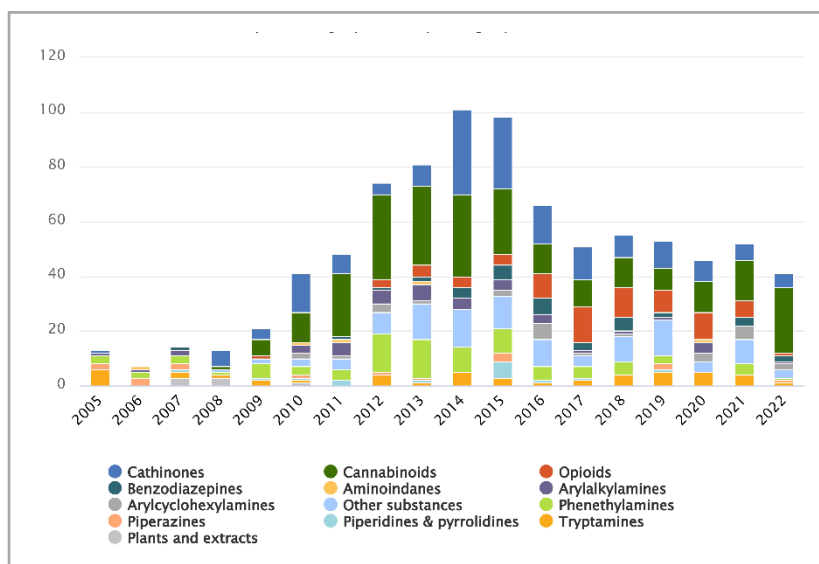
Επιπρόσθετα, ο όρος «Νέες» δεν αναφέρεται αναγκαστικά σε καινούργιες ουσίες, αλλά σε παλαιότερες χημικές δομές οι οποίες έχουν συντεθεί εδώ και περισσότερο από τριάντα χρόνια. Πρόσφατα όμως έχουν εμφανιστεί στην αγορά ναρκωτικών και έχουν γίνει απειλή για τη δημόσια υγεία [1,10,11]. Στην πραγματικότητα, οι ουσίες αυτές μπορούν να είναι εξαιρετικά επιβλαβείς για τον άνθρωπο σε σχέση με τα ελεγχόμενα ναρκωτικά και τα αποτελέσματά τους είναι απρόβλεπτα λόγω των ελάχιστων πληροφοριών που υπάρχουν σχετικά με το δραστικό φάρμακο που δίνεται στην ετικέτα του προϊόντος [10,12,13]. Σε μερικές χώρες της Ευρώπης, μόνο μερικές ουσίες είναι καταγεγραμμένες στη λίστα των απαγορευμένων ουσιών. Έτσι, τα συνθετικά ναρκωτικά δεν είναι παράνομα και πωλούνται είτε σε καθαρές μορφές είτε σε παρασκευάσματα τα οποία φέρουν ετικέτα "όχι για ανθρώπινη κατανάλωση", για να παρακάμψουν τον έλεγχο [1].

Κεφάλαιο 1

Τα τελευταία χρόνια, η παραγωγή των NPSs αυξάνεται με μεγάλη ταχύτητα λόγω της περιορισμένης ικανότητας ανίχνευσης και παρακολούθησης αυτών των ενώσεων, οδηγώντας έτσι σε παγκόσμιο πρόβλημα. Επιπρόσθετα, παρόλο που δεν υπάρχει εγκεκριμένος τρόπος κατηγοριοποίησης των NPSs, το Ευρωπαϊκό Κέντρο Παρακολούθησης Ναρκωτικών και Εθισμού (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA) θέσπισε έξι κύριες κατηγορίες NPS με βάση τη δομή και τις παρενέργειες που προκαλούν. Οι κατηγορίες αυτές είναι: (i) συνθετικές καθινόνες (synthetic cathinones), (ii) συνθετικά κανναβινοειδή (synthetic cannabinoids), (iii) φαιναιθυλαμίνες (phenethylamines), (iv) τρυπταμίνες (tryptamines), (v) πιπεραζίνες (piperazines), και (vi) μία ομάδα από άλλες ουσίες, όπως για παράδειγμα indane, βενζοδιφουρανύλιο (benzodifuranyl), narcotianalgesic, και παράγωγα της κοκαΐνης, κεταμίνης και φαινκυκλιδίνης [1,14] ενώ σε κάθε κατηγορία υπάρχουν και πολυάριθμες υποκατηγορίες. Οι κυριότερες κατηγορίες NPS, οι οποίες εμφανίζονται στη βιβλιογραφία, είναι τα συνθετικά κανναβινοειδή και οι συνθετικές καθινόνες [1,10,15].

Στην Ευρώπη, περίπου κάθε 5-6 μέρες εμφανίζεται και μία καινούργια ψυχοδραστική ουσία [16]. Συγκεκριμένα, στο τέλος του 2022, το EMCDDA, έχει καταγράψει 930 νέες ψυχοδραστικές ουσίες, οι 41 εξ αυτών, αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στην Ευρώπη το 2022 [17]. Στο Σχήμα 1.1, παρουσιάζεται ο αριθμός των νέων ψυχοδραστικών ενώσεων οι οποίες αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στην Ευρώπη, ανά κατηγορία, από το 2005 έως το 2022.

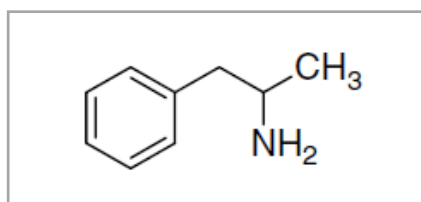
Επιπρόσθετα, λόγω της ύπαρξης ενός στερεογονικού κέντρου στη δομή πολλών NPS, απαντώνται σε δύο εναντιομερείς μορφές με δυνητικά διαφορετική φαρμακολογική δράση [18,19]. Συγκεκριμένα, μόνο ένας μικρός αριθμός δημοσιεύσεων ασχολείται με τις εναντιοεκλεκτικές επιδράσεις των NPS, αφού η σύνθεσή τους πραγματοποιείται σε μυστικά και παράνομα εργαστήρια [2]. Δεδομένης της αυξημένης ανάγκης για μελέτη της φαρμακολογικής δράσης των καθαρών εναντιομερών, καθίσταται αναγκαία η ανάπτυξη ενόργανων αναλυτικών μεθόδων για χειρόμορφο διαχωρισμό.



Σχήμα 1.1. Αριθμός των νέων ψυχοδραστικών ενώσεων οι οποίες αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στην Ευρώπη, ανά κατηγορία, από το 2005 έως το 2022 [20].

1.1.1 Αμφεταμίνες

Η αμφεταμίνη (amphetamine), της οποίας η δομή φαίνεται στο Σχήμα 1.2, ανήκει στην κατηγορία των σύνθετων ουσιών φαινυλαιθυλαμίνες [21–23]. Η χημική της δομή είναι παρόμοια με της εφεδρίνης, η οποία απαντάται στο φυτό *Ephedra* ενώ μπορεί να παραχθεί και συνθετικά [21].



Σχήμα 1.2. Δομή Αμφεταμίνης.

Η αμφεταμίνη χρησιμοποιείτο παλαιότερα για τη θεραπεία των υπέρβαρων ανθρώπων, ανθρώπων που υπέφεραν από ναρκοληψία ή από διαταραχή ελλειμματικής προσοχής/υπερκινητικότητας (Attention-Deficit Hyperactivity Disorder, ADHD) [24,25]. Επιπρόσθετα, η ένωση N-μεθαμφεταμίνη (N-methamphetamine), παράγωγο της πρόδρομης ένωσης της αμφεταμίνης και εμπορικά διαθέσιμη με την ονομασία Pervitin, χορηγείτο σε στρατιώτες, κατά τη διάρκεια του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου με σκοπό να παραμείνουν σε εγρήγορση [21]. Λόγω αυτού, στις δεκαετίες που ακολούθησαν τον πόλεμο, η κατάχρηση αυτού του διεγερτικού ήταν ευρέως

Κεφάλαιο 1

αναγνωρισμένη. Παρόλα αυτά, στις περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες η χρήση της εν λόγω ένωσης περιορίστηκε ή απαγορεύτηκε εξ ολοκλήρου από την αγορά λόγω των παρενεργειών που προκαλεί [21].

Η αμφεταμίνη είναι ένα ισχυρό διεγερτικό του κεντρικού νευρικού συστήματος. Συγκεκριμένα, τα παράγωγα αμφεταμίνης αλληλεπιδρούν με τους μεταφορείς νορεπινεφρίνης (NE), ντοπαμίνης (DA) και σεροτονίνης (5-υδροξυτρυπταμίνη [5-HT]), NET, DAT και SERT, αντίστοιχα αναστέλλοντας τη μεταφορά μονοαμίνης ή επάγοντας την απελευθέρωση μονοαμίνης με τη μεσολάβηση του μεταφορέα. Ωστόσο, αλλαγές στη δομή της κύριας ένωσης (π.χ. προσθήκη υποκαταστάτη, αλλαγή της θέσης του υποκαταστάτη), μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική αλλαγή, στην απόλυτη ή σχετική ισχύ αυτών των πρόσφατα σχεδιασμένων ουσιών στους μεταφορείς NET και στο DAT σε σχέση με το SERT [5,26–33], οδηγώντας κατά συνέπεια, τόσο σε άγνωστες τοξικολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες όσο και σε αποτελέσματα και παρενέργειες. Τα αποτελέσματα της χρήσης της ποικίλουν. Μερικά από αυτά είναι εγρήγορση, υψηλή αυτοπεποίθηση, καταστολή της κούρασης, αύξηση του δυναμικού συγκέντρωσης, ευφορία και χαλάρωση. Η χρήση αμφεταμινών μπορεί όμως να επιφέρει αρνητικές παρενέργειες ειδικά σε περιπτώσεις συνδυασμού με άλλα φάρμακα. Αυτές είναι κυρίως τρόμος, ψύχωση, αϋπνία, αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος, νευροτοξικότητα καθώς και ανώμαλη καρδιακή συχνότητα [21,34]. Επίσης, χρήση παράγωγων αμφεταμίνης μπορεί να οδηγήσει μακροχρόνια σε σοβαρές βλάβες στο σώμα και στον εγκέφαλο του καταναλωτή ακόμη και σε θάνατο [21].

Τα παράγωγα αμφεταμίνης, όπως και άλλες νέες ψυχοδραστικές ενώσεις, έχουν εμφανιστεί στην αγορά ναρκωτικών και ο αριθμός τους αυξάνεται ολοένα και περισσότερο, χρόνο με τον χρόνο. Πωλούνται μέσω διαδικτύου σε πολύ χαμηλές τιμές, από τα αποκαλούμενα “smart shops”, συνήθως με τις ονομασίες “Legal Highs” ή “Bath Salts”, για να παρακάμψουν τον έλεγχο [16,35].

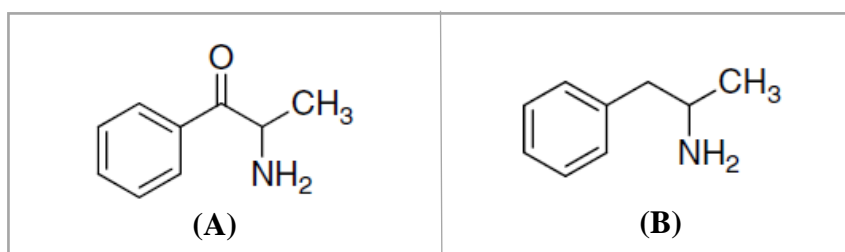
Όπως οι περισσότερες φαρμακευτικές ενώσεις, έτσι και τα παράγωγα NPSs, συμπεριλαμβανομένων των αμφεταμινών είναι χειρόμορφα. Επομένως, απαντώνται σε δύο εναντιομερείς μορφές (R και S) με δυνητικά διαφορετική φαρμακολογική συμπεριφορά. Παρόλο που δεν υπάρχουν διαθέσιμα αρκετά φαρμακολογικά δεδομένα για τα παράγωγα αμφεταμινών, λόγω της καινοτομίας τους, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, τα S-εναντιομερή επιδεικνύουν μεγαλύτερη φαρμακολογική ισχύ από τα

Κεφάλαιο 1

αντίστοιχα R-εναντιομερή. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι, τα S-εναντιομερή είναι πέντε φορές πιο δραστικά, από τα αντίστοιχα R-εναντιομερή [18,36,37]. Περισσότερες λεπτομέρειες για τη χειρομορφία αλλά και τη δράση των εν λόγω ενώσεων αναφέρονται στα Υποκεφάλαια 1.2 και 1.3.

1.1.2 Καθινόνες

Η καθινόνη (cathinone), της οποίας η δομή φαίνεται στο Σχήμα 1.3A, είναι ένα φυσικώς απαντώμενο αλκαλοειδές μονοαμίνης (monoamine alkaloid), το οποίο βρίσκεται στα φρέσκα φύλλα του φυτού *Catha edulis* (*khat*) [1,38]. Η καθινόνη είναι δομικά ανάλογη ένωση με την αμφεταμίνη. Η μόνη δομική διαφορά μεταξύ των δύο είναι η παρουσία καρβονυλικής ομάδας στην α θέση της πλευρικής αλυσίδας του μορίου της καθινόνης (Σχήμα 1.3A και 1.3B) [38,39]. Έτσι, εξαιτίας αυτής της δομικής ομοιότητας, οι καθινόνες παρουσιάζουν παρόμοιες δράσεις με τις αμφεταμίνες [32] και συχνά, τόσο η καθινόνη όσο και τα ανάλογα της αναφέρονται και ως “φυσικές αμφεταμίνες-natural amphetamines” [40].

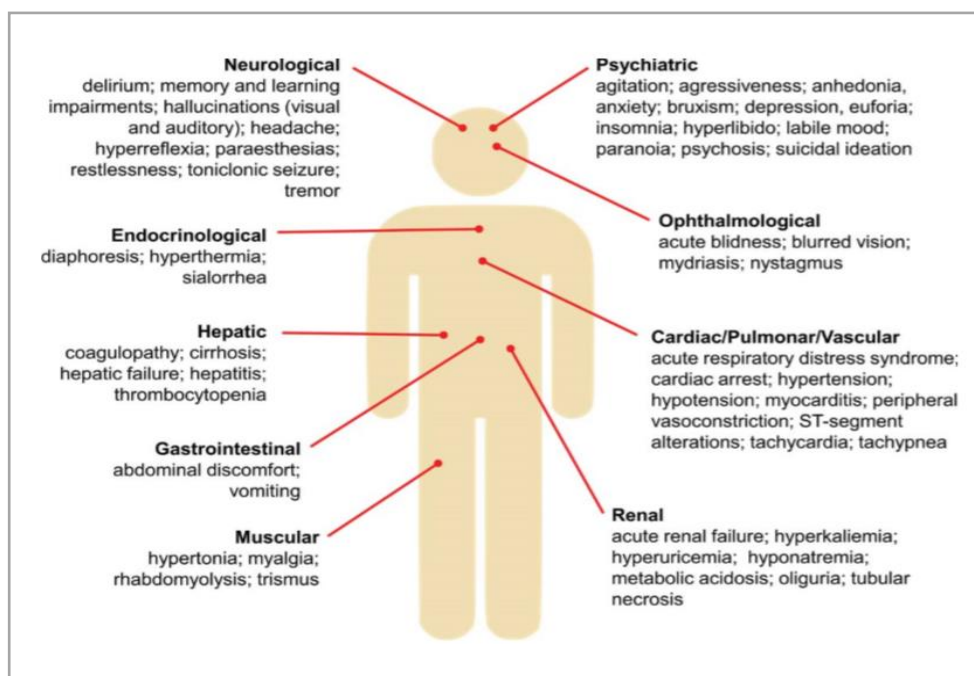


Σχήμα 1.3. (A) Δομή Καθινόνης και (B) Δομή Αμφεταμίνης.

Η καθινόνη, είναι ένα ισχυρό διεγερτικό του κεντρικού νευρικού συστήματος και χρήση της εν λόγω ουσίας επηρεάζει τόσο τον εγκέφαλο, όσο και το περιφερειακό νευρικό σύστημα. Συγκεκριμένα, η καθινόνη, λόγω της υδροφοβικότητάς της, μπορεί να διαπερνά εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες και να αλληλεπιδρά με τους μεταφορείς μονοαμίνης (μεταφορείς ντοπαμίνης, σεροτονίνης και επινεφρίνης) στη συναπτική σχισμή, είτε εμποδίζοντας την επαναπρόσληψη νευροδιαβιβαστών ή αυξάνοντας την έκκρισή τους, οδηγώντας σε αυξημένη συγκέντρωση των νευροδιαβιβαστών στην συναπτική σχισμή [13,15,34].

Κεφάλαιο 1

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, εκτός από τις επιδράσεις στον εγκέφαλο, η καθιόννη επηρεάζει και το περιφερειακό νευρικό σύστημα, οδηγώντας κατά συνέπεια σε πολυάριθμες παρενέργειες, οι οποίες συνοψίζονται στο Σχήμα 1.4. Μερικές από τις παρενέργειες που προκαλεί η χρήση της είναι άρση αναστολέων (ενσυνείδηση), αυξημένη ενέργεια, άγχος, παράνοια, ευφορία. Επίσης, έχει δυσμενείς επιπτώσεις στον οργανισμό, αφού παρουσιάζονται νευρολογικά, καρδιακά και ψυχιατρικά προβλήματα, όπως ταχυκαρδία, αρτηριακή υπέρταση, παραισθήσεις, διέγερση, επιθετικότητα, υπερθερμία, ανορεξία και μεταβολές στην κινητική συμπεριφορά τα οποία μπορούν να οδηγήσουν μακροχρόνια σε μη αναστρέψιμες ψυχικές διαταραχές, ακόμη και σε θάνατο [1,41].



Σχήμα 1.4. Οξεία και χρόνια κλινική εκδήλωση δηλητηρίασης από καθιόννη [1].

Η καθιόννη, όπως και η αμφεταμίνη, μπορεί να τροποποιηθεί δομικά και να δώσει ένα τεράστιο αριθμό συνθετικών παραγώγων, τα οποία έχουν εμφανιστεί στην αγορά ναρκωτικών μεταξύ του 2008 και 2012 και αποτελούν τη δεύτερη μεγαλύτερη ομάδα NPS [1,42]. Όπου, όπως έχει δηλώσει το EMCDDA, στην αναφορά του για το έτος 2022, από τα 930 NPSs τα οποία είχαν καταγραφεί μέχρι το τέλος του 2022, τα 162 αντιστοιχούσαν σε νέες συνθετικές καθιόννες [17].

Όπως προαναφέρθηκε και στο Υποκεφάλαιο 1.1, ο πιο συνηθισμένος και απλούστερος τρόπος δομικής τροποποίησης είναι η προσθήκη ή αλλαγή της θέσης των υποκαταστατών ή η αλλαγή των υποκαταστατών είτε στην αλκυλική αλυσίδα είτε στον

Κεφάλαιο 1

αρωματικό δακτύλιο όπως φαίνεται διαγραμματικά στο Σχήμα 1.5 [7,9,10,35]. Οι συνθετικές καθιόνες είναι μια κατηγορία ενώσεων, οι οποίες προέρχονται από το (S)-2-αμινο-1-φαινυλο-1-προπανόνη (καθιόνη) [1] και ταξινομούνται κυρίως σε τέσσερις ομάδες, ανάλογα με τη δομή τους. Οι ομάδες αυτές είναι: (i) N-αλκυλιωμένα, (ii) 3,4-μεθυλενοδιοξυ-N-αλκυλιωμένα, (iii) N-πυρρολιδινυλο, (iv) 3,4-μεθυλενοδιοξυ-N-πυρρολιδινυλο παράγωγα καθιόνης [40,41].



Σχήμα 1.5. Τροποποιήσεις και θέσεις στις οποίες πραγματοποιείται τροποποίηση [43].

Τα τελευταία χρόνια, τα παράγωγα καθιόνης πωλούνται ως άσπρες ή έγχρωμες κρυσταλλικές σκόνες (crystalline powders) και σπάνια ως δισκία ή κάψουλες από τα αποκαλούμενα “smart shops” μέσω διαδικτύου, σε χαμηλές τιμές [16,40]. Στο παρελθόν, προϊόντα που περιείχαν παράγωγα καθιόνης, πωλούνταν συνήθως με τις ονομασίες “Legal Highs”, “Bath Salts” και “Research Chemicals” [16,40], όμως στην εποχή μας οι ίδιες ουσίες συχνά επισημαίνονται και με τις ονομασίες “conquerors of leeches”, “driver’s charms”, “additives to sand” και “bidet refreshers”. Πολύ συχνά οι ουσίες που φέρουν αυτές τις ονομασίες περιέχουν ένα συνδυασμό δύο ή περισσότερων παραγώγων καθιόνης μαζί με άλλες ουσίες όπως για παράδειγμα καφεΐνη, λιδοκαΐνη, ή βενζοκαΐνη [40].

1.2 Χειρομορφία

Η χειρομορφία αποτελεί σήμερα αναπόσπαστο κομμάτι της φαρμακευτικής ανάπτυξης και συνάμα της ακαδημαϊκής έρευνας. Ανακαλύφθηκε από τον Γάλλο χημικό Louis Pasteur το 1848. Ο Louis Pasteur, μελετώντας τους κρυστάλλους του ταρταρικού αμμωνιακού νατρίου παρατήρησε ότι τέτοιες χειρόμορφες ενώσεις υπάρχουν ως ζεύγος ουσιών, οι οποίες έχουν σχέση ειδώλου-αντικειμένου, δηλαδή δεν ταυτίζονται αλλά σχετίζονται μεταξύ τους όπως για παράδειγμα το δεξί με το αριστερό ανθρώπινο χέρι [36,44–46]. Η μοριακή χειρομορφία είναι ένα είδος στερεοϊσομέρειας και τα στερεοϊσομερή μίας ένωσης καλούνται εναντιομερή. Τα εναντιομερή είναι πολύ παρόμοια μεταξύ τους. Έχουν τον ίδιο χημικό τύπο, τις ίδιες φυσικές ιδιότητες (π.χ. σημείο βρασμού, σημείο τήξης, πυκνότητα), όμως διαφέρουν ως προς τη διάταξή τους στο χώρο αλλά και ως προς και τη φορά που στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός. Συγκεκριμένα, αν το ένα εναντιομερές περιστρέφει το φως προς τα δεξιά, το άλλο θα το περιστρέφει προς τα αριστερά. Έτσι λόγω αυτού, οι ενώσεις αυτές αποκαλούνται και ως οπτικώς ενεργές. Επιπρόσθετα, το ισόποσο μίγμα των δύο εναντιομερών καλείται ρακεμικό μίγμα, δεν είναι οπτικά ενεργό και συνεπώς δε στρέφει το επίπεδο του πολωμένου φωτός.

Για τον ορισμό αλλά και την ονοματολογία των εναντιομερών μίας χειρόμορφης ένωσης, έχουν προταθεί διάφοροι τρόποι. Ένας τρόπος είναι με βάση τη φορά που τα εναντιομερή στρέφουν το πολωμένο φως. Συγκεκριμένα, με βάση αυτό το τρόπο, εναντιομερή που στρέφουν το πολωμένο φως δεξιόστροφα αναγράφονται ως (+) ενώ αυτά που το στρέφουν αριστερόστροφα ως (-). Επίσης, ένας άλλος τρόπος ονοματολογίας ο οποίος χρησιμοποιείται από βιοχημικούς για περιγραφή της στερεοχημικής διαμόρφωσης αμινοξέων είναι αυτός της διαφοροποίησης των εναντιομερών σε D- (*dextro*) και L- (*levo*) (Σχήμα 1.6).

Παρόλα αυτά, η μέθοδος Cahn-Ingold-Prelog είναι ο πιο διαδεδομένος τρόπος ονοματολογίας, ο οποίος προτείνεται από την IUPAC. Με βάση αυτό τον τρόπο, τα εναντιομερή κατηγοριοποιούνται σε R- (*rectus*) και σε S- (*sinister*) τα οποία στα λατινικά σημαίνουν δεξιά και αριστερά αντίστοιχα. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί ότι η κατηγοριοποίηση των εναντιομερών βασίζεται στον καθορισμό της δομικής διαμόρφωσης και όχι με τη φορά στροφής του πολωμένου φωτός. Για τη

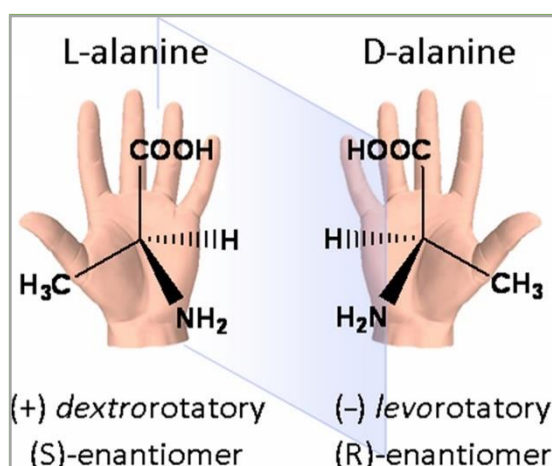
Κεφάλαιο 1

κατηγοριοποίηση των εναντιομερών σε R και S με τη μέθοδο Cahn-Ingold-Prelog, ακολουθούνται τρεις κανόνες.

1^{ος} Κανόνας: 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.

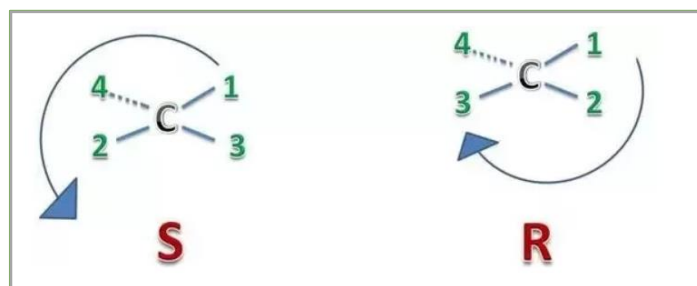
2^{ος} Κανόνας: Εάν δεν είναι δυνατός ο καθορισμός της προτεραιότητας από τον πιο πάνω κανόνα, τότε η σύγκριση γίνεται με τα δεύτερα σε σειρά συνδεδεμένα άτομα κάθε υποκαταστάτη (κ.ο.κ).

3^{ος} Κανόνας: 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 [47,48].



Σχήμα 1.6. Ονοματολογία Εναντιομερών [49].

Χαρακτηριστικό παράδειγμα χειρόμορφων ενώσεων είναι αυτό που ένα άτομο του άνθρακα είναι συνδεδεμένο με τέσσερις διαφορετικούς υποκατάστατες (Σχήμα 1.7) [50]. Όμως, εκτός από τα ασύμμετρα άτομα άνθρακα, κάποιες ενώσεις μπορεί να έχουν επίπεδη, αξονική ή ακόμα και ελικοειδή χειρομορφία. Επίσης, στις περιπτώσεις όπου μία ένωση έχει περισσότερα από ένα χειρόμορφα κέντρα, τότε η ταυτοποίηση των εναντιομερών είναι δύσκολη και πολύπλοκη λόγω της ύπαρξης περισσότερων από δύο πιθανών στερεοϊσομερών με τέσσερις διαφορετικές δομές [51].



Σχήμα 1.7. S και R εναντιομερή [52].

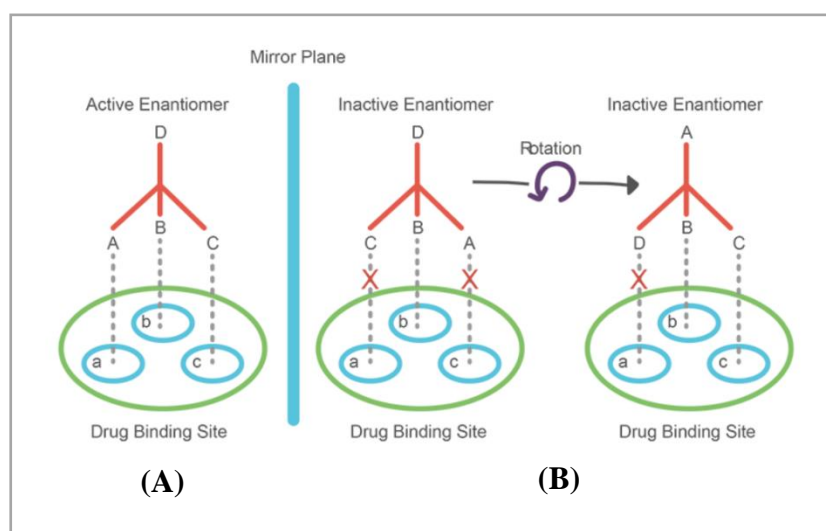
1.3 Χειρόμορφες Ενώσεις

Όλες οι νέες ψυχοδραστικές ενώσεις που βασίζονται στη δομή των αμφεταμινών, όπως και οι περισσότερες φαρμακευτικές ενώσεις, έχουν ασύμμετρα υποκατεστημένο άτομο άνθρακα. Είναι δηλαδή χειρόμορφες ενώσεις, οι οποίες απαντώνται σε δύο εναντιομερείς μορφές (στερεοϊσομερή), με δυνητικά διαφορετική φαρμακολογική συμπεριφορά [2,53–55]. Όπως είναι ευρέως γνωστό, τα εναντιομερή διαφέρουν στη φαρμακολογική, τοξικολογική και βιολογική τους δραστηριότητα, λόγω της διαφορετικής ικανότητας δέσμευσής τους στις πρωτεΐνες [53,56]. Συγκεκριμένα, τα εναντιομερή διαφέρουν, τόσο ως προς τη δράση του φαρμάκου, δηλαδή τις αλληλεπιδράσεις του φαρμάκου με τον βιολογικό στόχο (φαρμακοδυναμική), όσο και ως προς τη διάθεση του φαρμάκου (φαρμακοκινητική) [56,57]. Σε ένα χειρόμορφο περιβάλλον, όπως για παράδειγμα το ανθρώπινο σώμα, σε πολλές περιπτώσεις, μόνο το ένα εναντιομερές αποκαλούμενο και ως *eutomer* είναι αποτελεσματικό (Σχήμα 1.8A), επιφέρει δηλαδή το επιθυμητό αποτέλεσμα. Σε αντίθεση με το άλλο εναντιομερές, γνωστό με την ονομασία *distomer*, το οποίο μπορεί να είναι λιγότερο ισχυρό, αναποτελεσματικό, τοξικό και να οδηγεί σε παρενέργειες (Σχήμα 1.8B), γεγονός το οποίο εξηγείται με βάση τον κανόνα των τριών σημείων (Υποκεφάλαιο 1.4.2) [58].

Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι, λόγω της καινοτομίας αυτών των ενώσεων στη βιβλιογραφία υπάρχουν περιορισμένα τοξικολογικά και φαρμακολογικά δεδομένα για το ρακεμικό μίγμα καθώς και ελάχιστες πληροφορίες (σχεδόν καθόλου δεδομένα) σχετικά με τα απομονωμένα εναντιομερή των εν λόγω ενώσεων [18,19,54,59]. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν ήδη μερικές δημοσιεύσεις που ισχυρίζονται ότι το S-εναντιομερές της καθιόνης, είναι περισσότερο ενεργό σε σχέση με το αντίστοιχο R και το S-

Κεφάλαιο 1

εναντιομερές της αμφεταμίνης έχει ισχυρότερες επιδράσεις στο νευρικό σύστημα από ότι το αντίστοιχο R-εναντιομερές [18,60,61].



Σχήμα 1.8. Η διαφορά μεταξύ της αλληλεπίδρασης των δύο εναντιομερών ενός χειρόμορφου φαρμάκου με τον υποδοχέα [45].

Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε από μελέτες ότι το S (-) εναντιομερές της μεθαθινόνης και της καθινόνης προκαλούσε ισχυρότερη διέγερση στο κεντρικό νευρικό σύστημα από ότι, το R (+) εναντιομερές [39,60,62–65]. Ακόμα, μία μελέτη από τον Greg και την ερευνητική του ομάδα [66] αποκάλυψε ότι το R-εναντιομερές της μεφεδρόνης ήταν πολύ λιγότερο ισχυρό ως υπόστρωμα σε μεταφορείς 5-υδροξυτρυπταμίνης από το αντίστοιχο S-εναντιομερές, αποτέλεσμα το οποίο έρχεται σε συμφωνία με άλλες μελέτες. Επίσης, σε μια άλλη μελέτη διαπιστώθηκε ότι το S-εναντιομερές της αμφεταμίνης (Amphetamine, AMP) και της μεθυλαμφεταμίνης (Methamphetamine, MA), παρουσίασε πέντε φορές μεγαλύτερη φαρμακολογική δραστηριότητα έναντι στο R [67]. Επιπρόσθετα, το S-MDMA περιγράφεται ως το εναντιομερές που είναι υπεύθυνο για τις ψυχοδιεγερτικές ιδιότητες του αναλόγου αυτού σε αντίθεση με το R-ισομερές, το οποίο εμφανίζει περισσότερες παραισθησιογόνες ιδιότητες [56,67,68]. Έτσι, λόγω αυτής της διαφοροποίησης στη φαρμακολογική δράση ανάμεσα στα δύο εναντιομερή αλλά και λόγω της καινοτομίας των ενώσεων αυτών, καθίσταται αναγκαία η ανάπτυξη ενόργανων αναλυτικών μεθόδων για χειρόμορφο διαχωρισμό.

1.4 Χειρόμορφοι Διαχωρισμοί

Τις τελευταίες δεκαετίες αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι διαχωρισμού, από τις οποίες οι κυριότερες είναι οι χρωματογραφικές και οι ηλεκτροφορητικές. Η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) καθώς και η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς (Capillary Electrophoresis, CE), έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως με σκοπό τον εναντιομερή διαχωρισμό χειρόμορφων ενώσεων [69,70].

Η επίτευξη ενός εναντιομερούς διαχωρισμού προκαλείται λόγω των διάφορων αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται οι αναλύτες με το εναντιοεκλεκτικό μέσο [53]. Η αλληλεπίδραση του εναντιοεκλεκτικού μέσου, το οποίο καλείται χειρόμορφος επιλογέας (Chiral Selector, CS), με το ένα εναντιομερές της ουσίας προκαλεί την εκλεκτική κατακράτηση της σε χρωματογραφικά ή ηλεκτροφορητικά συστήματα. Έτσι, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός πολλών οπτικών ενεργών ισομερών [71,72].

Γενικά, η βασική αρχή του χειρόμορφου διαχωρισμού συνοψίζεται σε δύο κύριες κατηγορίες τεχνικών διαχωρισμού, την τεχνική άμεσου (direct) διαχωρισμού και την τεχνική έμμεσου (indirect) διαχωρισμού [73,74]. Η τεχνική άμεσου εναντιομερούς διαχωρισμού (direct chiral separation) χρησιμοποιείται συνήθως στις τεχνικές HPLC καθώς και στην τεχνική της CE [73,75]. Συγκεκριμένα, στην τεχνική αυτή γίνεται χρήση ενός CS, ο οποίος μπορεί να είναι είτε προσδεδμεμένος πάνω στη στατική φάση της στήλης, είτε διαλυμένος στην κινητή φάση. Σε αυτή την περίπτωση, ο εναντιομερής διαχωρισμός επιτυγχάνεται λόγω διαφορετικής αλληλεπίδρασης των στερεοϊσομερών με το CS [56,74]. Όμως, παρόλο που απαιτείται χρήση δαπανηρών χειρόμορφων στηλών (Chiral stationary phases, CSPs), δεν πραγματοποιείται προηγούμενο στάδιο παραγωγοποίησης όπως στην περίπτωση ενός έμμεσου χειρόμορφου διαχωρισμού [39,73,76].

Από την άλλη, για την επίτευξη ενός έμμεσου χειρόμορφου διαχωρισμού (indirect chiral separation), πραγματοποιείται μετατροπή των αναλυτών σε διαστερεοϊσομερή. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω παραγωγοποίησης των υπό μελέτη ενώσεων με τη χρήση οπτικά καθαρών χειρόμορφων μέσων παραγωγοποίησης (optically pure chiral derivatizing agents) αποκαλούμενων ως CDAs [76]. Έτσι, τα διαστερεοϊσομερή που προκύπτουν μπορούν να διαχωριστούν σε σύστημα GC με χρήση μη χειρόμορφης

Κεφάλαιο 1

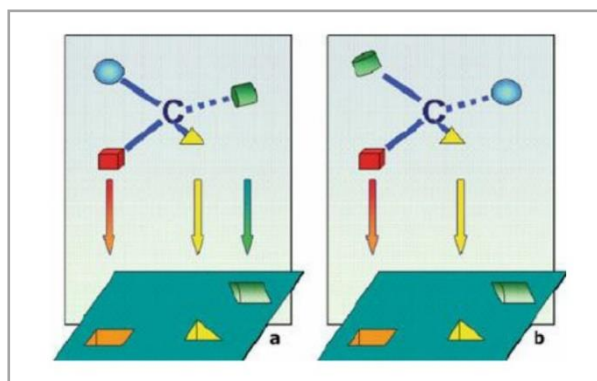
στήλης, λόγω των διαφορετικών φυσικών και χημικών ιδιοτήτων τους [39,56,73,76]. Επίσης, η αποφυγή της χρήσης δαπανηρών CSPs θεωρείται ως το κύριο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου διαχωρισμού, ενώ το απαιτούμενο στάδιο παραγωγοποίησης, θεωρείται ως το μειονέκτημα της [76].

1.4.1 Εναντιοεκλεκτικότητα

Η εναντιοεκλεκτικότητα είναι ένας τρόπος για την επίτευξη αποτελεσματικού διαχωρισμού των εναντιομερών. Καθορίζεται, από τις διάφορες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ του CS και των εναντιομερών μιας ουσίας. Συγκεκριμένα, αλληλεπίδραση του CS με το ένα εναντιομερές της ουσίας, οδηγεί σε εκλεκτική συγκράτηση της εν λόγω ουσίας σε ηλεκτροφορητικά ή χρωματογραφικά συστήματα. Έτσι, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός πολλών οπτικά ενεργών ισομερών [71,72].

1.4.2 Κανόνας των τριών σημείων

Ο «κανόνας των τριών σημείων» (three point rule), προτάθηκε το 1933 από τους ερευνητές Easson και Stedman. Οι ερευνητές αυτοί πρότειναν έναν ελάχιστο αριθμό αλληλεπιδράσεων που πρέπει να αναπτύσσονται μεταξύ του χειρόμορφου επιλογέα και του εναντιομερούς μορίου στόχου [77]. Έτσι, κρίνεται αναγκαία η αναγνώριση του προσανατολισμού κατά μήκος των τριών αξόνων μέσα στο χώρο, όπου τουλάχιστον τρία σημεία του επιλογέα θα αλληλεπιδρούν με τρία σημεία των εναντιομερών μορίων, τα οποία πρέπει να είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους (σχέση κλειδιού-κλειδαριάς). Επομένως, το ένα εναντιομερές μίας χειρόμορφης ένωσης θα πρέπει να πληροί το μοντέλο των τριών σημείων (Σχήμα 1.9α) σε αντίθεση με το άλλο (Σχήμα 1.9β).



Σχήμα 1.9. Μοντέλο τριών σημείων αλληλεπίδρασης (α) Εναντιομερές που πληροί το μοντέλο των τριών σημείων (β) Εναντιομερές που δεν πληροί το μοντέλο των τριών σημείων σημείων [78].

1.4.3 Είδη μοριακών αλληλεπιδράσεων

Η επίτευξη ενός αποτελεσματικού εναντιομερούς διαχωρισμού βασίζεται στη διαφορά των αλληλεπιδράσεων του CS με τα δύο εναντιομερή. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι πολλές και η ισχύς τους διαφέρει ανάλογα με τον τύπο της αλληλεπίδρασης. Αρχικά, οι ερευνητές πίστευαν ότι θα πρέπει να είναι ελκτικές, όμως μία καινούργια θεωρία αναφέρει ότι οι απωστικές δυνάμεις, όπως για παράδειγμα, στερεοχημικές παρεμποδίσεις, δρουν ως ένα άλλο είδος αλληλεπίδρασης. Συγκεκριμένα, 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 [78,79].

Ο ισχυρότερος τρόπος αλληλεπίδρασης είναι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Ακολουθούν οι δεσμοί υδρογόνου, οι οποίοι αναπτύσσονται, συνήθως, μεταξύ ενός υδρογόνου μιας υδροξυλομάδας ή αμινομάδας και ενός ατόμου οξυγόνου ή αζώτου. 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 μία χειρόμορφη αναγνώριση τα π-ηλεκτρόνια μίας ομάδας δότη ηλεκτρονίων (*π-donating group*) του εναντιομερούς αλληλεπιδρούν με τα π-ηλεκτρόνια μιας ομάδας δέκτη ηλεκτρονίων (*π-accepting*), και το αντίστροφο. Οι δυνάμεις ιόντος-διπόλου ακολουθούν σε σειρά ισχύς, καθώς και οι διπόλου-διπόλου. Τέλος, οι λιγότερο ισχυρές αλληλεπιδράσεις είναι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις [79].

1.5 Χειρόμορφοι Επιλογείς (CSs)

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, για την επίτευξη ενός αποτελεσματικού εναντιομερούς διαχωρισμού είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός μορίου το οποίο θα αλληλεπιδρά καλύτερα με το ένα από τα δύο εναντιομερή. Το μόριο αυτό αποκαλείται χειρόμορφος επιλογέας (Chiral Selector, CS). Οι CSs μπορούν είτε να προστίθενται (διαλυτοποιημένοι) στην κινητή φάση ή να είναι δεσμευμένοι πάνω στα τοιχώματα της

Κεφάλαιο 1

στήλης, δηλαδή της στατικής φάσης. Αλληλεπίδραση του CS με τα εναντιομερή, οδηγεί στη δημιουργία διαστεροϊσομερών συμπλόκων, διαφορετικής κινητικότητας τα οποία οδηγούν σε επιτυχή διαχωρισμό.

Ένας CS θεωρείται κατάλληλος εάν τηρεί κάποιες προϋποθέσεις. Συγκεκριμένα θα πρέπει να (i) έχει χαμηλή απορρόφηση στη φασματομετρία υπεριώδους (UV), με σκοπό να μην παρεμβάλλεται το σήμα του με το σήμα του αναλύτη, (ii) έχει υψηλή διαλυτότητα στο νερό και (iii) αλληλεπιδρά ελάχιστα με τα αρνητικά τοιχώματα του τριχοειδούς [80].

Κατά τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν χρησιμοποιηθεί πάρα πολλοί τύποι CSs, τόσο για την επίτευξη όσο και για τη βελτίωση του εναντιομερούς διαχωρισμού. Αυτοί οι CSs είναι κυρίως: κυκλοδεξτρίνες (Cyclodextrins, CDs), κυκλοφρουκτάνες (Cyclofructans, CFs), ολιγο- και πολυ-σακχαρίτες, μακροκυκλικά αντιβιοτικά, επιφανειοδραστικά πολυμερή, χειρόμορφοι αιθέρες στέμματος (chiral crown ethers), χειρόμορφα μεταλλικά σύμπλοκα καθώς και καλιξαρένια (calixarenes) [2,81,82]. Ωστόσο, οι CDs αντιπροσωπεύουν τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους CSs, τόσο σε ηλεκτροφορητικές [83] όσο και σε χρωματογραφικές μεθόδους, για εναντιομερή διαχωρισμό παραγώγων καθιόνης και αμφοταμίνης. Αυτό οφείλεται, λόγω της εναντιοεκλεκτικής τους ιδιότητας στο σχηματισμό συμπλόκων με τα εναντιομερή [74,81,82,84].

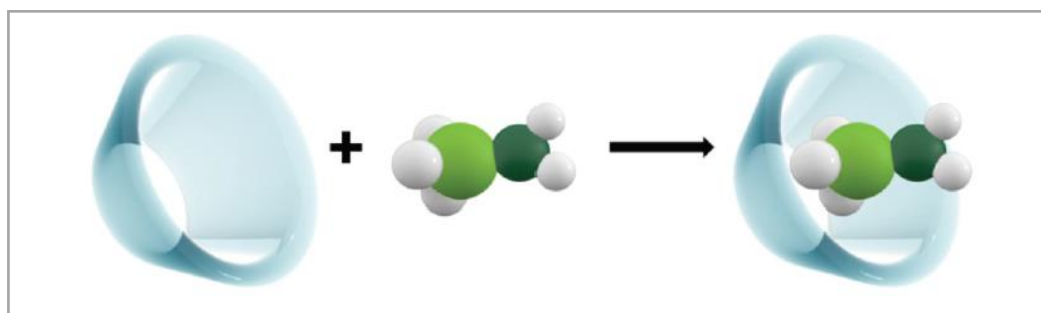
1.5.1 Κυκλοδεξτρίνες (CDs)

Οι CDs είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι CSs κατά το διαχωρισμό των οπτικά ενεργών μορίων, τόσο σε χρωματογραφικές, όσο και σε ηλεκτροφορητικές μεθόδους διαχωρισμού. Οι CDs είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες αποτελούμενοι από μόρια α -D-γλυκοπυρανόζης τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με α -1-4 γλυκοζιτικούς δεσμούς [70,84–87]. Η δομή τους προσομοιάζει το σχήμα κόλουρου κώνου (truncated cone), λόγω της έλλειψης ελεύθερης περιστροφής των γλυκοζιτικών δεσμών οι οποίοι συνδέουν τις μονάδες γλυκοπυρανόζης. Κάθε μονάδα γλυκοπυρανόζης (γλυκόζης), έχει τρεις υδροξυλομάδες [88]. Δύο από αυτές είναι δευτεροταγείς και μία είναι πρωτοταγής. Οι δευτεροταγείς υδροξυλομάδες, καθιστούν την εξωτερική επιφάνεια των CDs υδρόφιλη και είναι υπεύθυνες για την διαλυτότητα των CDs στο νερό. Επίσης,

Κεφάλαιο 1

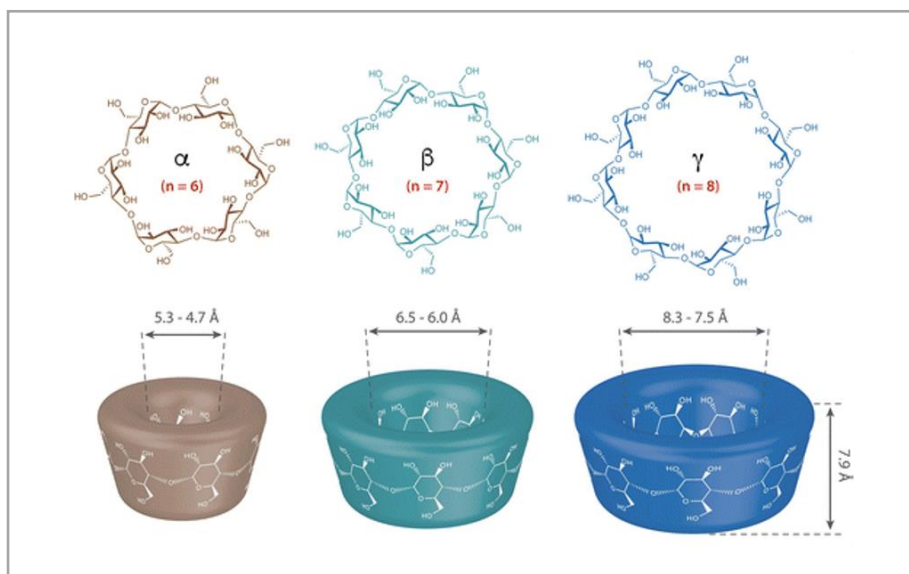
οι δευτεροταγής υδροξυλομάδες εντοπίζονται στο μεγαλύτερο στόμιο του κώνου (ευρύτερο άκρο), ενώ οι πρωτοταγείς στο μικρότερο στόμιο του κώνου (στενό άκρο). Αντίθετα με την εξωτερική επιφάνεια, η εσωτερική επιφάνεια των CDs είναι υδρόφοβη [74].

Επιπρόσθετα, εξαιτίας της ιδιαίτερης τους δομής, οι CDs είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν με μόρια κατάλληλου μεγέθους και να σχηματίσουν σύμπλοκα εγκλεισμού, μέσω υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδρασεων όπως για παράδειγμα δεσμών υδρογόνου (Σχήμα 1.10) [89]. Ως αποτέλεσμα της συμπλοκοποίησης, προκαλείται μεταβολή της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας (electrophoretic mobility, μ_{ep}) των υπό μελέτη αναλυτών και, ως εκ τούτου, βελτίωση της εκλεκτικότητας του διαχωρισμού.



Σχήμα 1.10. Σύμπλοκο εγκλεισμού. Αλληλεπίδραση host-guest [90].

Οι CDs διακρίνονται σε δύο ομάδες, τις φυσικές και τις παραγωγοποιημένες. Οι πιο κοινές και εμπορικά διαθέσιμες είναι οι φυσικές CDs, οι α -CD, β -CD και γ -CD, οι οποίες διαφέρουν ως προς τον αριθμό των μονάδων γλυκοπυρανόζης (Σχήμα 1.11). Πιο συγκεκριμένα, η α -CD αποτελείται από 6 μονάδες γλυκοπυρανόζης, η β -CD από 7 και η γ -CD από 8, αντίστοιχα. Παράλληλα, μπορεί να πραγματοποιηθεί παραγωγοποίηση των υδροξυλομάδων των CDs (μέσω αντίδρασης των υδροξυλομάδων των CDs με χημικά μόρια), προκειμένου να παραχθούν παράγωγα CDs με επιπλέον σημεία αλληλεπίδρασης ή και διαφορετική πολικότητα. Ο αριθμός των παραγωγοποιημένων CDs που έχει παραχθεί και μελετηθεί είναι αρκετά μεγάλος. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τροποποιημένων CDs, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως CSs για το χειρόμορφο διαχωρισμό τόσο σε ηλεκτροφορητικές, όσο και σε χρωματογραφικές μεθόδους είναι τα εξής: Θεϊικές CDs (Sulfated CDs, S-CDs), καρβοξυμεθυλικές CDs (Carboxymethyl CDs, CM-CDs), αλκυλικές καθώς και αρωματικές CDs [70,84,85,87,91].



Σχήμα 1.11. Δομές α-, β- και γ-CD [92].

1.5.2 Κυκλοφρουκτάνες (CFs)

Οι κυκλοφρουκτάνες (Cyclofructans, CFs), είναι μία πρόσφατα εμφανιζόμενη τάξη CS. Αποτελούν μία ομάδα μακροκυκλικών ολιγοσακχαριτών (γνωστές και ως κυκλοϊνουλο- ολιγοσακχαρίτες) και απαρτίζονται από β-2,1- συνδεδεμένες μονάδες D-φρουκτοφουρανόζης [93–96]. Επίσης, είναι προϊόντα της ενζυματικής “πέψης” (enzymatic digestion) της ινουλίνης από ένα εξωκυτταρικό ένζυμο (φρουκτανοτρανσφεράση) [93,94].

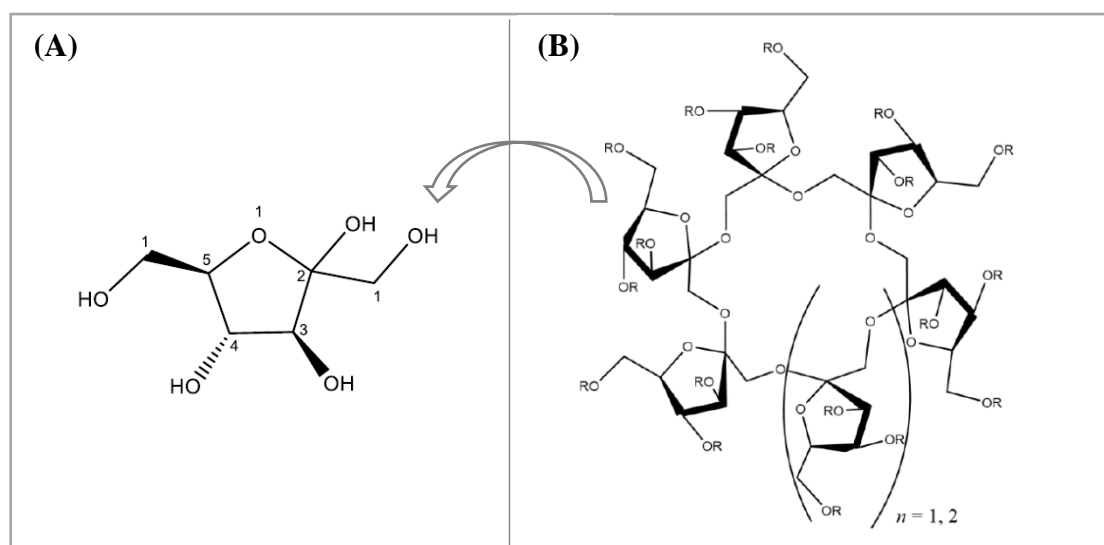
Σε σύγκριση με τις CDs, οι CFs παρουσιάζουν διαφορετικό μηχανισμό συμπλοκοποίησης και διαφορετικές ιδιότητες χειρόμορφης αναγνώρισης. Αυτό οφείλεται στο ότι σχηματίζουν μία δομή δίσκου με μια κεντρική εσοχή σχηματίζοντας ένα σκελετό αιθέρα στέμματος [80,93,96,97]. Λόγω αυτού, οι CFs παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με τους γνωστούς αιθέρες στέμματα.

Πιο συγκεκριμένα, η κύρια δομή των CFs αποτελείται από ένα σκελετό αιθέρα-στέμματος και μονάδες D-φρουκτοφουρανόζης (Σχήμα 1.12A), οι οποίες είναι συνδεδεμένες πάνω στον αιθερικό δακτύλιο σχηματίζοντας μία σπειροειδή διευθέτηση (spiral arrangement). 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 1.12B φαίνονται οι δομές των φυσικών CF-6, CF-7 και CF-8 [96].

Κεφάλαιο 1

Οι υδροξυλομάδες των μονάδων της φρουκτοφουρανόζης είναι διευθετημένες πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι αλκυλομάδες του δακτυλίου κάτω από το επίπεδο. Έτσι, η πάνω πλευρά θεωρείται σχετικά υδρόφιλη, ενώ η κάτω υδρόφοβη. Επιπλέον, οι υδροξυλομάδες στις θέσεις 3 και 4 συγκλίνουν προς τον αιθερικό δακτύλιο, ενώ οι αλκυλομάδες κάτω από το επίπεδο κρατούν «διπλωμένο» και σχετικά απομονωμένο τον αιθερικό δακτύλιο [80,98].

Στη βιβλιογραφία υπάρχει περιορισμένος αριθμός δημοσιεύσεων με χρήση CFs ως CSs στο διαχωρισμό εναντιομερών [80,95,99–101]. Εξ όσων γνωρίζουμε, είναι η πρώτη φορά που επιχειρείται η χρήση CFs, τόσο ουδέτερων όσο και παραγωγοποιημένων, ως CSs, για τη μελέτη της ικανότητας τους για εναντιοεκλεκτική αναγνώριση ψυχοδραστικών ενώσεων, γεγονός στο οποίο έγκειται και ένα μέρος της πρωτοτυπία της παρούσας διατριβής.



Σχήμα 1.12. (A) Η D-φρουκτοφουρανόζη, δομική μονάδα των CFs και (B) Αναπαράσταση της δομής των CFs, R= H. CF-6, και για n = 1 η CF-7 και n = 2 η CF-8 [96].

1.6 Ιοντικά Υγρά (ILs)

Τα ιοντικά υγρά (Ionic Liquids, ILs) είναι ιοντικές ενώσεις των οποίων το σημείο τήξης είναι ίσο ή μικρότερο από 100 °C. Αποτελούνται εξ ολοκλήρου από ιόντα, και, στις πλείστες των περιπτώσεων, δομούνται από ένα οργανικό κατιόν και ένα οργανικό ή ανόργανο ανιόν [102]. Γενικά, αποτελούνται από ογκώδη, μη συμμετρικά οργανικά κατιόντα (π.χ. κατιόν ιμιδαζολίου, πυρρολίου, πυριδίνης, αμμωνίου και φωσφονίου)

Κεφάλαιο 1

και από διάφορα οργανικά ή ανόργανα ανιόντα όπως για παράδειγμα τετραφθοροβορίδιο, οξικό ανιόν, ανιόν βρωμίου και χλωρίου [103]. Ωστόσο, όταν είτε το κατιόν, είτε το ανιόν, είτε και τα δύο έχουν χειρόμορφο κέντρο, τα ILs που προκύπτουν ονομάζονται χειρόμορφα ILs (Chiral Ionic Liquids, CILs) [104–106]. Πρόσφατα, μία νέα γενιά CILs που αποτελούνται από αμινοξέα και εστέρες αμινοξέων (Amino acid ester-based ionic liquids, AAILs) έχει συντεθεί και χρησιμοποιηθεί στην CE [107,108].

Τα ILs και τα AAILs παρουσιάζουν ξεχωριστές ιδιότητες όπως: (i) θερμική σταθερότητα, (ii) μηδενική τάση ατμών και (iii) δυνατότητα ρύθμισης του ιξώδους και της διαλυτότητάς τους στο νερό ή σε άλλους οργανικούς διαλύτες [102,104–106,109,110]. Επιπρόσθετα, ανάλογα με το συνδυασμό κατιόντος-ανιόντος, μπορούν να προκύψουν ILs διαφορετικής πολικότητας, σημείου τήξεως και ιξώδους και για αυτό συχνά χαρακτηρίζονται ως «designer solvents» [103].

Εξαιτίας των μοναδικών αυτών χαρακτηριστικών, αλλά και της σχετικά απλής τους σύνθεσης (one-step synthesis) [107,108], τα ILs έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της ευρύτερης επιστημονικής κοινότητας και έχουν βρει πολλές εφαρμογές στο ευρύτερο επιστημονικό πεδίο, κυρίως στους διαχωρισμούς με χρήση της GC, HPLC και CE [104,110].

Όσον αφορά την εφαρμογή τους στην CE, τα ILs έχουν χρησιμοποιηθεί, ως πρόσθετα στην κινητή φάση [95,99,111–116], όσο και ως τροποποιητές της επιφάνειας του τριχοειδούς (δυναμική και χημική τροποποίηση) [117] αλλά και ως CSs, στην περίπτωση των CILs [84,105,111].

Ως πρόσθετα στον BGE, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τους ίδιους τους αναλύτες μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου, οδηγώντας, έτσι, σε νέους μηχανισμούς διαχωρισμού. Επιπλέον, τα προερχόμενα από το IL κατιόντα είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν με τις αρνητικά φορτισμένες σιλιανομάδες της επιφάνειας του τριχοειδούς, μεταβάλλοντας, έτσι, την ηλεκτροωσμωτική ροή (Electroosmotic flow, EOF) του συστήματος. Επιπρόσθετα, η δυναμική επικάλυψη του τριχοειδούς (dynamic coating), με χρήση του IL ως το μόνο ηλεκτρολυτικό μέσο, προσφέρει τη δυνατότητα αλληλεπιδράσεων των αναλυτών, όχι μόνο με την κύρια μάζα του διαλύματος, αλλά και με την ίδια στήλη [117]. Ως επακόλουθο, μεταβάλλοντας ή ακόμα και αντιστρέφοντας την EOF [103]. Ωστόσο, η πιο συνηθισμένη χρήση των ILs

Κεφάλαιο 1

στην CE βασίζεται στη χρήση τους ως πρόσθετα στον BGE ο οποίος περιέχει CS, συνήθως CDs.

Πολλοί ερευνητές επικεντρώθηκαν στη χρήση των ILs και συγκεκριμένα των AAILs ως πρόσθετα στον ηλεκτρολύτη υποβάθρου (Background electrolyte, BGE), με απώτερο σκοπό την επίτευξη πλήρους διαχωρισμού διαφόρων ενώσεων. Ως εκ τούτου, εξ όσων γνωρίζουμε, δεν έχει αναφερθεί προηγουμένως ο οποιοσδήποτε συνδυασμός IL και CD ή CF για το χειρόμορφο διαχωρισμό ψυχοδραστικών ενώσεων. Υπό αυτές τις συνθήκες, στην Δ.Δ. μελετήθηκε λεπτομερώς, τόσο η δράση της CM-β-CD (CDs) σε συνδυασμό με τα AAILs του γαλακτικού μεθυλεστέρα της L-αλανίνης (L-Alanine methyl ester lactate, L-AlaC₁Cl), του γαλακτικού αιθυλεστέρα της L-αλανίνης (L-Alanine ethyl ester lactate, L-AlaC₂Cl), και του γαλακτικού τερτ βουτυλεστέρα της L-αλανίνης (L-Alanine tert-butyl ester lactate, L-AlaC₄Cl), όσο και τηςθειικής κυκλοφρουκτάνης-6 (Sulfated cyclofructan-6, SCF-6) κατά τον εναντιομερή διαχωρισμό της εν λόγω κατηγορίας ενώσεων.

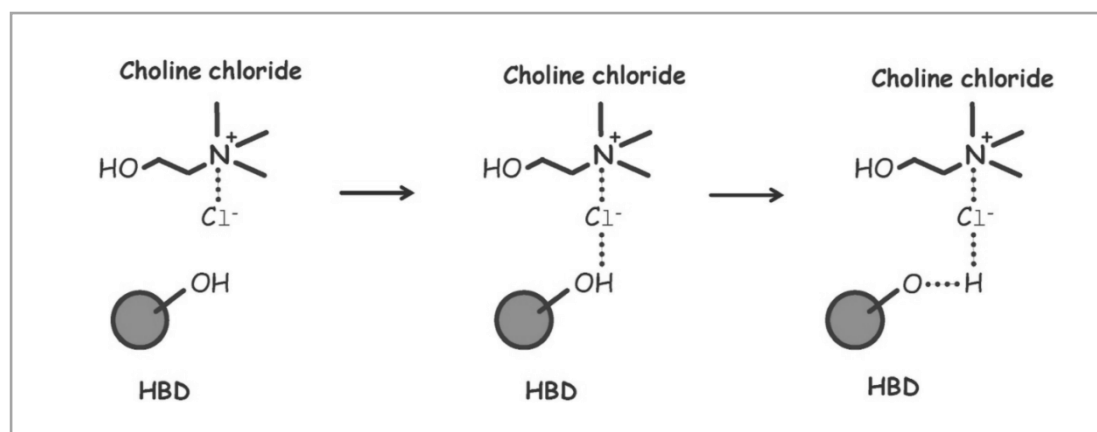
1.7. Εύτηκτοι Διαλύτες (DESSs)

Τα τελευταία χρόνια, έχει αναπτυχθεί μία καινούργια κατηγορία διαλυτών, οι εύτηκτοι διαλύτες (Deep Eutectic Solvents, DESs), και η χρήση τους έχει κερδίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Τα DESs είναι εύτηκτα μίγματα, τα οποία αποτελούνται συνήθως από δύο τουλάχιστον φθηνά και ασφαλή συστατικά που αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους μέσω δεσμών υδρογόνου. Συγκεκριμένα, αποτελούνται από δέκτες δεσμών υδρογόνου (Hydrogen bond acceptors, HBAs) και δότες δεσμού υδρογόνου (Hydrogen bond donors, HBDs) σε μία καθορισμένη αναλογία (molar ratio). Οι HBAs και HBDs αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω δεσμών υδρογόνου, για τον σχηματισμό εύτηκτου μίγματος, με σημείο τήξεως χαμηλότερο από 100 °C [110,118–120], όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.13. Αυτά τα συστατικά, ο δότης και δέκτης δεσμού υδρογόνου, θα πρέπει να διαθέτουν ασφαλή χαρακτηριστικά, συγκεκριμένα, να έχουν χαμηλή τοξικότητα, να είναι βιοανανεώσιμα και βιοαποικοδομήσιμα καθώς και να έχουν χαμηλό κόστος [121].

Ένα από τα πιο διαδεδομένα συστατικά που χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό των DES είναι η χλωριούχος χολίνη (Choline Chloride, ChCl). Πρόκειται για ένα πολύ

Κεφάλαιο 1

φθινό, θερμικά σταθερό, βιοαποικοδομήσιμο και μη τοξικό άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου που είτε εξάγεται από βιομάζα είτε συντίθεται εύκολα από ορυκτά αποθέματα μέσω μίας διαδικασίας υψηλής οικονομίας ατόμου. Μάλιστα, το πρώτο DES που αναφέρεται στη βιβλιογραφία αποτελείται από χλωριούχο χολίνη και ουρία (ChCl-Urea) σε μοριακή αναλογία 1:2. Έπειτα, η χλωριούχος χολίνη χρησιμοποιήθηκε ως άλας για την παραγωγή εύτηκτων μιγμάτων με φθινές και ασφαλείς ενώσεις HBDs όπως η ουρία, η γλυκερόλη, οι πολυόλες που προέρχονται από υδατάνθρακες ή ανανεώσιμες πηγές και καρβοξυλικά οξέα [120,122–124].



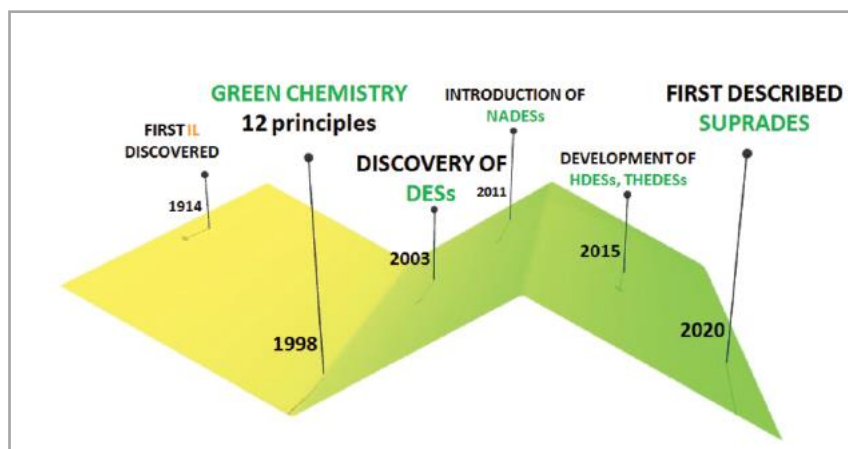
Σχήμα 1.13. Παρασκευή DES μέσω αλληλεπίδρασης HBD και HBA (Choline Chloride, ChCl) [125].

Παρόλο που αρκετές μελέτες ταξινομούν τα DESs ως μία νέα κατηγορία ILs, λόγω των παρόμοιων ιδιοτήτων τους, τα DESs δε μπορούν να θεωρηθούν ILs [121,126,127]. Αυτό οφείλεται στο ότι τα DESs δεν αποτελούνται εξ ολοκλήρου από ιοντικά είδη και μπορούν επίσης να ληφθούν από μη ιοντικά είδη [121]. Επιπρόσθετα τα DESs διαφέρουν από τα ILs καθώς: (i) θεωρούνται πιο φιλικά προς το περιβάλλον (έχουν μικρότερη περιβαλλοντική επίπτωση), (ii) έχουν μία πιο απλούστερη συνθετική πορεία, η οποία περιλαμβάνει την ανάμειξη του HBD και HBA σε μια συγκεκριμένη μοριακή αναλογία, χωρίς ωστόσο να απαιτούνται περαιτέρω στάδια καθαρισμού και (iii) έχουν χαμηλότερο κόστος [110,118,121,128,129].

Τα πολυάριθμα πλεονεκτήματα που προσφέρουν τα DESs, έχουν κάνει το θέμα της παρασκευής αλλά και της εφαρμογής τους να είναι δημοφιλές στην επιστημονική κοινότητα. Μετά την πρωτοποριακή τους ανακάλυψη το 2003 από τον Abbott *et al.* [126], διάφορες υποκατηγορίες DESs, εισήχθησαν στον επιστημονικό κόσμο κατά καιρούς και παρουσιάζονται διαγραμματικά στο Σχήμα 1.14. Συγκεκριμένα, οι υποκατηγορίες DES είναι, οι φυσικοί εύτηκτοι διαλύτες (Natural Deep Eutectic

Κεφάλαιο 1

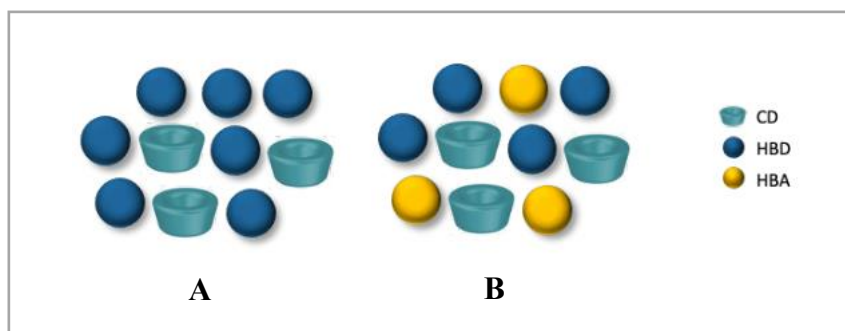
Solvents, NADESs), οι θεραπευτικοί εύτηκτοι διαλύτες (Therapeutic Deep Eutectic Solvents, THEDESs) και οι υδρόφοβοι εύτηκτοι διαλύτες (Hydrophobic Deep Eutectic Solvents, HDESs).



Σχήμα 1.14. Οι κυριότεροι σταθμοί στην εξέλιξη των DESs [90].

Συγκεκριμένα, όταν οι ενώσεις που αποτελούν το DES είναι πρωτογενείς μεταβολίτες, δηλαδή αμινοξέα, οργανικά οξέα, σάκχαρα ή παράγωγα χολίνης, τότε το DES ονομάζεται φυσικός εύτηκτος διαλύτης (NADES) [121,130]. Ενώ οι THEDESs, είναι βιοενεργά εύτηκτα συστήματα τα οποία έχουν εισαχθεί στο πλαίσιο των φαρμακευτικών επιστημών και αποτελούνται από ένα ενεργό φαρμακευτικό συστατικό (Active Pharmaceutical Ingredient, API) ως ένα από τα συστατικά του DES [121,131]. Τα HDESs, είναι μία κατηγορία από υδροφορικά DESs, τα οποία αποτελούνται από συστατικά με χαμηλή ή καθόλου υδατοδιαλυτότητα, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν κυρίως για εκχυλίσεις διάφορων χημικών ουσιών από υδατικά περιβάλλοντα [132,133].

Η συνεχής έρευνα για την παρασκευή των DESs, οδήγησε στην ανακάλυψη μίας ενδιαφέρουσας υποκατηγορίας, γύρω στο 2020, ονόματι υπερμοριακοί εύτηκτοι διαλύτες (Supramolecular Deep Eutectic Solvents, SUPRADESs). Τα SUPRADESs είναι ένα υπερμοριακό ευτηκτικό σύστημα, το οποίο αποτελείται από CDs ως (i) HBA, οι οποίες συνδέονται με ένα HBD (δυσιαδικό υπερμοριακό σύστημα), συνήθως λεβουλνικό οξύ (levulinic acid) [134–136] ή (ii) πρόσθετο στο DES (τριμερές υπερμοριακό σύστημα, ternary supramolecular system) [90,134,137], όπως παρουσιάζεται διαγραμματικά στο Σχήμα 1.15.



Σχήμα 1.15. (Α) Δυναδικό και (Β) Τριμερές υπερμοριακό σύστημα [137].

Επιπρόσθετα, τα SUPRADESs χαρακτηρίζονται από ιδιότητες εγλεισμού (inclusion properties), οι οποίες συνδυάζουν αποτελεσματικά τις ιδιότητες των DESs και των CDs, οι οποίες αναφέρθηκαν στο Υποκεφάλαιο 1.5.1. Συγκεκριμένα, η υπερμοριακή τους φύση η οποία οφείλεται αποκλειστικά στην παρουσία των CDs, επιτρέπει την επιλεκτική δέσμευση πολλών χημικών ενώσεων, οδηγώντας κατά συνέπεια, σε μία υποσχόμενη υποκατηγορία διαλυτών με απρόβλεπτες και πολυάριθμες ιδιότητες και εφαρμογές. Επιπρόσθετα, ο συνδυασμός των περιβαλλοντικών ιδιοτήτων των DESs (environmentally friendly properties), σε συνδυασμό με τις ιδιότητες των CDs, θα μπορούσαν να αποτελέσουν σημαντική ανακάλυψη στο πλαίσιο της πράσινης χημείας [90,134,137].

Παρά τις αμέτρητες εφαρμογές των DESs, στη βιβλιογραφία υπάρχει περιορισμένος αριθμός δημοσιεύσεων με χρήση των DESs ως πρόσθετα στον BGE για τη μελέτη χειρόμορφων διαχωρισμών στην CE [116,118,122,138–140]. Ωστόσο, τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από τις μελέτες αυτές, καταδεικνύουν την αποτελεσματικότητα της χρήσης τους σε συνδυασμό με CDs ως CSs. Ως εκ τούτου, η εφαρμογή τους σε αυτή την κατηγορία ενώσεων (ψυχοδραστικές ενώσεις) δεν έχει αναφερθεί. Επιπρόσθετα, αξίζει να τονιστεί ότι, εξ όσων γνωρίζουμε, σε καμία προηγούμενη μελέτη δεν έχει γίνει χρήση των DESs ως πρόσθετα στον BGE ο οποίος περιέχει CFs ως CSs.

Επίσης, ακόμη πιο περιορισμένος είναι και ο αριθμός των δημοσιεύσεων σχετικά με τη χρήση των SUPRADESs σε διάφορες εφαρμογές. Παρόλα αυτά, τα DESs που βασίζονται στις β-CDs, είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα [90]. Έτσι στο πλαίσιο της εν λόγω διατριβής, αναφέρεται για πρώτη φορά η παρασκευή ενός καινούργιου SUPRADES, το οποίο αποτελείται από θειϊκή-β-CD ως HBA και κιτρικό οξύ ως HBD. Εξ'όσων γνωρίζουμε, κανένα από τα παρασκευασθέντα DES τα οποία αναφέρονται

Κεφάλαιο 1

στη βιβλιογραφία, δεν έχει εφαρμοστεί ως μοναδικός CS για τον εναντιομερή διαχωρισμό οπτικά ενεργών ενώσεων. Έτσι, σε επόμενο στάδιο της διατριβής, διερευνήθηκε και αξιολογήθηκε με επιτυχία, η χρήση του προαναφερθέντος SUPRADES, για τον χειρόμορφο διαχωρισμό οπτικά ενεργών ενώσεων.

1.8 Μέθοδοι για εναντιομερή διαχωρισμό

Κατά καιρούς έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για εναντιομερή διαχωρισμό. Συγκεκριμένα, οι κυριότερες αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα με σκοπό τον εναντιομερή διαχωρισμό χειρόμορφων ενώσεων και κυρίως καθινονών και αμφεταμινών είναι τόσο χρωματογραφικές όπως, η HPLC και η GC, [21,39,42,141], όσο και ηλεκτροφορητικές, όπως η CE και η ηλεκτροχρωματογραφία τριχοειδούς [19,42,60,61,141–146].

Παρόλο που η GC και η HPLC είναι συνήθεις μέθοδοι για εναντιομερή διαχωρισμό, έχουν περιορισμούς. Συγκεκριμένα, ανάλυση στην GC απαιτεί συνήθως παραγωγοποίηση με χειρόμορφα αντιδραστήρια, ενώ ανάλυση στην HPLC περιλαμβάνει τη χρήση ακριβών χειρόμορφων στηλών [147]. Παρόλα αυτά, η τεχνική της CE θεωρείται μία ιδανική επιλογή για την επίτευξη χειρόμορφων διαχωρισμών, η οποία πλεονεκτεί έναντι των άλλων χρωματογραφικών τεχνικών λόγω υψηλής απόδοσης και ανάλυσης, μικρής κατανάλωσης αντιδραστηρίων και δειγμάτων, [82,148,149] μεγάλης ευελιξίας στην επιλογή του τύπου των CSs καθώς και λόγω του ότι δεν απαιτεί τη χρήση ακριβών CSPs αφού διεξάγει χειρόμορφους διαχωρισμούς μέσω προσθήκης CSs (κυρίως CDs) στον BGE [89,147].

Στη συνέχεια, αναφέρονται περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την εφαρμογή της εν λόγω τεχνικής (CE) στο χειρόμορφο διαχωρισμό ψυχοδραστικών ενώσεων. Οι βασικές αρχές που διέπουν την τεχνική αυτή, διατυπώνονται με λεπτομέρεια στο Κεφάλαιο 2.

1.8.1 Ηλεκτροφορητικές Τεχνικές-Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

Η CE αποτελεί μία υποσχόμενη μέθοδο διαχωρισμού, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για τον εναντιομερή διαχωρισμό ψυχοδραστικών ενώσεων. Όπως

Κεφάλαιο 1

προαναφέρθηκε, ο διαχωρισμός των ενώσεων στα εναντιομερή τους επιτυγχάνεται, μέσω της προσθήκης CSs (κυρίως CDs) στον BGE.

Αρκετές δημοσιεύσεις έχουν μέχρι στιγμής αναφέρει επιτυχή επίτευξη του χειρόμορφου διαχωρισμού ενός μεγάλου αριθμού ψυχοδραστικών ενώσεων με χρήση CDs ως CSs. Το 1998, η Lurie *et al.* [150], ανέφεραν τον χειρόμορφο διαχωρισμό αναλόγων NPSs με χρήση sulfobutylether-β-CDs. Αργότερα, το 2012, η ερευνητική ομάδα του Mohr *et al.* [81] εφάρμοσε τη χρήση θειϊκής β-CD (sulfated-β-CD), για το χειρόμορφο διαχωρισμό δεκαεννέα αναλόγων καθινόνης (ammonium acetate buffer solution, pH 4.5). Παράλληλα, ο Merola *et al.* [142] ανέπτυξε μια μέθοδο CE με ανιχνευτή UV και φασματόμετρο μάζας, η οποία επέτρεψε τον πλήρη εναντιομερή διαχωρισμό 12 παραγώγων καθινόνης με χρήση είτε της φυσικής, είτε της θειϊκής β-CD, αντίστοιχα. Ενώ πρόσφατα, ο Hagele *et al.* [2] διερεύνησε τον χειρόμορφο διαχωρισμό ενός μεγάλου αριθμού παραγώγων καθινόνης. Κατάφεραν να διαχωρίσουν στα εναντιομερή τους πενήντα-οκτώ από τα υπό μελέτη ανάλογα με χρήση τεσσάρων β-CDs (β-CD, Acetyl-β-CD, 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin [2-HP-β-CD], και carboxymethyl-β-cyclodextrin [CM-β-CD]).

Παρά την ευρεία χρήση των CDs ως CSs στην CE, στη βιβλιογραφία υπάρχει περιορισμένος αριθμός δημοσιεύσεων με χρήση CFs ως CSs στο χειρόμορφο διαχωρισμό ενώσεων [80,95,99–101,151]. Ως εκ τούτου, εξ όσων γνωρίζουμε δεν έχει αναφερθεί προηγουμένως η οποιαδήποτε χρήση CFs τόσο ουδέτερων όσο και παραγωγοποιημένων ως CSs, για τη μελέτη της ικανότητάς τους για εναντιοεκλεκτική αναγνώριση ψυχοδραστικών ενώσεων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον φαίνεται να παρουσιάζει η εφαρμογή των ILs στην CE, με τα ILs να έχουν χρησιμοποιηθεί, τόσο ως πρόσθετα στην κινητή φάση, όσο και για την παρασκευή του ίδιου του ηλεκτρολυτικού διαλύματος. Ενώ πρόσφατα, όλο και περισσότερες μελέτες αναφέρουν τη χρήση των DESs ως πρόσθετα στον BGE για τον χειρόμορφο διαχωρισμό ενώσεων στην CE [116,118,122,138–140].

1.9 Πρωτοτυπία Μελέτης

Τα τελευταία χρόνια, η παραγωγή των NPS αυξάνεται με μεγάλη ταχύτητα λόγω της περιορισμένης ικανότητας ανίχνευσης και παρακολούθησης αυτών των ενώσεων. Επιπρόσθετα, λόγω της ύπαρξης ενός στερεογονικού κέντρου στη δομή πολλών NPS, απαντώνται σε δύο εναντιομερείς μορφές με δυνητικά διαφορετική φαρμακολογική δράση. Συγκεκριμένα, μόνο ένας μικρός αριθμός δημοσιεύσεων ασχολείται με τις εναντιοεκλεκτικές επιδράσεις των NPS, αφού η σύνθεσή τους πραγματοποιείται σε μυστικά και παράνομα εργαστήρια. Δεδομένης της αυξημένης ανάγκης για μελέτη της φαρμακολογικής δράσης των καθαρών εναντιομερών, καθίσταται αναγκαία η ανάπτυξη ενόργανων αναλυτικών μεθόδων για χειρόμορφο διαχωρισμό. Η παρούσα διδακτορική έρευνα επικεντρώνεται στην αξιολόγηση και σύγκριση χειρόμορφων επιλογέων, ιοντικών υγρών και εύτηκτων διαλυτών για τον διαχωρισμό εναντιομερών ψυχοδραστικών ενώσεων στην ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς.

Υπό τις συνθήκες αυτές, σε πρώτο στάδιο, επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών για τον διαχωρισμό των υπό μελέτη ενώσεων. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της παρούσας έρευνας, μελετήθηκαν διάφορες ηλεκτροφορητικές παράμετροι, μεταξύ των οποίων, το είδος του CS (CDs, CFs), με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη μίας απλής και γρήγορης μεθόδου χειρόμορφου διαχωρισμού. Η χρήση των CFs ως CSs, μελετήθηκε για πρώτη φορά και επέτρεψε τον αποτελεσματικό διαχωρισμό ενός μεγάλου αριθμού αναλόγων.

Έχοντας ως απώτερο σκοπό την επίτευξη πλήρους διαχωρισμού των υπό μελέτη αναλυτών, σε επόμενο στάδιο, έλαβε χώρα μελέτη της επίδρασης AAILs καθώς και DESs ως πρόσθετα στον BGE. Αξίζει να σημειωθεί ότι η χρήση των DESs ως πρόσθετα, η οποία έγινε για πρώτη φορά στο πλαίσιο της συγκεκριμένης Δ.Δ., οδήγησε στον πλήρη χειρόμορφο διαχωρισμό των υπό μελέτη αμφεταμινών. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, εξήχθησαν σημαντικά συμπεράσματα για την πιθανή δράση των DESs (συνεργειακή/ανταγωνιστική) στα δυαδικά συστήματα CD/DES και CF/DES. Πρωτοτυπία αποτελεί, επίσης, η χρήση των DESs σε συνδυασμό με τις CFs. Εξ όσων γνωρίζουμε, δεν έχει αναφερθεί προηγουμένως η χρήση των DESs ως πρόσθετα στον BGE ο οποίος περιέχει CFs ως CSs. Ενώ σε επόμενο στάδιο, μέσω εφαρμογής της μεθοδολογίας επιφανειών απόκρισης (Response Surface Methodology,

Κεφάλαιο 1

RSM), πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών για τον εναντιομερή διαχωρισμό φθοριομένων αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης.

Τέλος, στο τέταρτο μέρος της εν λόγω διατριβής, παρασκευάστηκε για πρώτη φορά ένα SUPRADES, ονόματι S-β-CD-CA, το οποίο αποτελείτο από θειϊκή β-κυκλοδεξτρίνη (S-β-CD) ως HBA και κιτρικό οξύ (CA) ως HBD. Ενώ στη συνέχεια, το προαναφερθέν SUPRADES (S-β-CD-CA), εφαρμόστηκε ως μοναδικός CS στην CE και επέτρεψε τον εναντιομερή διαχωρισμό όλων των υπό μελέτη ενώσεων. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί ότι, μέχρι στιγμής δεν αναφέρεται η χρήση οποιουδήποτε SUPRADES ως CS για τον εναντιομερή διαχωρισμό χειρόμορφων ενώσεων, γεγονός στο οποίο έγκειται και η πρωτοτυπία της μελέτης αυτής.

2. Μεθοδολογία

2.1 Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδούς (CE)

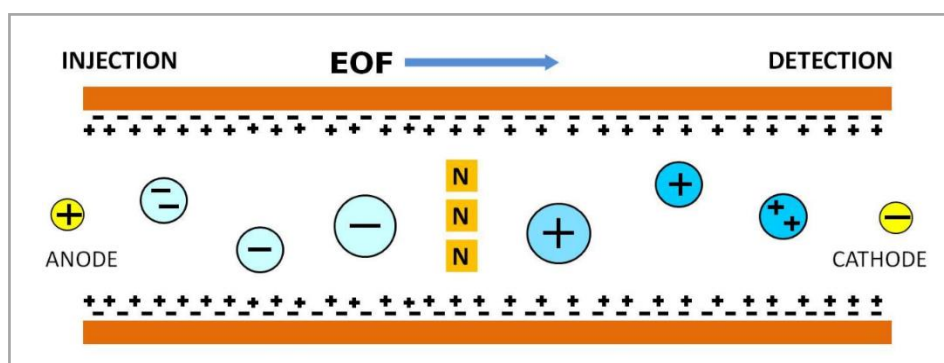
Η CE αποτελεί μία σύγχρονη τεχνική διαχωρισμού, η οποία μπορεί να θεωρηθεί ως η ενόργανη προσέγγιση της κλασικής ηλεκτροφόρησης [152]. Η ηλεκτροφόρηση είναι μία αναλυτική τεχνική διαχωρισμού η οποία αναπτύχθηκε για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1930 από τον χημικό Arnie Tiselius κατά τη μελέτη των πρωτεϊνών του ορού. Όπου για την εργασία αυτή βραβεύτηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1948 [153,154]. Στη συνέχεια, το 1967, δημοσιεύτηκε η πρώτη εργασία με εφαρμογή της ηλεκτροφόρησης σε ανοικτό σωλήνα, από τον ερευνητή Hjérten. Ο οποίος αναγνώρισε και ανέφερε τα πλεονεκτήματα που προσφέρει αυτή η μέθοδος διαχωρισμού [155], και τα οποία είναι: (i) υψηλή αποδοτικότητα, (ii) κατανάλωση μικρών όγκων δείγματος και (iii) μικρή κατανάλωση αντιδραστηρίων [152]. Ακολούθησαν οι μελέτες από τους Virtanen και Mikkers, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν σωλήνες από γυαλί και τεφλόν, εσωτερικής διαμέτρου 200 μm . Ενώ στις αρχές της δεκαετίας του 80 (1981), οι Jorgenson και Lukacs ανέπτυξαν την πρώτη μέθοδο ενόργανης ηλεκτροφόρησης, με χρήση τριχοειδών στηλών από τηγμένη πυρίτια, εσωτερικής διαμέτρου 75 μm . Η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό τόσο μικρών όσο και μεγάλων μορίων με μεγάλες αποδόσεις [156]. Μελέτη που αποτέλεσε τη βάση για τη θεμελίωση της τεχνικής CE στον τομέα των ενόργανων μεθόδων ανάλυσης [153].

Όπως στην περίπτωση της ηλεκτροφόρησης έτσι και στην περίπτωση της CE, ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται λόγω της διαφορετικής ταχύτητας όδευσης των φορτισμένων σωματιδίων (iónτων) σε ένα ηλεκτροφορητικό μέσο, κατά μήκος του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 2.1 [153]. Η ταχύτητα όδευσης των íοντων κατά μήκος της στήλης, εξαρτάται από το φορτίο και από το μέγεθος των íοντων. Επιπρόσθετα, στην CE, ο διαχωρισμός πραγματοποιείται μέσα σε τριχοειδείς στήλες, εσωτερικής διαμέτρου 10-100 μm και συνολικού μήκους 40-100 cm, πληρωμένες με τον BGE [152,153].

Η CE αποτελεί μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο διαχωρισμού στον τομέα της ανάλυσης. Η ευρεία της χρήση έγκειται κυρίως στην υψηλή της αποδοτικότητα, και

Κεφάλαιο 2

ευαισθησία, στους πολύ μικρούς χρόνους ανάλυσης που παρουσιάζει, αλλά και λόγω των μικρών απαιτήσεων της σε όγκους δείγματος και αντιδραστηρίων [152]. Επίσης, μερικά άλλα από τα πλεονεκτήματα της CE είναι η εύκολη προετοιμασία της στήλης διαχωρισμού (easy conditioning of the separation column), το χαμηλό κόστος λειτουργίας καθώς και η δυνατότητα χρήσης πολλών CSs, οι οποίοι όχι μόνο παρέχουν μεταβλητή εκλεκτικότητα αλλά συχνά αντιστρέφουν και τη σειρά έκλουσης (enantiomeric elution order) [84,152,157].



Σχήμα 2.1. Κίνηση των ιόντων προς την κάθοδο.

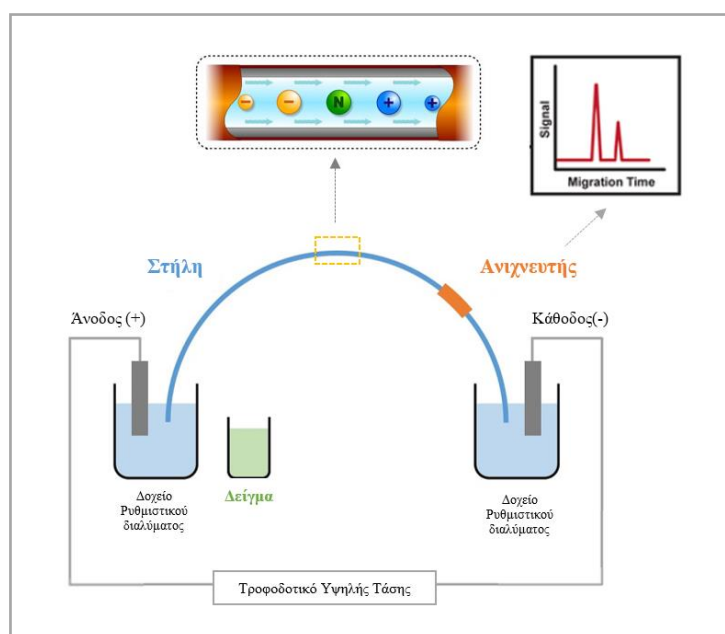
2.1.1 Οργανολογία

Η CE είναι μία τεχνική, η οποία χαρακτηρίζεται από σχετικά απλή οργανολογία. Στο Σχήμα 2.2, αναπαρίσταται μία γενική διάταξη ενός συστήματος της CE. Εν συντομία, ένα σύστημα CE αποτελείται από μία τριχοειδή στήλη από τηγμένη πυρίτια (fused silica capillary), διαμέτρου 10-100 μm και συνολικού μήκους 40-100 cm, τα άκρα της οποίας είναι βυθισμένα σε φιαλίδια που περιέχουν ηλεκτρολύτη υποβάθρου και μέσα στα οποία βρίσκονται βυθισμένα δύο ηλεκτρόδια λευκόχρυσου. Τα ηλεκτρόδια βρίσκονται συνδεδεμένα με το τροφοδοτικό υψηλής τάσης, ικανό να παρέχει διαφορά δυναμικού (εφαρμόσει τάση) μέχρι και 30 kV.

Για την πραγματοποίηση των διαχωρισμών, το δείγμα εισάγεται από το ένα άκρο του τριχοειδή σωλήνα (ανοδικό άκρο), ενώ εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Έτσι τα ιόντα του δείγματος κινούνται κατά μήκος της στήλης (προς την κάθοδο). Οι διαχωριζόμενοι αναλύτες παρατηρούνται μέσω ενός ανιχνευτή, ο οποίος τοποθετείται, συνήθως, στο αντίθετο άκρο [152].

Κεφάλαιο 2

Επιπρόσθετα, η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη μπορεί να γίνει είτε υδροδυναμικά είτε ηλεκτροκινητικά (όγκος εγχεόμενου δείγματος: συνήθως 5-10 nL ή ≤ 100 pL). Και στις δύο αυτές περιπτώσεις, το ένα άκρο του τριχοειδή σωλήνα, μαζί με το ηλεκτρόδιο του, απομακρύνονται από το δοχείο του ρυθμιστικού διαλύματος και τοποθετούνται σε ένα άλλο μικρό δοχείο που περιέχει το προς ανάλυση δείγμα. Ακολουθεί εφαρμογή διαφοράς δυναμικού/τάσης (ηλεκτροκινητική έγχυση) ή πίεσης (υδροδυναμική έγχυση) για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα και έτσι τα ιόντα του δείγματος κινούνται κατά μήκος της στήλης (προς την κάθοδο). Ακολούθως, μετά την έγχυση του δείγματος, τριχοειδές και ηλεκτρόδιο επαναφέρονται στο αρχικό δοχείο με τον BGE [152,158,159].



Σχήμα 2.2. Τυπική διάταξη ενός συστήματος CE.

2.1.2 Ανίχνευση

Οι πιο συνηθισμένες τεχνικές ανίχνευσης στην CE, είναι η απορρόφηση υπεριώδους-ορατού (Ultraviolet-Visible, UV-Vis), η χρήση του ανιχνευτή φθορισμού, η ηλεκτροχημική ανίχνευση και ο ανιχνευτής MS. Εκ των οποίων, η απορρόφηση UV/Vis αποτελεί τη συνηθέστερη τεχνική ανίχνευσης κατά τη διάρκεια των ηλεκτροφορητικών διαχωρισμών, λόγω της μεγάλης συμβατότητάς του με το σύστημα CE.

Κεφάλαιο 2

Στην περίπτωση των ανιχνευτών UV/Vis (190-600 nm), η ανίχνευση πραγματοποιείται πάνω στην ίδια τη στήλη (on column), η οποία και λειτουργεί ως κυψελίδα ανίχνευσης. Συγκεκριμένα, σε ένα μέρος της τριχοειδούς στήλης, ένα μικρό τμήμα της προστατευτικής επίστρωσης πολυιμιδίου αφαιρείται, και, έτσι, παραμένει εκτεθειμένη η διάφανη τηγμένη πυρίτια, η οποία μπορεί να λειτουργήσει ως παράθυρο ανίχνευσης. Ο διαχωρισμός ωστόσο, συνεχίζει να πραγματοποιείται ακόμα και όταν η ουσία βρίσκεται στο παράθυρο ανίχνευσης κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης [160]. Επιπρόσθετα, εξαιτίας του μικρού μήκους της οπτικής διαδρομής, η οποία περιορίζεται στην εσωτερική διάμετρο του τριχοειδούς (50 με 100 μm), παρατηρούνται σχετικά υψηλά όρια ανίχνευσης (10^{-5} - 10^{-6} M) [159]. Οι ανιχνευτές UV/Vis μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση της απορρόφησης σε ένα μόνο μήκος κύματος, ή, στην περίπτωση των ανιχνευτών συστοιχίας διόδων (Diode Array Detector, DAD), για την ταυτόχρονη παρακολούθηση της απορρόφησης σε πολλαπλά μήκη κύματος του ορατού και υπεριώδους φάσματος [152,158].

2.1.3 Βασικές Αρχές CE

Στην CE, η ταχύτητα μετανάστευσης ενός ιόντος καθορίζεται από δύο παράγοντες, την ηλεκτροφορητική του ταχύτητα και την ταχύτητα ροής της κύριας μάζας του διαλύματος, (Electroosmotic Flow, EOF), σύμφωνα με τη σχέση:

$$v = v_{ep} + v_{eo} \quad \text{Εξίσωση 2.1.}$$

όπου v : η ταχύτητα του ιόντος ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$), v_{ep} : η ηλεκτροφορητική ταχύτητα του ιόντος ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) και v_{eo} : η ταχύτητα της EOF ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$).

Η ηλεκτροφορητική ταχύτητα (v_{ep}), περιγράφει την κίνηση ενός ιόντος μέσα στο τριχοειδές όταν σε αυτό εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο. Είναι ίση με το γινόμενο της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας του ιόντος (μ_{ep}) και της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου (E), σύμφωνα με την Εξίσωση 2.2:

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E = \mu_{ep} \cdot \left(\frac{V}{L}\right) \quad \text{Εξίσωση 2.2.}$$

Κεφάλαιο 2

όπου v_{ep} : η ηλεκτροφορητική ταχύτητα του ιόντος ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$), μ_{ep} : η ηλεκτροφορητική ευκινησία του ιόντος ($\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) και E : η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου ($\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$), η οποία καθορίζεται από την τιμή της εφαρμοζόμενης τάσης (V , V) και το μήκος της στήλης (L , cm).

Η ηλεκτροφορητική ευκινησία (μ_{ep}), είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ των ηλεκτροστατικών δυνάμεων και των δυνάμεων τριβής που ασκούνται σε ένα ιόν όταν αυτό κινείται υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου. Συγκεκριμένα, με εφαρμογή ενός σταθερού ηλεκτρικού πεδίου, τα ιόντα υπόκεινται σε μία ηλεκτροστατική δύναμη, F_e , η οποία τα επιταχύνει ως προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο και είναι ανάλογη του φορτίου του ιόντος (q) και της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου (E), σύμφωνα με τη σχέση:

$$F_e = q \cdot E \quad \text{Εξίσωση 2.3.}$$

Μέσα σε ένα διάλυμα, η επιβραδυντική δύναμη της τριβής, FF , που ασκείται στο ιόν, εξισορροπεί την ηλεκτροστατική δύναμη και μειώνει την ταχύτητα των ιόντων σύμφωνα με τη σχέση:

$$FF = -6\pi\cdot\eta\cdot r\cdot v_{ep} \quad \text{Εξίσωση 2.4.}$$

όπου FF : η δύναμη της τριβής, η : το ιξώδες του διαλύματος, r : η ιοντική ακτίνα (για σφαιρικό ιόν) και v_{ep} : η ηλεκτροφορητική ταχύτητα του ιόντος.

Στο σημείο ισορροπίας των δύο αυτών δυνάμεων, η ηλεκτροστατική δύναμη ισούται με την επιβραδυντική δύναμη της τριβής ($F_e=FF$). Έτσι, με αντικατάσταση των πιο πάνω εξισώσεων, εξάγεται η σχέση της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας (μ_{ep}):

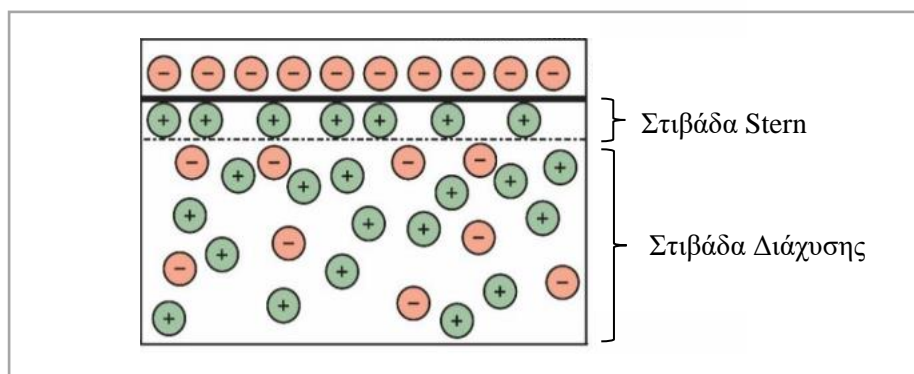
$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad \text{Εξίσωση 2.5.}$$

Όπου σύμφωνα με την πιο πάνω εξίσωση (Εξίσωση 2.5), η ηλεκτροφορητική ευκινησία είναι ανάλογη του ιοντικού φορτίου του αναλύτη και αντιστρόφως ανάλογη των επιβραδυντικών παραγόντων τριβής.

Κεφάλαιο 2

Συνεπώς, δύο ουσίες πρόκειται να διαχωριστούν μεταξύ τους, εάν διαφέρουν, είτε ως προς το φορτίο τους, είτε ως προς τις δυνάμεις τριβής που υφίστανται κατά την κίνησή τους στον BGE. Έτσι όπως αποδεικνύεται από την Εξίσωση 2.5, μικρά σε μέγεθος και μεγάλα σε φορτίο ιόντα πρόκειται να παρουσιάσουν μεγάλες ηλεκτροφορητικές ευκινησίες, σε αντίθεση με τα μεγάλα ιόντα με μικρό φορτίο που αναμένεται να παρουσιάσουν μικρότερες τιμές. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος φορτίο-προς-μέγεθος ενός ιόντος τόσο γρηγορότερα κινείται ένα ιόν. Αντιθέτως, τα ουδέτερα σωματίδια δεν είναι δυνατό να διαχωριστούν.

Επιπρόσθετα, κατά την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού κατά μήκος ενός τριχοειδή σωλήνα, ο οποίος περιέχει BGE, λαμβάνει χώρα ένα φαινόμενο γνωστό ως ηλεκτροοσμωτική ροή, ή αλλιώς όπως αποκαλείται EOF (Electroosmotic Flow), σύμφωνα με το οποίο προκαλείται ροή της κύριας μάζας του διαλύματος, είτε προς την κάθοδο, είτε προς την άνοδο. Αιτία της δημιουργίας της είναι η ηλεκτρική διπλοστιβάδα, που αναπτύσσεται μεταξύ της αρνητικά φορτισμένης επιφάνειας της τριχοειδούς στήλης και της κύριας μάζας του διαλύματος. Σε τιμές pH μεγαλύτερες από 3, προκαλείται αποπρωτονίωση των σιλανομάδων του εσωτερικού τοιχώματος της στήλης ($\text{SiOH} \rightarrow \text{SiO}^-$), με αποτέλεσμα αυτή να φορτίζεται αρνητικά. Έτσι, αντισταθμιστικά ιόντα τείνουν να προσροφώνται σε αυτήν μέσω ηλεκτροστατικής έλξης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας ηλεκτρικής διπλοστιβάδας και μίας διαφοράς δυναμικού (δυναμικό ζ) κοντά στα τοιχώματα του τριχοειδούς. Το γεγονός αυτό εξισορροπεί το αρνητικό φορτίο της επιφάνειας του τριχοειδούς, μέσω της δημιουργίας μίας σταθερής, άκαμπτης στιβάδας προσροφημένων ιόντων, η οποία αποκαλείται στιβάδα Stern, και μίας εξωτερικής στιβάδας διάχυσης. Κατά την εφαρμογή δυναμικού κατά μήκος του τριχοειδούς, τα κατιόντα της διάχυτης εξωτερικής στιβάδας έλκονται προς την κάθοδο (αποκτούν ταχύτητα όδευσης προς την κάθοδο) και λόγω του ότι είναι επιδιαλυτωμένα, παρασύρουν μαζί τους και την κύρια μάζα του διαλύματος (Σχήμα 2.3).



Σχήμα 2.3. Κατανομή φορτίου στη διεπιφάνεια της τριχοειδούς στήλης.

Κεφάλαιο 2

Η ταχύτητα της EOF είναι γενικά μεγαλύτερη από την ηλεκτροφορητική ταχύτητα των ιόντων και περιγράφεται από τη σχέση:

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E = \left(\frac{\epsilon\zeta}{\eta}\right)\left(\frac{V}{L}\right) \quad \text{Εξίσωση 2.6.}$$

όπου v_{eo} : η ηλεκτροωσμωτική ταχύτητα ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$), μ_{eo} : η ηλεκτροωσμωτική ευκινησία ($\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), η οποία περιγράφεται από τον λόγο του γινομένου της διηλεκτρικής σταθεράς του ρυθμιστικού διαλύματος (ϵ) και του δυναμικού ζήτα της επιφάνειας του τριχοειδούς (ζ) ως προς το ιξώδες του ηλεκτρολυτικού διαλύματος (η), και E : η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου ($\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$), η οποία ισούται με τον λόγο της εφαρμοζόμενης τάσης (V) ως προς το συνολικό μήκος της στήλης (L).

Αν και οι αναλύτες μετακινούνται μέσα στο τριχοειδές ανάλογα με το φορτίο τους (με βάση την ηλεκτροφορητική τους ταχύτητα), η ηλεκτροωσμωτική ταχύτητα είναι επαρκής ούτως ώστε να παρασύρει όλα τα θετικά, ουδέτερα, ακόμα και τα αρνητικά σωματίδια προς το ίδιο άκρο του τριχοειδούς έτσι, ώστε να μπορούν να ανιχνευθούν καθώς διέρχονται από ένα κοινό σημείο. Η ηλεκτροφορητική και ηλεκτροωσμωτική ταχύτητα μίας ουσίας μπορούν να δρουν ως προς την ίδια ή σε αντίθετες κατευθύνσεις, ανάλογα με το φορτίο του ιόντος. Συγκεκριμένα, όταν η επιφάνεια του τριχοειδούς είναι αρνητικά φορτισμένη (κανονικές συνθήκες), η ροή της κινητής φάσης πραγματοποιείται από την άνοδο προς την κάθοδο. Ως αποτέλεσμα, τα κατιόντα, τα οποία μετακινούνται στην ίδια κατεύθυνση με την EOF, κινούνται ταχύτερα και εξέρχονται πρώτα από τη στήλη. Αντίθετα, τα ανιόντα τα οποία μετακινούνται προς την άνοδο (σε αντίθετη κατεύθυνση), παρουσιάζουν μικρότερες ταχύτητες και διέρχονται τελευταία από τον ανιχνευτή.

Συνεπώς, η σειρά έκλουσης σε ένα τυπικό ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό, η οποία παρουσιάζεται και διαγραμματικά στο Σχήμα 2.1 είναι η ακόλουθη: πρώτα το ταχύτερο κατιόν (μεγάλο θετικό φορτίο και μικρό μέγεθος), ακολουθούμενο από τα διαδοχικώς βραδύτερα κατιόντα (μικρότερα φορτία και μεγαλύτερα μεγέθη), έπειτα τα μη διαχωριζόμενα ουδέτερα σωματίδια, ως μια ζώνη, και τέλος το βραδύτερο ανιόν (μικρό αρνητικό φορτίο και μεγάλο μέγεθος), ακολουθούμενο από τα διαδοχικώς ταχύτερα ανιόντα (μεγάλα φορτία και μικρά μεγέθη).

Αντίθετα, στην περίπτωση χρήσης ενός κατιονικού επιφανειοδραστικού στον BGE, η κατεύθυνση της EOF μπορεί να αναστραφεί. Αυτό οφείλεται στο ότι το

Κεφάλαιο 2

επιφανειοδραστικό, το οποίο είναι θετικά φορτισμένο, προσροφάται στα τοιχώματα του τριχοειδούς, φορτίζοντάς το θετικά. Ως αποτέλεσμα, τα ανιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος συγκεντρώνονται κοντά στην επιφάνεια του τριχοειδούς και με την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου παρασύρονται προς την κάθοδο, δηλαδή το θετικό ηλεκτρόδιο.

Ο χρόνος (t_m) που απαιτείται για να διανύσει μία διαλυμένη ουσία την απόσταση (l) από το σημείο εισαγωγής της στον τριχοειδή μέχρι το σημείο ανίχνευσής της, η αλλιώς αποκαλούμενο ως δραστικό μήκος τριχοειδούς, δίνεται από την Εξίσωση 2.7:

$$t_m = \frac{l}{v_{ep} + v_{eo}} = \frac{lL}{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V} \quad \text{Εξίσωση 2.7.}$$

όπου t_m : ο χρόνος μετανάστευσης της ουσίας, v_{ep} και v_{eo} : η ηλεκτροφορητική και ηλεκτροωσμωτική ταχύτητα, αντίστοιχα, l : το δραστικό μήκος της στήλης και L : το συνολικό μήκος του τριχοειδούς.

Αντίστοιχα, μπορούν να προσδιοριστούν οι ηλεκτροωσμωτικές (μ_{eo}) και ηλεκτροφορητικές ευκινησίες, σύμφωνα με την Εξίσωση 2.8 και 2.9, με βάση τους χρόνους μετανάστευσης των αναλυτών (t_m) και του ουδέτερου δείκτη (δηλαδή της EOF) (t_{eo}).

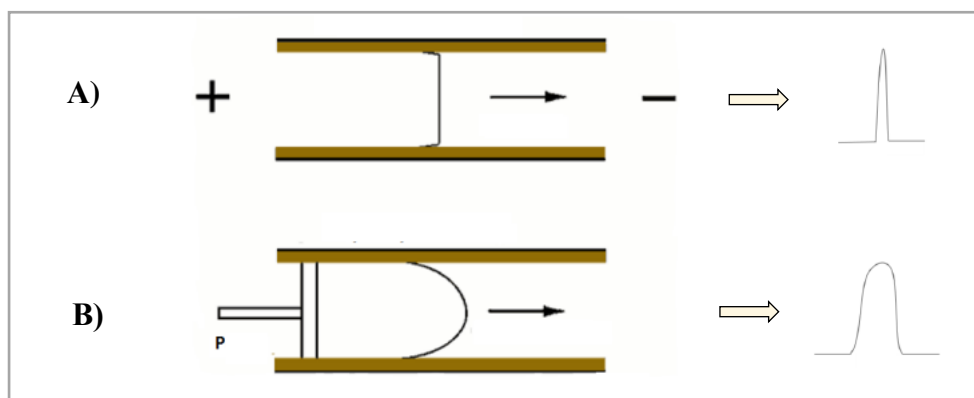
$$\mu_{eo} = \frac{lL}{t_{eo}V} \quad \text{Εξίσωση 2.8.}$$

$$\mu_{ep} = \frac{lL}{V} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{eo}} \right) \quad \text{Εξίσωση 2.9.}$$

Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό της EOF είναι ότι κατανέμεται ομοιόμορφα (επίπεδα) κατά μήκος της τριχοειδούς στήλης. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.4A, η κινητήρια δύναμη της ροής (δηλαδή το αρνητικό φορτίο στα τοιχώματα του σωλήνα) είναι ομοιόμορφα κατανεμημένη κατά μήκος της τριχοειδούς στήλης. Ως αποτέλεσμα να μην παρατηρείται πτώση της πίεσης και η ροή του διαλύματος να είναι ομοιόμορφη σε ολόκληρη τη στήλη. Σε αντίθεση με την παραβολική κατανομή (παραβολική ή τυρβώδης ροή), που συναντάται σε ροή προκαλούμενη από εφαρμογή υψηλής εξωτερικής πίεσης (π.χ. υδροχρωματογραφία), όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.4B.

Κεφάλαιο 2

Αυτή η επίπεδη κατανομή αποτελεί ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα της CE σε σύγκριση με άλλες τεχνικές, αφού δε συνεισφέρει σημαντικά στη διεύρυνση των ζωνών, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση του διαχωρισμού και ενισχύει επίσης την αποδοτικότητα των κορυφών [152,153,158–161].



Σχήμα 2.4. Κατανομή ροής υγρών υπό την επίδραση (A) ηλεκτροωσμωτικής πίεσης και (B) υδροδυναμικής πίεσης.

2.1.4 Τεχνικές CE

Κατά τη διάρκεια των χρόνων έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές CE. Κάθε τρόπος λειτουργίας παρουσιάζει το δικό του μοναδικό μηχανισμό διαχωρισμού, με αποτέλεσμα να καθίσταται δυνατή η ανάλυση μιας ευρείας κλίμακας ενώσεων. Γεγονός στο οποίο έγκειται και η χρήση της CE σε μια πληθώρα εφαρμογών.

Στον Πίνακα 2.1 συνοψίζονται οι διάφοροι τρόποι λειτουργίας της CE και η αρχή στην οποία βασίζεται ο διαχωρισμός στην κάθε περίπτωση. Μεταξύ των τεχνικών που αναπτύχθηκαν, η CZE και η EKC αποτελούν τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ηλεκτροφορητικές τεχνικές διαχωρισμού [72,152,160].

Πίνακας 2.1. Βασικότερες μέθοδοι CE και η αρχή στην οποία βασίζεται ο διαχωρισμός [72].

Τεχνική CE	Αρχή διαχωρισμού
Ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς (CZE)	Κίνηση σε ελεύθερο διάλυμα / Φορτίο ως προς μέγεθος
Ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (EKC)	Υδρόφοβες/ιοντικές αλληλεπιδράσεις με πρόσθετα/ψευδοστατική φάση (π.χ. μικύλλια, CDs)
Ηλεκτροχρωματογραφία τριχοειδούς (CEC)	Υδρόφοβες/ιοντικές αλληλεπιδράσεις με στατική φάση (υλικό πλήρωσης ή επικάλυψη στήλης)

Κεφάλαιο 2

Ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς πηκτής (CGE)	Μέγεθος και φορτίο μορίου
Ισοηλεκτρική εστίαση τριχοειδούς (CIEF)	Ισοηλεκτρικό σημείο
Ισοταχυφόρηση τριχοειδούς (CITP)	Κινούμενα μέτωπα/Μετανάστευση σε όρια ανάλογα με το λόγο φορτίο ως προς μέγεθος

2.1.4.1 Ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς (CZE)

Η CZE αποτελεί την απλούστερη και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο διαχωρισμού στη CE [159]. Στην τεχνική αυτή, οι ουσίες διαχωρίζονται σε τριχοειδές που περιέχει μόνο BGE και ο μηχανισμός του διαχωρισμού βασίζεται στις βασικές αρχές της ηλεκτροφόρησης (στις διαφορετικές ηλεκτροφορητικές ευκινησίες των ιόντων) (Υποκεφάλαιο 2.1.3) [153]. Κατά την CZE, τα συστατικά του δείγματος κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες και διακρίνονται, έτσι, σε ξεχωριστές ζώνες [152,153]. Με αυτή την τεχνική CE, είναι δυνατό να διαχωριστούν οι θετικά και αρνητικά φορτισμένοι αναλύτες, όχι όμως και τα ουδέτερα συστατικά τα οποία παρασύρονται από την EOF και συνεκλούνται μαζί της [152,153].

2.1.4.2 Ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (EKC)

Η EKC αποτελεί ένα υβρίδιο της CE και της υγροχρωματογραφίας και η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό, τόσο φορτισμένων, όσο και ουδέτερων αναλυτών. Βασικό χαρακτηριστικό της EKC, είναι η παρουσία προσθέτου στον BGE το οποίο λειτουργεί ως ψευδοστατική φάση (pseudostationary phase) και το οποίο αλληλεπιδρά σε διαφορετικό βαθμό με τον κάθε αναλύτη. Ως ψευδοστατικές φάσεις έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως τα μικύλλια (τασιενεργά μόρια), ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον φαίνεται να παρουσιάζουν και οι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες (π.χ κυκλοδεξτρίνες, CDs) [152].

Μικυλλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία τριχοειδούς (MEKC)

Ως MEKC, αναφέρεται η CE η οποία πραγματοποιείται στην παρουσία μικυλλίων [152]. Στην τεχνική αυτή, ο διαχωρισμός λαμβάνει χώρα σε BGE ο οποίος περιέχει επιφανειοδραστική ουσία (τασιενεργή ουσία) σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από την

Κεφάλαιο 2

κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση (critical micellar concentration, CMC). Όπου πάνω από την CMC, τα τασιενεργά συστατικά σχηματίζουν σφαιρικά συσσωματώματα, στα οποία οι υδρογονανθρακικές ουρές εκτείνονται προς το εσωτερικό των μικυλλίων, αφήνοντας, έτσι, τις υδρόφιλες ομάδες σε άμεση επαφή με το υδατικό διάλυμα [152]. Στις περισσότερες περιπτώσεις, χρησιμοποιούνται ανιονικά επιφανειοδραστικά, με το SDS να αποτελεί το πιο ευρέως διαδεδομένο τασιενεργό συστατικό στη MEKC [162].

Εν συντομία, ο διαχωρισμός των φορτισμένων ενώσεων στην MEKC, βασίζεται στην ηλεκτροφορητική ευκινησία και την κατανομή των αναλυτών μεταξύ της υδατικής (κινητής φάσης) και της μικυλλιακής ψευδοστατικής φάσης. Ενώ στην περίπτωση των ουδέτερων ενώσεων, ο διαχωρισμός βασίζεται μόνο στις αλληλεπιδράσεις των εν λόγω ενώσεων με τη ψευδοστατική φάση [74,152,163]. Όπου, κατά τη μετανάστευσή τους, τα μικύλλια μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις προσδιοριζόμενες ουσίες μέσω υδροφοβικών και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [153]. Με τον τρόπο αυτό, είναι δυνατό να διαχωριστούν, τόσο τα φορτισμένα, όσο και τα ουδέτερα συστατικά του δείγματος [152].

Ηλεκτροκινητική χρωματογραφία κυκλοδεξτρίνης (CD-EKC)

Οι CDs έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για τον διαχωρισμό, τόσο χειρόμορφων, όσο και μη χειρόμορφων μορίων. Εξαιτίας της ιδιαίτερης δομής που παρουσιάζουν (υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια και υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα) έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού (host-guest inclusion complexes) με με κατάλληλου μεγέθους μόρια [164,165], μέσω υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων όπως για παράδειγμα δεσμών υδρογόνου. Ενώ, σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της συμπλοκοποίησης φαίνεται να διαδραματίζουν οι στεरिकές αλληλεπιδράσεις [166]. Ως αποτέλεσμα της συμπλοκοποίησης αυτής, προκαλείται μεταβολή της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας των αναλυτών και, ως εκ τούτου, βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας [164].

3. Πειραματικό Μέρος

Αναλυτικοί διαχωρισμοί με CE-DAD

Όλοι οι αναλυτικοί διαχωρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε σύστημα Agilent CE G1600A (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) εφοδιασμένο με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (Diode Array Detector, DAD) (Σχήμα 3.1). Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 210 nm. Ο χειρισμός του συστήματος και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του λογισμικού Agilent ChemStation B.03.01. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε στήλη από τηγμένη πυρίτια, αποτελεσματικού (δραστικού) μήκους 55.5 cm και με συνολικό μήκος 64 cm. Για την ενεργοποίηση κάθε καινούργιας στήλης λάμβανε χώρα διαδοχική έκπλυση της με H₂O (30 min), 1 M NaOH (60 min), H₂O (30 min) και τέλος με τον BGE (30 min). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται αποπρωτονίωση των επιφανειακών ομάδων σιλανόλης του εσωτερικού τοιχώματος του τριχοειδούς και σχηματισμός της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας. Με σκοπό τη διατήρηση των συνθηκών αποπρωτονίωσης των σιλανομάδων του τριχοειδούς, λάμβανε χώρα καθημερινή ενεργοποίησή του μέσω της διαδοχικής έκπλυσης της στήλης με H₂O (5 min), 1 M NaOH (10 min), H₂O (5 min) και τέλος με τον BGE (5 min). Μεταξύ των διαδοχικών αναλύσεων, λάμβανε χώρα έκπλυση της στήλης για 3 min, μόνο με τον BGE. Για την αποθήκευση της στήλης, μετά από τη χρήση της, λάμβανε χώρα έκπλυση της με H₂O (15 min).



Σχήμα 3.1. Σύστημα CE-DAD.

Κεφάλαιο 3

Η εισαγωγή των δειγμάτων στη στήλη πραγματοποιήθηκε με χρήση της υδροδυναμικής έγχυσης, μέσω της εφαρμογής πίεσης 50 mbar για 5 s. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε σταθερή στους 25 °C. Οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν εφαρμόζοντας δυναμικό 25 kV. Η EOF ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας, ως ουδέτερο δείκτη (neutral marker), τη MeOH. Η ταυτοποίηση των κορυφών επιτεύχθηκε μέσω της σύγκρισης των χρόνων συγκράτησης και με χρήση της τεχνικής εμβολιασμού (spiking).

Παρασκευή αναλυτών

Όλα τα υπό μελέτη NPSs που εξετάστηκαν σε αυτή τη διατριβή, προμηθεύτηκαν από τον Dr. Martin Schmid (Graz University) είτε μετά από αγορά τους μέσω διαδικτύου, είτε μετά από κατάσχεσή τους από την αστυνομία της Αυστρίας. Τα πρότυπα διαλύματα των αναλυτών, συγκέντρωσης 1 mg/mL παρασκευάστηκαν με διάλυση της αντίστοιχης ποσότητας αναλύτη σε μεθανόλη (100% MeOH) και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Τα ενδιάμεσα πρότυπα μίγματα των αναλυτών, συγκέντρωσης 0.2 mg/mL, παρασκευάζονταν σε καθημερινή βάση με κατάλληλη αραίωση των διαλυμάτων των πρότυπων ενώσεων σε διαλύτη MeOH. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν υψηλής αναλυτικής καθαρότητας (HPLC-grade) και προμηθεύτηκε από την εταιρεία Merck (Darmstadt, Germany).

Στη συνέχεια περιγράφεται το πειραματικό μέρος, για κάθε μελέτη ξεχωριστά, που πραγματοποιήθηκε στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή. Το πειραματικό μέρος είναι χωρισμένο σε τέσσερα υποκεφάλαια, που αντιστοιχούν στις τέσσερις βασικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν:

- (1) Αξιολόγηση και σύγκριση CSs για τον εναντιομερή διαχωρισμό ψυχοδραστικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής CE-DAD
- (2) Μελέτη της επίδρασης AAILs και DESs στο χειρόμορφο διαχωρισμό αμφεταμινών
- (3) Εφαρμογή της RSM στη βελτίωση του εναντιομερούς διαχωρισμού φθοριομένων αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης
- (4) Παρασκευή του SUPRADES (S-β-CD-CA) και χρήση του ως μοναδικός CS στην CE

3.1 Αξιολόγηση και σύγκριση CSs για τον εναντιομερή διαχωρισμό ψυχοδραστικών ενώσεων με χρήση της CE

3.1.1 Αντιδραστήρια

Οι αναλύτες αμφεταμίνη (Amphetamine, AMP), μεθαμφεταμίνη (Methamphetamine, MA), 4-φθοροαμφεταμίνη (4-fluoramphetamine, 4-FA), 3-φθοροαίθαμφεταμίνη (3-fluorethamphetamine, 3-FEA), 3,4-μεθυλενοδιοξαμφεταμίνη (3,4-methylenedioxyamphetamine, MDMA), 3-μεθυλμεθκαθινόνη (3-methylmethcathinone, 3-MMC), 3,4-διμέθυλομεθκαθινόνη (3,4-dimethylmethcathinone, 3,4-DMMC), 4-μεθυλαιθκαθινόνη (4-methylethcathinone, 4-MEC), 3,4-μεθυλενοδιόξυκαθινόνη (3,4-methylenedioxycathinone, MDMC), και 3,4-μεθυλενοδιόξυπυροβαλερόνη (3,4-methylenedioxypropylvalerone, MDPV) προμηθεύτηκαν από τον Dr. Martin Schmid (Graz University) και οι δομές τους παρατίθενται στο Σχήμα 3.2. Όλοι οι αναλύτες που μελετήθηκαν ήταν υπό τη μορφή υδροχλωρικών αλάτων, εκτός από το ανάλογο της AMP το οποίο ήταν θειϊκό άλας (amphetamine sulfate). Τα πρότυπα διαλύματα των αναλυτών, συγκέντρωσης 1 mg/mL, παρασκευάστηκαν με διάλυση της αντίστοιχης ποσότητας αναλύτη σε μεθανόλη (100% MeOH) και αποθηκεύτηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Τα ενδιάμεσα πρότυπα μίγματα των αναλυτών, συγκέντρωσης 0.2 mg/mL, παρασκευάζονταν σε καθημερινή βάση με κατάλληλη αραιώση των διαλυμάτων των πρότυπων ενώσεων σε διαλύτη MeOH. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν υψηλής αναλυτικής καθαρότητας (HPLC-grade) και προμηθεύτηκε από την εταιρεία Merck (Darmstadt, Germany).

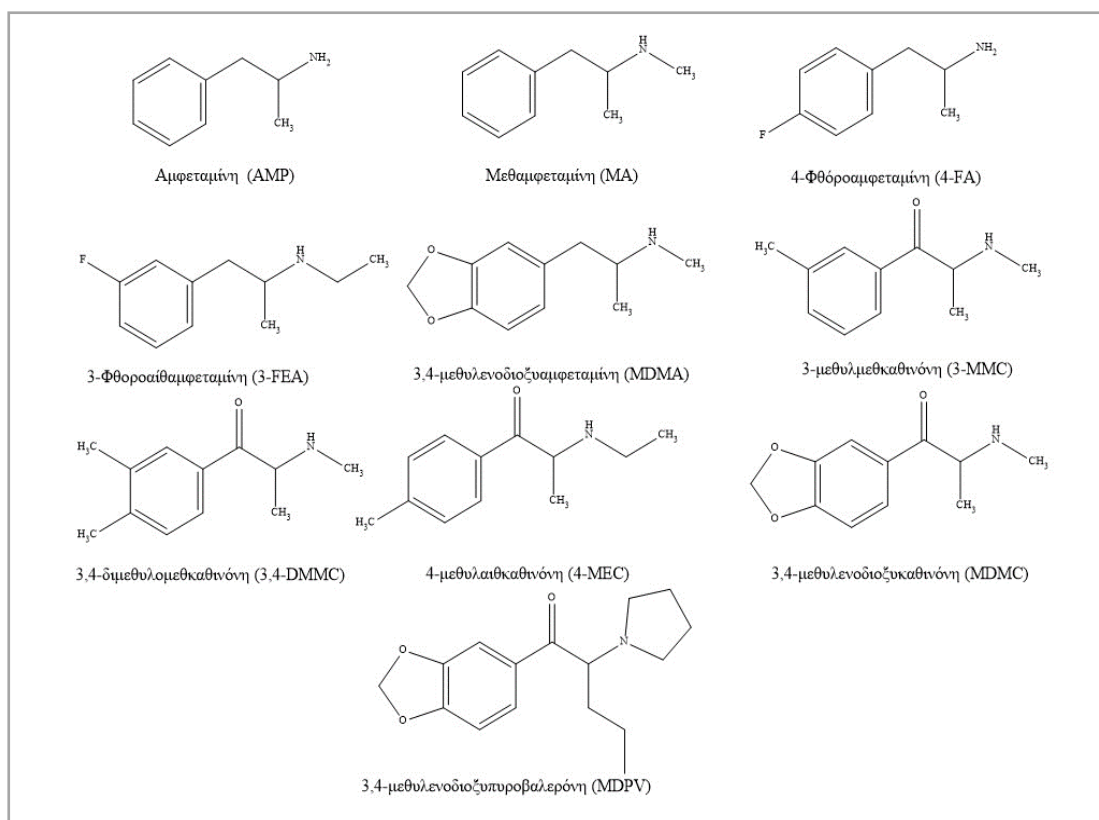
Οι CDs που μελετήθηκαν, β -CD, υδροξυπροπυλο- β -κυκλοδεξτρίνη (hydroxypropyl- β -cyclodextrin, 2-HP- β -CD), καρβοξυμεθυλο- β -κυκλοδεξτρίνη (carboxymethyl- β -CD, CM- β -CD), προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) ενώ οι CFs, CF-6, CF-7, ισοπροπυλο- καρβαμικό παράγωγο της CF6 (isopropyl carbamate, IPCF-6), ισοπροπυλο- καρβαμικό παράγωγο της CF7 (isopropyl carbamate CF-7, IPCF-7), θειϊκή CF-6 (sulfated CF-6, SCF-6), και θειϊκή CF-7 (sulfated CF-7, SCF-7) από την εταιρεία AZYP (Arlington, TX, USA).

Για την παρασκευή των BGEs, χρησιμοποιήθηκε μονοβασικό φωσφορικό νάτριο (Sodium Phosphate Monobasic, NaH_2PO_4). Οι CSs (CDs και CFs) που μελετήθηκαν, προστέθηκαν και διαλύθηκαν μέσα στον BGE. Στη συνέχεια έγινε ρύθμιση του pH και

Κεφάλαιο 3

ο όγκος τους προσαρμόστηκε ανάλογα. Η ρύθμιση του pH επιτεύχθηκε μέσω της προσθήκης αραιωμένου φωσφορικού οξέος (2% H₃PO₄).

Πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα της CE, λάμβανε χώρα διήθηση όλων των διαλυμάτων μέσω φίλτρων διαμέτρου πόρων 0.45 μm και επακόλουθη απαέρωσή τους με τη χρήση λουτρού υπερήχων.



Σχήμα 3.2. Δομές των ψυχοδραστικών ενώσεων που μελετήθηκαν.

3.2 Μελέτη της επίδρασης AAILs και DESs στο χειρόμορφο διαχωρισμό αμφεταμινών

3.2.1 Αντιδραστήρια

Οι αναλύτες που εξετάστηκαν σε αυτήν τη μελέτη, αμφεταμίνη (Amphetamine, AMP), μεθαμφεταμίνη (Methamphetamine, MA) και 3-φθοροαιθαμφεταμίνη (3-fluorethamphetamine, 3-FEA) (Σχήμα 3.2), προμηθεύτηκαν από τον Dr. Martin Schmid (Graz University). Οι CDs που μελετήθηκαν, β-CD, CM-β-CD,

Κεφάλαιο 3

προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) ενώ οι CFs, CF-6, CF-7, SCF-6 και SCF-7 από την εταιρεία AZYP (Arlington, TX, USA).

Για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων, ακολουθήθηκε η πορεία, η οποία αναφέρθηκε στο Υποκεφάλαιο 3.1.1. Οι CSs (CDs και CFs) που μελετήθηκαν, προστέθηκαν και διαλύθηκαν μέσα στον BGE. Τα AAILs (L-AlaC₁Lac, L-AlaC₂Lac και L-AlaC₄Lac) και τα DESs (ChCl-EG, ChCl-BG, ChCh-Ur, ChCl-D-Glu, ChCl-D-Fru, ChCl-D-Sor) χρησιμοποιήθηκαν ως πρόσθετα στον BGE. Ακολούθως έγινε ρύθμιση του pH και ο όγκος τους προσαρμόστηκε ανάλογα.

Για τη σύνθεση των AAILs χρησιμοποιήθηκαν, ως αντιδραστήρια, ο γαλακτικός άργυρος (Silver lactate, AgLac), ο υδροχλωρικός μεθυλεστέρας της L-αλανίνης (L-Alanine methyl ester hydrochloride, L-AlaC₁Cl), ο υδροχλωρικός αιθυλεστέρας της L-αλανίνης (L-Alanine ethyl ester hydrochloride, L-AlaC₂Cl), και ο υδροχλωρικός τεταρτοταγής βουτυλεστέρας της L-αλανίνης (L-Alanine tert-butyl ester hydrochloride, L-AlaC₄Cl). Τα πιο παραπάνω αντιδραστήρια προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) και CARLO ERBA Reagents S.A.S (Val de Reuil Cedex, France) και TOKYO CHEMICAL INDUSTRY, (Tokyo, Japan), αντίστοιχα.

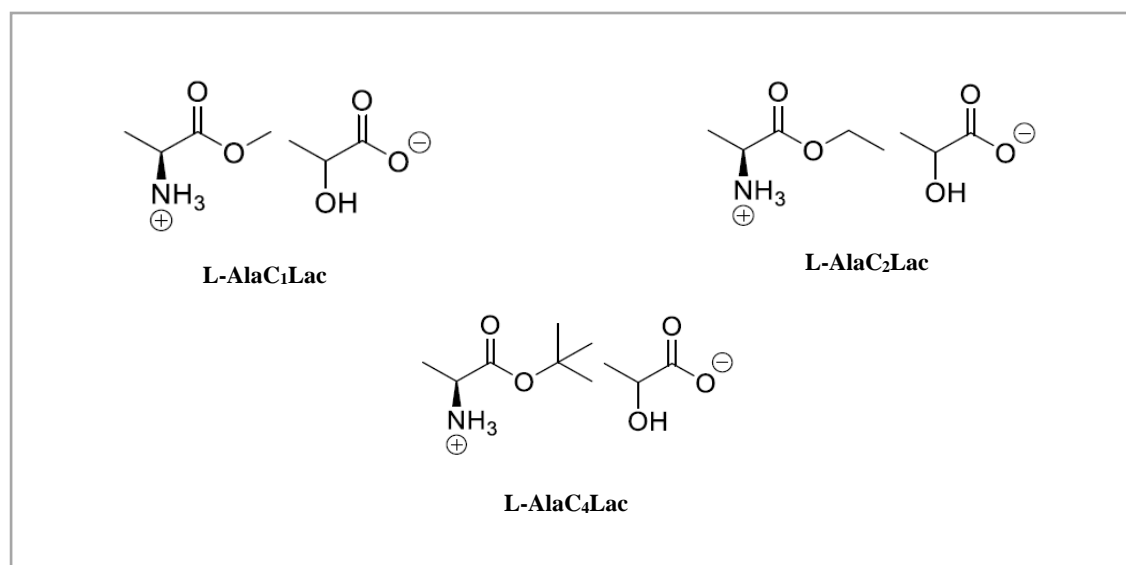
Για την παρασκευή των DESs χρησιμοποιήθηκαν, ως αντιδραστήρια, χλωριούχος χολίνη [choline chloride, ChCl ($\geq 98\%$)], ουρία (urea, Ur), αιθυλενογλυκόλη (ethylene glycol, EG), 1,3-βουτανεδιόλη [1,3-butanediol, BG (99.5%)], D-φρουκτόζη [D-fructose, D-Fru ($\geq 99\%$)], D-σορβιτόλη [D-sorbitol, D-Sor ($\geq 98\%$)], τα οποία προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) και η άνυδρη D-γλυκόζη (D-glucose anhydrous, D-Glu) από την εταιρεία CARLO ERBA Reagents S.A.S (Val de Reuil Cedex, France).

3.2.2. Σύνθεση AAILs

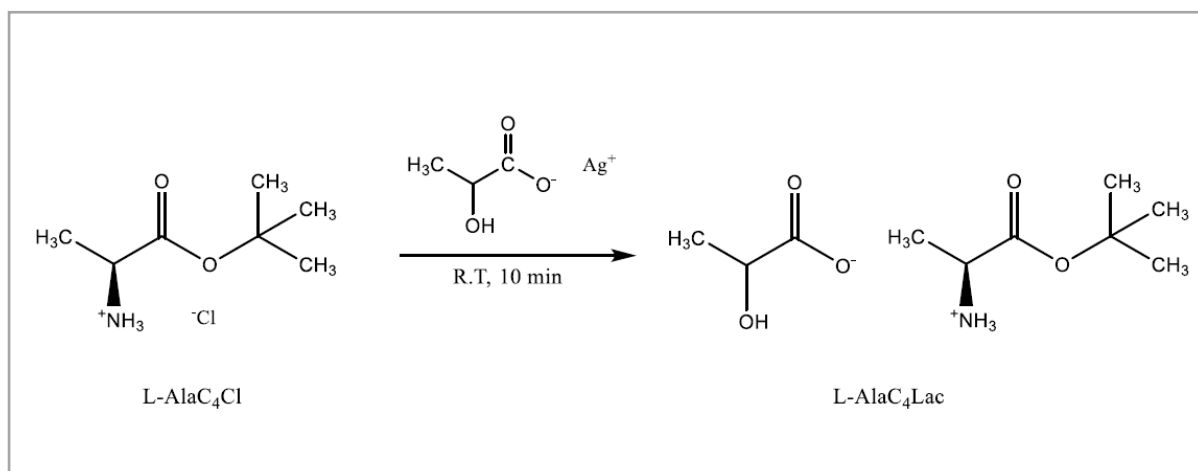
Σε αυτήν τη μελέτη έγινε σύνθεση και χρήση τριών AAILs, του L-AlaC₁Lac, L-AlaC₂Lac και L-AlaC₄Lac, οι δομές των οποίων παρατίθενται στη συνέχεια (Σχήμα 3.3). Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε μέσω μίας απλής αντίδρασης μετάθεσης (simple anion metathesis reaction), ακολουθώντας την τυπική συνθετική πορεία που αναφέρθηκε σε προηγούμενες μελέτες (Σχήμα 3.4) [105–107]. Εν συντομία, για τη σύνθεση των προαναφερθέντων AAILs, κατάλληλες ποσότητες από το ανάλογο

Κεφάλαιο 3

χλωρίδιο του εστέρα και AgLac μεταφέρθηκαν σε MeOH, ξεχωριστά, προς σχηματισμό δύο διαφορετικών μιγμάτων.

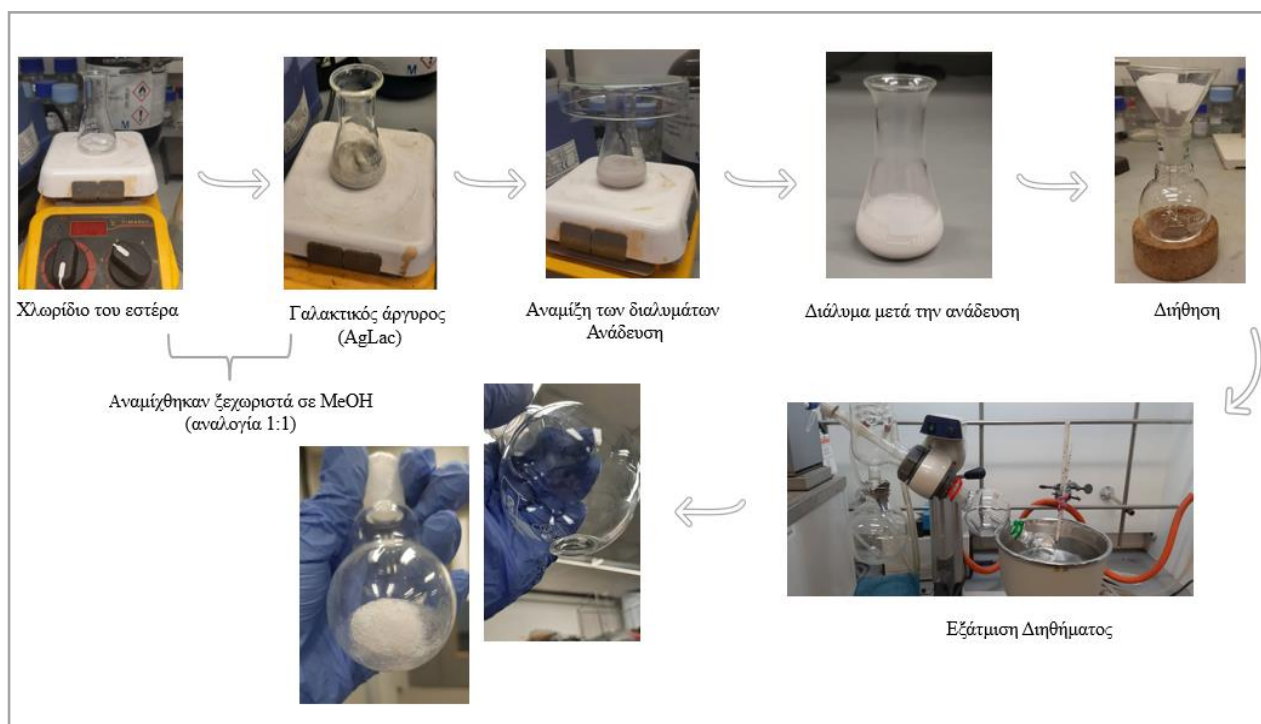


Σχήμα 3.3. Δομές των AAILs.



Σχήμα 3.4. Αντιπροσωπευτική πορεία σύνθεσης του L-AlaC₄Lac.

Ακολούθως, τα δύο αυτά μίγματα αναμίχθηκαν (αναλογία 1:1) και αναδεύτηκαν για περίπου δύο ώρες. Το στερεό που προέκυψε (AgCl) απομακρύνθηκε από το προϊόν μίγμα με διήθηση, ενώ ο διαλύτης του διηθήματος εξατμίστηκε υπό κενό και καθαρίστηκε με ανακρυστάλλωση σε MeOH/αιθέρα. Στο Σχήμα 3.5 αναπαρίσταται διαγραμματικά η συνοπτική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των AAILs.



Σχήμα 3.5. Συνοπτικό διάγραμμα της πορείας που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των AAILs.

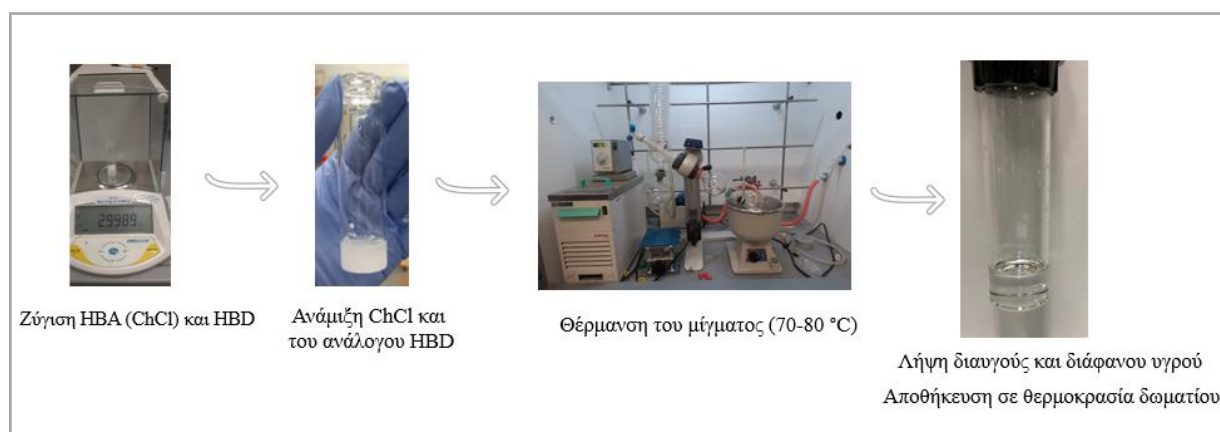
3.2.3. Παρασκευή DESs

Έξι διαφορετικά DESs, με χρήση χλωριδίου χολίνης (Choline chloride, ChCl) ως HBA, και με διαφορετικούς τύπους HBD (μη χειρόμορφους, χειρόμορφους), όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1, συντέθηκαν με βάση τις αντίστοιχες αναλογίες και τη συνθετική πορεία που αναφέρθηκε προηγουμένως στη βιβλιογραφία [116,118,138]. Συγκεκριμένα, για την παρασκευή των DESs, στην αντίστοιχη μοριακή αναλογία, κατάλληλη ποσότητα των ChCl και του ανάλογου HBD αναμίχθηκαν. Στη συνέχεια, το μίγμα που προέκυψε θερμάνθηκε σε περιστροφικό εξάτμιστή (rotary evaporator) στους 70-80 °C, μέχρι να ληφθεί ένα διαυγές και διάφανο υγρό. Όλα τα DESs που προέκυψαν, αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι την αραιώση τους με το κατάλληλο BGE. Επιπρόσθετα, μετά την παρασκευή τους, τα DESs, καθώς και τα αρχικά τους αντιδραστήρια (HBA, HBD) χαρακτηρίστηκαν με χρήση της φασματοσκοπίας υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy, ATR-FTIR), με σκοπό την επιβεβαίωση του σχηματισμού τους. Στο Σχήμα 3.6 αναπαρίσταται διαγραμματικά η συνοπτική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των DESs.

Κεφάλαιο 3

Πίνακας 3.1. Τα DESs που παρασκευάστηκαν και οι αντίστοιχες τους μοριακές αναλογίες.

Choline chloride:HBD		
Εύτηκτοι Διαλύτες		
Δότης Δεσμού Υδρογόνου (HBD)	ChCl:HBD (Μοριακή Αναλογία)	
Μη χειρόμορφοι HBD	Ethylene Glycol (EG)	1:2
	1,3-Butylene Glycol (BG)	1:2
	Urea (Ur)	1:2
Χειρόμορφοι HBD	D-Sorbitol (D-Sor)	1:1
	D-Glucose (D-Glu)	2:1
	D-Fructose (D-Fru)	2:1



Σχήμα 3.6. Συνοπτικό διάγραμμα της πορείας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των DESs.

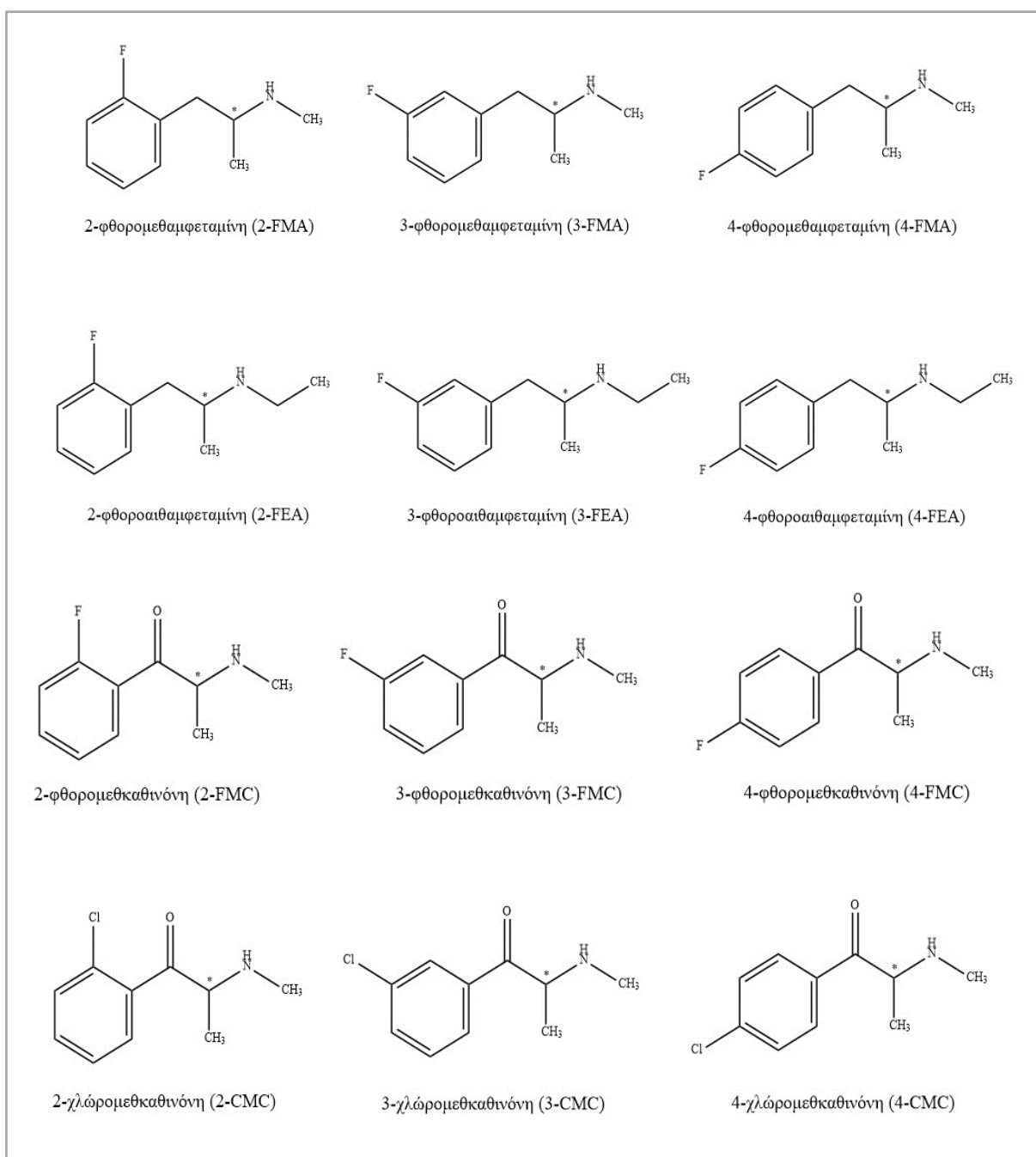
3.3 Εφαρμογή της RSM στη βελτίωση του εναντιομερούς διαχωρισμού φθοριομένων αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης

3.3.1 Αντιδραστήρια

Οι αναλύτες 2-φθορομεθαμφεταμίνη (2-fluormethamphetamine, 2-FMA), 3-φθορομεθαμφεταμίνη (3-fluormethamphetamine, 3-FMA), 4-φθορομεθαμφεταμίνη (4-fluormethamphetamine, 4-FMA), 2-φθοροαιθαμφεταμίνη (2-fluorethamphetamine, 2-FEA), 3-φθοροαιθαμφεταμίνη (3-fluorethamphetamine, 3-FEA), 4-φθοροαιθαμφεταμίνη (4-fluorethamphetamine, 4-FEA), 2-φθορομεθκαθινόνη (2-fluormethcathinone, 2-FMC), 3-φθορομεθκαθινόνη (3-fluormethcathinone, 3-FMC),

Κεφάλαιο 3

4-φθορομεθκαθινόνη (4-fluormethcathinone, 4-FMC), 2-χλωρομεθκαθινόνη (2-chlormethcathinone, 2-CMC), 3-χλωρομεθκαθινόνη (3-chlormethcathinone, 3-CMC), και 4- χλωρομεθκαθινόνη (4-chlormethcathinone, 4-CMC) (Σχήμα 3.7), προμηθεύτηκαν από τον Dr. Martin Schmid (Graz University). Επιπλέον μελετήθηκαν οι αναλύτες 2-φθοροαμφεταμίνη (2-fluoramphetamine, 2-FA), 3- φθοροαμφεταμίνη (3-fluoramphetamine, 3-FA), 4-φθοροαμφεταμίνη (4-fluoramphetamine, 4-FA), στο ερευνητικό εργαστήριο του Τμήματος Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου του Graz (Department of Pharmazeutische Chemie, Graz University, Austria).



Σχήμα 3.7. Δομές των αλογο-υποκατεστημένων αμφεταμινών και καθινονών που εξετάστηκαν.

Κεφάλαιο 3

Ως CSs χρησιμοποιήθηκε η CM-β-CD, η οποία προμηθεύτηκε από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) και οι CFs, SCF-6, και SCF-7 από την εταιρεία AZYP (Arlington, TX, USA). Για τη παρασκευή του DES, ChCl-EG, χρησιμοποιήθηκαν, ως αντιδραστήρια, χλωριούχος χολίνη [ChCl ($\geq 98\%$)] και αιθυλενογλυκόλη (EG), τα οποία προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Για την παρασκευή του DES (ChCl-EG), ακολουθήθηκε η συνθετική πορεία η οποία περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο 3.2.3.

Για την παρασκευή των BGEs, ακολουθήθηκε η πορεία η οποία αναφέρθηκε στο Υποκεφάλαιο 3.1.1. Οι CSs (CDs και CFs) που μελετήθηκαν καθώς και το DES (ChCl-EG), προστέθηκαν και διαλύθηκαν μέσα στον BGE. Ακολούθως έγινε ρύθμιση του pH και ο όγκος τους προσαρμόστηκε ανάλογα.

3.3.2. Πειραματικός σχεδιασμός και στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών του χειρόμορφου διαχωρισμού φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης με χρήση του δυαδικού συστήματος CM-β-CD/ChCl-EG, αλλά και της μελέτης της επίδρασης των δυο ανεξάρτητων μεταβλητών, έλαβε χώρα βελτιστοποίηση των επιπέδων των κρίσιμων μεταβλητών μέσω της RSM και συγκεκριμένα μέσω του μοντέλου Central Composite Design (CCD). Η συγκέντρωση του CS και συγκεκριμένα της CM-β-CD και το ποσοστό του DES (ChCl-EG), ήταν οι δύο κύριες ανεξάρτητες μεταβλητές (independent variables), οι οποίες επηρεάζουν το συνεργειακό φαινόμενο (synergistic effect) και των οποίων τα βέλτιστα επίπεδα προσδιορίστηκαν μέσω της RSM. Για κάθε κατηγορία παραγώγων, φθοριωμένων αμφεταμινών και φθοριωμένων καθινονών, χρησιμοποιήθηκε ένας πειραματικός σχεδιασμός 2 μεταβλητών και 5 επιπέδων, με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης των δύο ανεξάρτητων μεταβλητών στον εναντιομερή διαχωρισμό των φθοριωμένων ψυχοδραστικών ενώσεων.

Οι ηλεκτροφορητικές συνθήκες, pH, η συγκέντρωση του BGE, εφαρμοζόμενη τάση, είδος του CS αλλά και το κατάλληλο πρόσθετο (ChCl-EG), για το χειρόμορφο διαχωρισμό κάποιων αναλόγων NPS, προσδιορίστηκαν σε προηγούμενες μελέτες της εν λόγω διατριβής. Το εύρος της συγκέντρωσης της CM-β-CD και του ποσοστού του ChCl-EG (DES) που εξετάστηκαν, επιλέχθηκαν με βάση προκαταρκτικά πειράματα, και στη συνέχεια τα βέλτιστα επίπεδα προσδιορίστηκαν μέσω της RSM. Επιπλέον, η

Κεφάλαιο 3

τιμή του διαχωρισμού μεταξύ των δύο εναντιομερών (R_s) και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης (χρόνος έκλουσης του δεύτερου εναντιομερούς) επιλέχθηκαν ως οι εξαρτημένες μεταβλητές (dependent variables). Ο στατιστικός έλεγχος των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω της ANOVA. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν με χρήση του στατιστικού λογισμικού προγράμματος Design Expert statistical software (έκδοση 13.0).

3.4 Παρασκευή του SUPRADES και χρήση του ως μοναδικός CS στην CE

3.4.1 Αντιδραστήρια

Οι αναλύτες που εξετάστηκαν σε αυτή τη μελέτη, 2-φθοροαμφεταμίνη (2-fluoramphetamine, 2-FA), 3- φθοροαμφεταμίνη (3-fluoramphetamine, 3-FA), 4-φθοροαμφεταμίνη (4-fluoramphetamine, 4-FA), 2-φθορομεθαμφεταμίνη (2-fluormethamphetamine, 2-FMA), 3-φθορομεθαμφεταμίνη (3-fluormethamphetamine, 3-FMA), 4-φθορομεθαμφεταμίνη (4-fluormethamphetamine, 4-FMA), 3-μέθυλμεθκαθινόνη (3-methylmethcathinone, 3-MMC), 4-μέθυλμεθκαθινόνη (4-methylmethcathinone, 4-MMC), 3,4-διμεθυλμεθκαθινόνη (3,4-dimethylmethcathinone, 3,4-DMMC), 4-μεθυλαιθκαθινόνη (4-methylethcathinone, 4-MEC), 3,4-μεθυλενοδιόξυκαθινόνη (3,4-methylenedioxcathinone, MDMC), και 3,4-μεθυλενοδιόξυπυροβαλερόνη (3,4-methylenedioxypropylvalerone, MDPV) οι δομές των οποίων παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.2 και 3.7, προμηθεύτηκαν από τον Dr. Martin Schmid (Graz University). Επιπρόσθετα μελετήθηκε ο εναντιομερής διαχωρισμός της κλινικής ένωσης, νεφοπάμης (Nefopam, NEF), η οποία προμηθεύτηκε από την εταιρεία Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Τα αντιδραστήρια, τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο (Tris-(hydroxymethyl)aminomethane, Tris) και δεκαενυδρο τετραβορικό νάτριο (Sodium Tetraborate decahydrate, Borate) καθώς και τα β -CD sodium salt sulfated (S- β -CD) και μονοενυδρο κιτρικό οξύ [Citric Acid, CA ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)], τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη παρασκευή του SUPRADES (S- β -CD-CA) αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Το SUPRADES, S- β -CD-CA με αναλογία 1:2, παρασκευάστηκε για πρώτη φορά, με βάση την ίδια συνθετική πορεία για την παρασκευή των DESs, η οποία περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο 3.2.3, με

Κεφάλαιο 3

κάποιες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, σε αυτή την περίπτωση το μίγμα το οποίο προέκυψε θερμάνθηκε σε περιστροφικό εξατμιστή (rotary evaporator) στους 80-90 °C, μέχρι τη λήψη ενός διαυγούς και διάφανου υγρού. Ακολούθως, με σκοπό την επιβεβαίωση του σχηματισμού του, το SUPRADES καθώς και τα αρχικά αντιδραστήρια (S-β-CD, CA) χαρακτηρίστηκαν με χρήση της φασματοσκοπίας υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (ATR-FTIR). Στη συνέχεια, το SUPRADES αποθηκεύτηκε μέχρι την αραίωση του με το κατάλληλο BGE.

Για την παρασκευή των BGEs, το SUPRADES, S-β-CD-CA προστέθηκε και διαλύθηκε μέσα στον BGE ως CS. Ακολούθως, έγινε ρύθμιση του pH (pH 2.5) και ο όγκος του BGE προσαρμόστηκε ανάλογα.

Για τον εναντιομερή διαχωρισμό της NEF, ο BGE ήταν μίγμα από το τρις-υδροξυμέθυλ-αμινομεθάνιο (Tris-(hydroxymethyl)aminomethane Tris) σε συγκέντρωση ίση με 100 mM και το δεκαένυδρο τετραβορικό νάτριο (Sodium Tetraborate decahydrate, Borate) σε συγκέντρωση 10 mM (100 mM Tris/10 mM Borate), βασιζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες [99]. Το SUPRADES, S-β-CD-CA, προστέθηκε και διαλύθηκε μέσα στον BGE ως CS. Ακολούθως, έγινε ρύθμιση του pH (pH 8) και ο όγκος του BGE προσαρμόστηκε ανάλογα. Η ρύθμιση του pH επιτεύχθηκε μέσω της προσθήκης υδροχλωρικού οξέος (HCl).

Επιπρόσθετα, οι αναλυτικοί διαχωρισμοί για τον εναντιομερή διαχωρισμό των φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης με χρήση του SUPRADES (S-β-CD-CA) πραγματοποιήθηκαν στο ερευνητικό εργαστήριο του Τμήματος Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου του Graz υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Dr. Martin Schmid (Graz University, Austria), στο πλαίσιο του προγράμματος Erasmus Placement, σε αυτοματοποιημένο σύστημα Agilent ^{3D}CE system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) εφοδιασμένο με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD). Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 210 nm. Ο χειρισμός του συστήματος και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του λογισμικού Agilent ChemStation B.03.01. Ενώ οι υπόλοιπες μελέτες διεξήχθησαν σε σύστημα Agilent CE G1600A (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) εφοδιασμένο με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD), όπως αναφέρεται στο Κεφάλαιο 3.

3.1.2 Ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

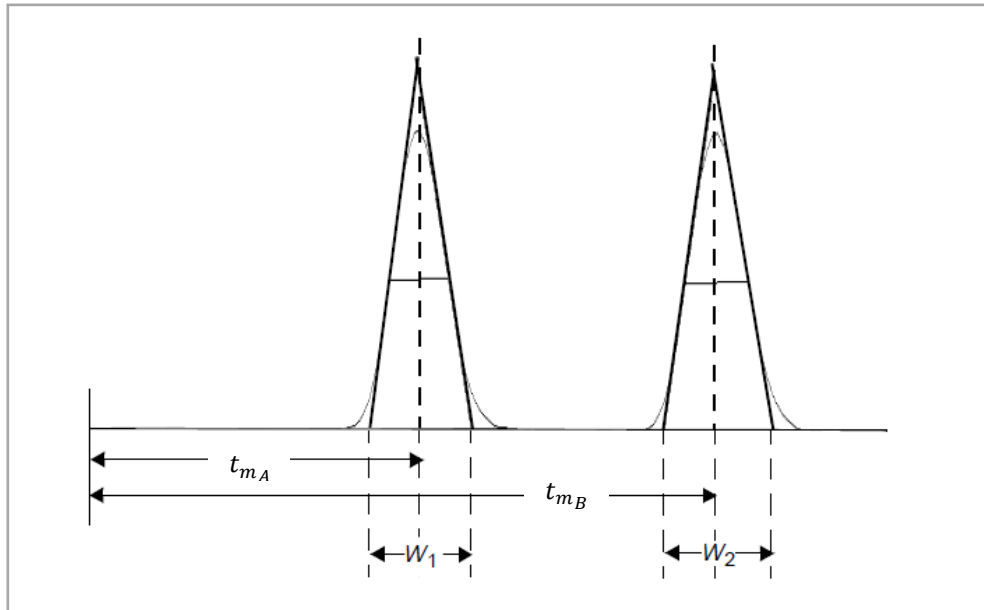
3.1.2.1 Ανάπτυξη μεθόδων

Κατά την ανάπτυξη των πιο πάνω ηλεκτροφορητικών μεθόδων ανάλυσης, μελετήθηκαν διάφορες ηλεκτροφορητικές παράμετροι, με απώτερο σκοπό των χειρόμορφο διαχωρισμό εναντιομερών ψυχοδραστικών ενώσεων. Αρχικά οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν μεταξύ άλλων, το είδος και η συγκέντρωση του CS (CDs, CFs), η συγκέντρωση και το pH του BGE, καθώς και η εφαρμοζόμενη τάση. Επιπλέον σε μεταγενέστερο στάδιο, έλαβε χώρα μελέτη της επίδρασης AAILs καθώς και DESs ως πρόσθετα στον BGE με απώτερο σκοπό την επίτευξη πλήρους διαχωρισμού τριών αναλόγων αμφεταμίνης, τα οποία δεν είχαν διαχωριστεί σε προγενέστερο στάδιο με κανένα υπό μελέτη CS. Ακολούθως μέσω της RSM, βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες του χειρόμορφου διαχωρισμού φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης με χρήση του δυαδικού συστήματος CM-β-CD/ChCl-EG, ενώ μελετήθηκε για πρώτη φορά η χρήση του SUPRADES, S-β-CD-CA, ως μοναδικός CS για τον εναντιομερή διαχωρισμό αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την παρουσία και τη θέση υποκατάστατων (π.χ. αλογόνου, αλκυλομάδας), αλλά και για τον χειρόμορφο διαχωρισμό της κλινικής ένωσης, νεφοπάμης.

Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, βασικό κριτήριο αξιολόγησης του διαχωρισμού, ήταν η διαχωριστική ικανότητα (Resolution, R_s). Στην πράξη, ο όρος αυτός αποτελεί ένα ποσοτικό μέτρο της ικανότητας της στήλης να διαχωρίσει δύο αναλύτες, A και B, και περιγράφεται από τη πιο κάτω σχέση [152]:

$$R_s = \frac{2[(t_m)_B - (t_m)_A]}{w_A + w_B} \quad \text{Εξίσωση 3.1}$$

όπου $(t_m)_A$ και $(t_m)_B$ οι χρόνοι μετανάστευσης των αναλυτών A και B, αντίστοιχα, και w_A και w_B το εύρος της βάσης των κορυφών (Σχήμα 3.8). Όταν η τιμή της R_s είναι ίση ή μεγαλύτερη από 1.5 ($R_s \geq 1.5$), τότε ο διαχωρισμός θεωρείται πλήρης.

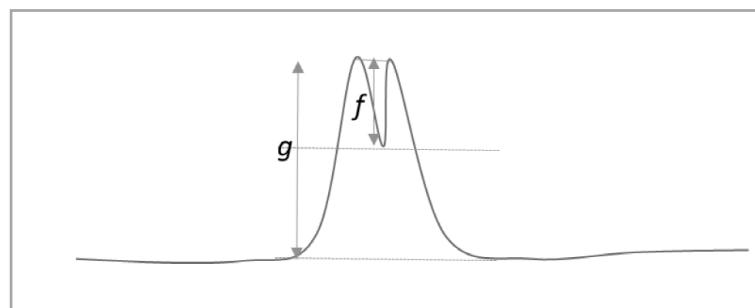


Σχήμα 3.8. Γραφική αναπαράσταση για τον υπολογισμό της διαχωριστικής ικανότητας.

Στην περίπτωση που η διαχωριστική ικανότητα είναι πολύ μικρή, δεν είναι εύκολος ο υπολογισμός της τιμής R_s . Για τον προσδιορισμό της διαχωριστικής ικανότητας, σε αυτή την περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε ο παράγοντας Kaiser, σύμφωνα με τη σχέση:

$$\text{Παράγοντας Kaiser} = \frac{f}{g} \quad \text{Εξίσωση 3.2}$$

Όπου f η απόσταση από το μέσο της διατομής μεταξύ των μέγιστων σημείων των κορυφών μέχρι την κοιλάδα μεταξύ των κορυφών, και g η απόσταση από το ίδιο σημείο μέχρι τη γραμμή βάσης (Σχήμα 3.9) [167].



Σχήμα 3.9. Γραφική αναπαράσταση των μεγεθών f και g που χρησιμοποιούνται κατά τον υπολογισμό του παράγοντα Kaiser.

Κεφάλαιο 3

Μία άλλη σημαντική παράμετρος που αξιολογήθηκε ήταν η εκλεκτικότητα της μεθόδου, με προσδιορισμό του παράγοντα εκλεκτικότητας (α), σύμφωνα με τη σχέση:

$$\alpha = \frac{k_{B'}}{k_{A'}} = \frac{(t_m)_B - (t_{eo})}{(t_m)_A - (t_{eo})} \quad \text{Εξίσωση 3.3}$$

όπου $k_{B'}$ και $k_{A'}$: οι παράγοντες κατακράτησης των βραδύτερα και ταχύτερα εκλουόμενων συστατικών, αντίστοιχα, $(t_m)_A$ και $(t_m)_B$: οι χρόνοι μετανάστευσης των συστατικών A και B, αντίστοιχα, και t_{eo} : ο χρόνος μετανάστευσης της EOF, δηλαδή του ουδέτερου δείκτη.

3.1.2.2 Επικύρωση μεθόδου

Στο πλαίσιο επικύρωσης των μεθόδων που αναπτύχθηκαν, η κάθε αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε σε κάθε ξεχωριστή μελέτη, αξιολογήθηκε ως προς την πιστότητά της (precision).

Η πιστότητα αποτελεί μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ελέγχων που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα κάτω από τις ίδιες (επαναληψιμότητα, intra-day precision) ή διαφορετικές συνθήκες (αναπαραγωγιμότητα, inter-day precision) [168]. Για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας των χρόνων μετανάστευσης των δυο εναντιομερών των αναλυτών (t_1 και t_2), έλαβαν χώρα 5 διαδοχικά ηλεκτροφορητικά πειράματα εντός της ίδιας ημέρας (intra – day precision), ενώ για εύρεση της αναπαραγωγιμότητας, πραγματοποιήθηκαν 5 επαναληπτικά ηλεκτροφορητικά πειράματα για 3 συνεχόμενες μέρες (inter – day precision). Κριτήριο αξιολόγησης της πιστότητας, η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD):

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \quad \text{Εξίσωση 3.4}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad \text{Εξίσωση 3.5}$$

Κεφάλαιο 3

όπου s : η τυπική απόκλιση, \bar{x} : η μέση τιμή των N μετρήσεων και x_i : η κάθε επιμέρους μέτρηση.

Επιπρόσθετα, για τον υπολογισμό της μεταβολής της EOF (ηλεκτροωσμωτική ταχύτητα και ευκινησία) και της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας των αναλυτών, χρησιμοποιήθηκαν οι Εξισώσεις 2.8 και 2.9, οι οποίες διατυπώθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο (Υποκεφάλαιο 2.1.3).

4. Αποτελέσματα

Στο κεφάλαιο αυτό καταγράφονται και συζητούνται τα αποτελέσματα που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής έρευνας. Το κεφάλαιο χωρίζεται σε τέσσερα μέρη, με βάση τους κύριους στόχους της παρούσας διδακτορικής διατριβής, ως ακολούθως: (1) Αξιολόγηση και σύγκριση CSs για τον εναντιομερή διαχωρισμό ψυχοδραστικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής CE-DAD (2) Μελέτη της επίδρασης AAILs και DESs στο χειρόμορφο διαχωρισμό αμφεταμινών (3) Εφαρμογή της RSM στη βελτίωση του εναντιομερούς διαχωρισμού φθοριομένων αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης και (4) Παρασκευή του SUPRADES (S-β-CD-CA) και χρήση του ως μοναδικός CS στην CE.

Εν συντομία το πρώτο μέρος αφορά τη μελέτη διαφόρων ηλεκτροφορητικών παραμέτρων, με απώτερο σκοπό τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών για τον χειρόμορφο διαχωρισμό δέκα εναντιομερών ψυχοδραστικών ενώσεων. Το δεύτερο μέρος μελετά την επίδραση AAILs καθώς και DESs ως πρόσθετα στον BGE ο οποίος περιείχε CS (CDs, CFs), με σκοπό την πιθανή βελτίωση του χειρόμορφου διαχωρισμού τριών αναλόγων αμφεταμίνης (AMP, MA, 3-FEA), τα οποία δεν είχαν διαχωριστεί σε προγενέστερο στάδιο με κανένα υπό μελέτη CS. Ταυτόχρονα γίνεται και μελέτη της συνεργειακής/ανταγωνιστικής τους δράσης, σε συνδυασμό με τους υπό μελέτη CSs. Ακολούθως, στο τρίτο μέρος βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες του χειρόμορφου διαχωρισμού φθοριομένων αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης με χρήση του δυαδικού συστήματος CM-β-CD/ChCl-EG, μέσω της RSM. Επιπρόσθετα, στο πλαίσιο του προγράμματος Erasmus Placement, και σε συνεργασία με το ερευνητικό εργαστήριο του Τμήματος Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου του Graz (Graz University, Austria) υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Dr. Martin Schmid, μελετήθηκε η εφαρμογή της πιο πάνω βελτιστοποιημένης μεθόδου σε άλλα φθοριομένα ανάλογα NPS. Τέλος, παρασκευάστηκε για πρώτη φορά το SUPRADES, ονόματι S-β-CD-CA, το οποίο αποτελείται από S-β-CD ως HBA και CA ως HBD. Ακολούθως, το προαναφερθέν SUPRADES μελετήθηκε και αξιολογήθηκε για πρώτη φορά ως μοναδικός CS για τον εναντιομερή διαχωρισμό αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την παρουσία και την θέση υποκατάστατων (π.χ αλογόνου, αλκυλομάδας), αλλά και για τον διαχωρισμό της κλινικής ένωσης NEF.

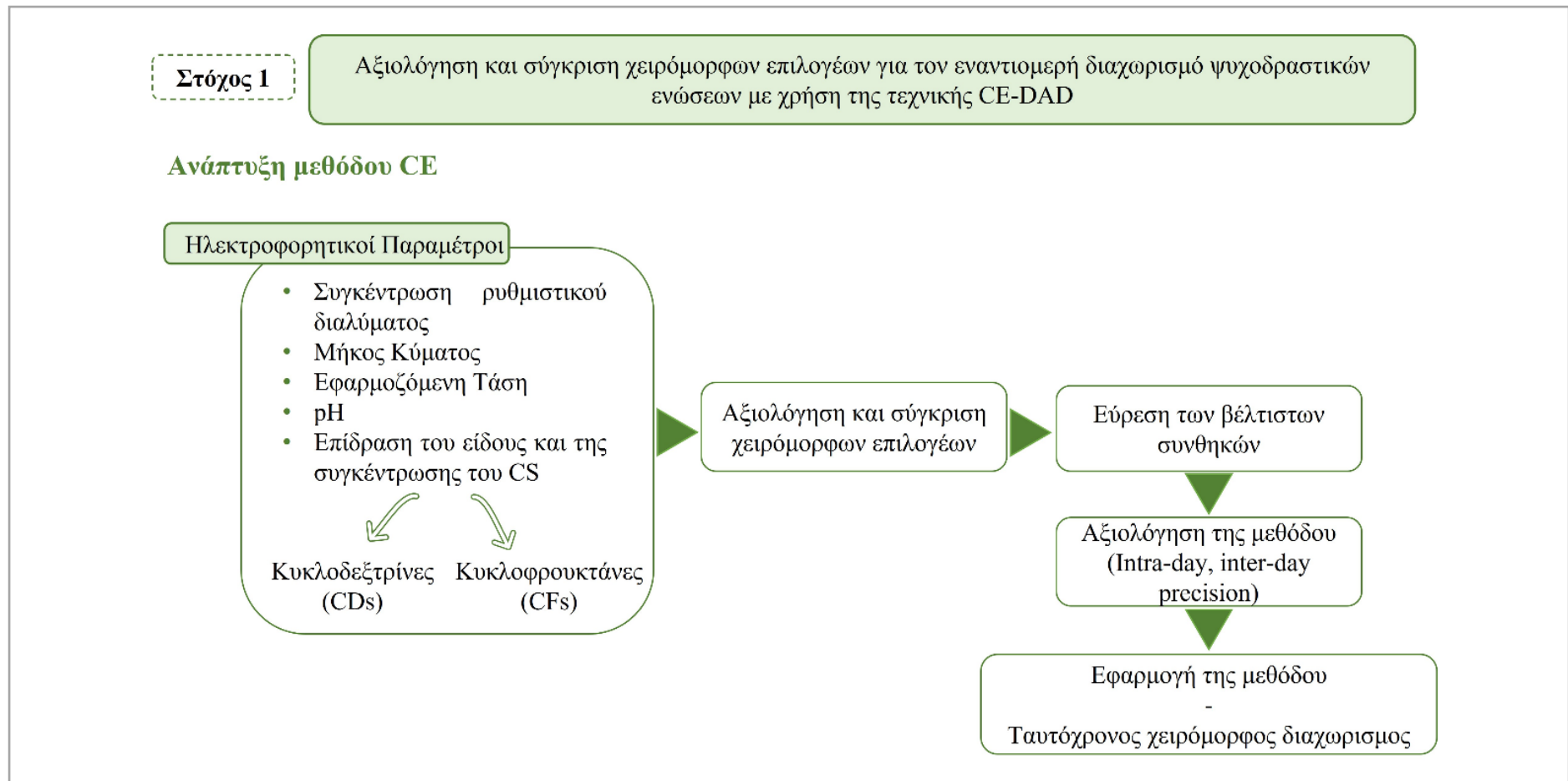
4.1 Αξιολόγηση και σύγκριση CSs για τον εναντιομερή διαχωρισμό ψυχοδραστικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής CE-DAD

Η ανάπτυξη ενόργανων αναλυτικών μεθόδων για χειρόμορφο διαχωρισμό ψυχοδραστικών ενώσεων κρίνεται αναγκαία, εξαιτίας της εκθετικής αύξησης των παραγώγων τους τις τελευταίες δεκαετίες αλλά και συνάμα της αυξημένης ανάγκης για μελέτη της φαρμακολογικής δράσης των καθαρών εναντιομερών.

Στόχος αυτής της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών για το διαχωρισμό των υπό μελέτη ενώσεων. Αρκετές δημοσιεύσεις έχουν, μέχρι τώρα, αναφερθεί στον επιτυχή εναντιομερή διαχωρισμό των NPS με τη χρήση CDs ως CSs, οι οποίες αναφέρονται στο Υποκεφάλαιο 1.8.1.

Ωστόσο, στη βιβλιογραφία υπάρχει περιορισμένος αριθμός δημοσιεύσεων με χρήση CFs ως CSs στον χειρόμορφο διαχωρισμό ενώσεων και εξ όσων γνωρίζουμε, είναι η πρώτη φορά που επιχειρείται η χρήση τους (τόσο ουδέτερων όσο και παραγωγοποιημένων) ως CSs για τη μελέτη της ικανότητας τους για εναντιοεκλεκτική αναγνώριση ψυχοδραστικών ενώσεων, γεγονός στο οποίο έγκειται και η πρωτοτυπία της παρούσας μελέτης.

Υπό τις συνθήκες αυτές, αναπτύχθηκε, σε πρώτο στάδιο, μία απλή, γρήγορη και αξιόπιστη ηλεκτροφορητική μέθοδος η οποία επέτρεψε τον αποτελεσματικό εναντιομερή διαχωρισμό έξι εκ των δέκα υπό μελέτη αναλυτών. Έχοντας ως στόχο τον πλήρη διαχωρισμό των υπό ανάλυση ενώσεων, οι δομές των οποίων παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.2, παράγοντες όπως το είδος και η συγκέντρωση του CS (CDs, CFs), η συγκέντρωση και το pH του BGE, καθώς και η εφαρμοζόμενη τάση μελετήθηκαν λεπτομερώς. Η χρήση των CFs ως CSs για το χειρόμορφο διαχωρισμό εναντιομερών ψυχοδραστικών ενώσεων μελετήθηκε για πρώτη φορά και, όπως αποδείχθηκε, η χρήση των θειϊκών CFs, επέτρεψε τον αποτελεσματικό διαχωρισμό έξι εκ των δέκα υπό μελέτη NPS. Συγκεκριμένα, τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν με χρήση της SCF-6 και SCF-7 στην περίπτωση των αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης, αντίστοιχα. Η μέθοδος η οποία αναπτύχθηκε, αφού αξιολογήθηκε ως προς την πιστότητά της, εξετάστηκε ως προς την εφαρμογή της σε μίγματα αμφεταμινών και καθινονών. Ακολούθως, παρέχεται διάγραμμα ροής της πορείας που ακολουθήθηκε για την υλοποίηση του πρώτου στόχου της Δ.Δ (Σχήμα 4.1).



Σχήμα 4.1. Διάγραμμα ροής Στόχου 1 της Διδακτορικής Διατριβής.

4.1.1. Ανάπτυξη μεθόδου CE

Παράγοντες, όπως ο τύπος, η συγκέντρωση και το pH του BGE, το είδος και η συγκέντρωση του CS, η εφαρμοζόμενη τάση και η θερμοκρασία, φαίνεται να επιδρούν σημαντικά στην ταχύτητα μετανάστευσης των διαφόρων υπό μελέτη αναλυτών. Η επιμέρους μελέτη τους κρίθηκε απαραίτητη προκειμένου να προσδιοριστούν οι συνθήκες εκείνες που επιτρέπουν τον αποτελεσματικό εναντιομερή διαχωρισμό των αναλυτών στόχων. Στη συνέχεια, γίνεται εκτενής αναφορά στους παράγοντες εκείνους των οποίων η μεταβολή επέφερε πλήρη χειρόμορφο διαχωρισμό των αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης που εξετάστηκαν, σε συνάμα μικρό χρόνο ανάλυσης.

4.1.1.1 Συγκέντρωση Ρυθμιστικού Διαλύματος

Η επιλογή του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (τύπου και συγκέντρωσης) αποτελεί ίσως τη σημαντικότερη παράμετρο που θα πρέπει να διερευνηθεί κατά την ανάπτυξη μίας ηλεκτροφορητικής μεθόδου. Το BGE, το οποίο παρέχει το μέσο για τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος και, κατά συνέπεια, τον διαχωρισμό των φορτισμένων συστατικών, διαδραματίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην ηλεκτροφορητική διαδικασία [169,170]. Ένα BGE χαρακτηρίζεται από τη σύνθεσή του, δηλαδή τον τύπο και τη συγκέντρωση των ιόντων του, καθώς και τη ρυθμιστική του ικανότητα, τα οποία και θα πρέπει αξιολογηθούν κατά το πρώτο στάδιο της βελτιστοποίησης [170].

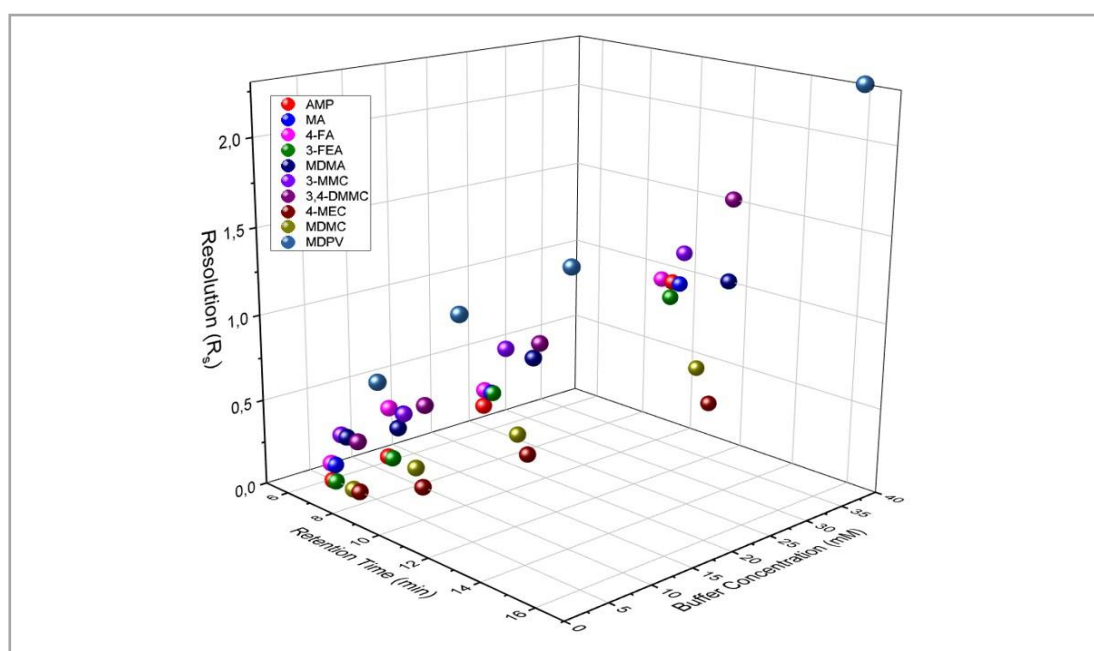
Βασιζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες για την παρασκευή των BGEs, στο πλαίσιο αυτής της διατριβής, έγινε χρήση μονοβασικού φωσφορικού νατρίου το οποίο αποτελεί και το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ηλεκτρολυτικό διάλυμα κατά τον προσδιορισμό των ψυχοδραστικών ενώσεων [2,142].

Στη συνέχεια διατηρώντας σταθερό το pH του BGE και ίσο με 2.5, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη στον χρόνο μετανάστευσης των αναλυτών καθώς και στη διαχωριστική τους ικανότητα. Το εύρος συγκέντρωσης του BGE που εξετάστηκε ήταν 5 mM έως 40 mM. Να σημειωθεί ότι σε αρχικό στάδιο η τιμή του pH επιλέχθηκε με βάση τη βιβλιογραφία και διατηρήθηκε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης [142]. Ωστόσο σε μεταγενέστερο στάδιο έλαβε χώρα

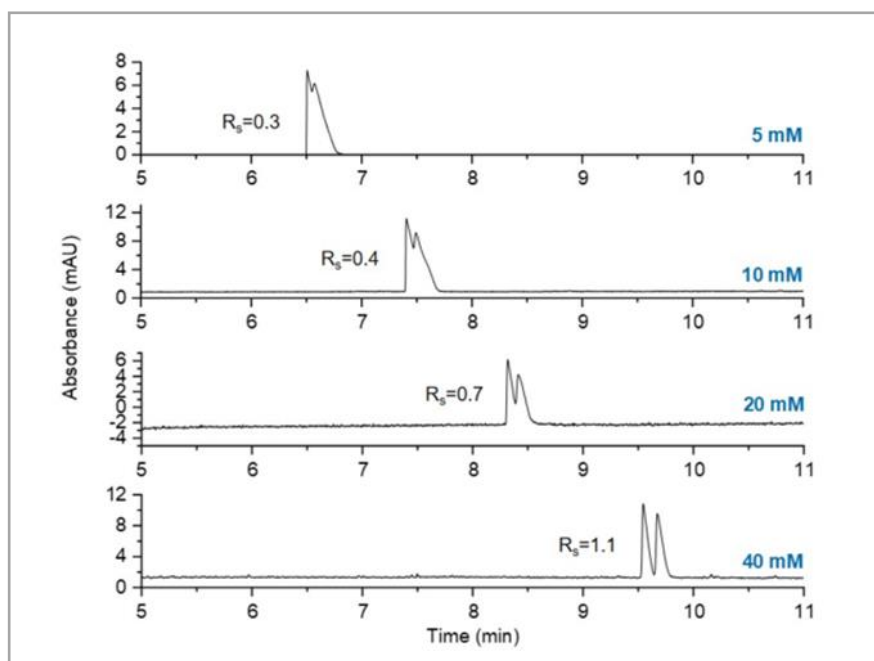
Κεφάλαιο 4

βελτιστοποίηση της τιμής του pH, η επίδραση του οποίου μελετήθηκε σε εύρος τιμών 2.5-3.5, με την τιμή pH ίση με 2.5 να επιλέγεται ως η βέλτιστη, λαμβάνοντας υπόψη τους μικρούς χρόνους ανάλυσης σε συνδυασμό με τον ικανοποιητικό διαχωρισμό που επιτεύχθηκε.

Όπως φαίνεται από τα Σχήματα 4.2 και 4.3, με αύξηση της συγκέντρωσης του BGE παρατηρήθηκε αύξηση των χρόνων μετανάστευσης και των δέκα αναλυτών, γεγονός το οποίο οδήγησε σε βελτίωση της διαχωριστικής τους ικανότητας. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη μείωση της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας (Electrophoretic mobility, μ_{ep}) των αναλυτών (π.χ., MDPV, από $8.7 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{V min}$ στα 5 mM NaH_2PO_4 σε $4.7 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{V min}$ στα 40 mM NaH_2PO_4) και στη μείωση της EOF (μ_{eo}) (π.χ., MDPV, από $8.7 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{V min}$ στα 5 mM NaH_2PO_4 σε $4.3 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{V min}$ στα 40 mM NaH_2PO_4), αυξάνοντας κατά συνέπεια τους χρόνους μετανάστευσης και οδηγώντας σε βελτίωση του εκάστοτε διαχωρισμού. Όσον αφορά τη μεταβολή της EOF, η μείωση η οποία παρατηρείται με την αύξηση της συγκέντρωσης του BGE, πιθανό να οφείλεται στην ελάττωση του δυναμικού ζήτα (zeta potential) και στην αύξηση του ιξώδους, ως αποτέλεσμα της αύξησης της ιοντικής ισχύος του BGE [115,171]. Ως βέλτιστη συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη επιλέχθηκαν τα 20 mM (20 mM NaH_2PO_4) μέσω των οποίων επιτεύχθηκε καλύτερος διαχωρισμός ($0.3 \leq R_s \leq 1.3$) σε συνδυασμό με το γρήγορο χρόνο μετανάστευσης ($t_R < 11 \text{ min}$).



Σχήμα 4.2. Επίδραση της συγκέντρωσης του BGE στους χρόνους μετανάστευσης και στη διαχωριστική ικανότητα των υπό μελέτη αναλυτών (5 mM β -CD, pH 2.5).



Σχήμα 4.3. Επίδραση της συγκέντρωσης του BGE στους χρόνους μετανάστευσης και στη διαχωριστική ικανότητα του αναλόγου 3-MMC (5 mM β-CD, pH 2.5).

4.1.1.2 Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης του CS

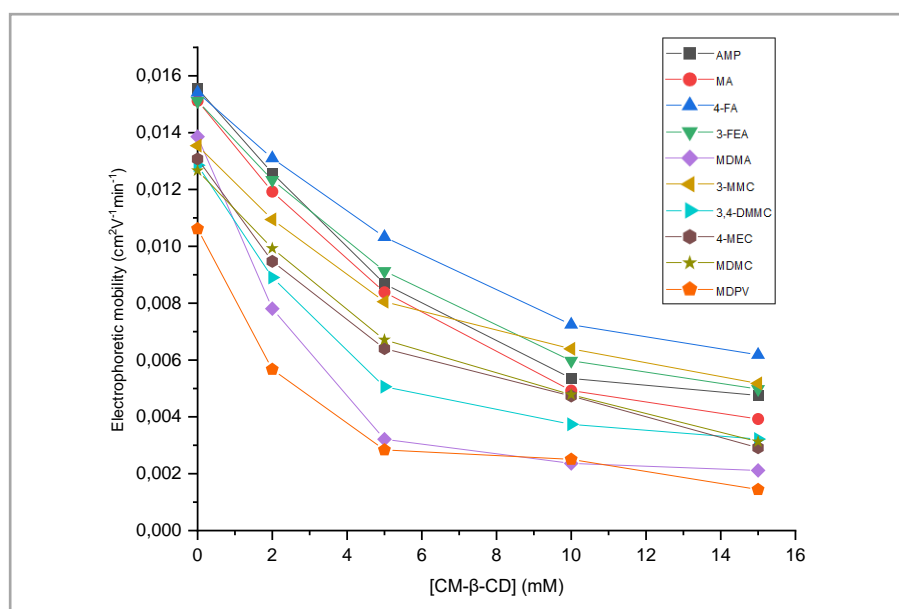
Η εύρεση του κατάλληλου είδους αλλά και της βέλτιστης συγκέντρωσης του CS, η οποία είναι αρκετή για εναντιοεκλεκτική αναγνώριση, είναι εξίσου σημαντική παράμετρος για την ανάπτυξη μίας μεθόδου. Στο πλαίσιο αυτής της έρευνας, μελετήθηκε ένα ευρύ φάσμα από CSs, τόσο φυσικές, όσο και παραγωγοποιημένες CDs και CFs, κάτω από τις ίδιες ηλεκτροφορητικές συνθήκες (συγκέντρωση του BGE, pH, θερμοκρασία, εφαρμοζόμενο δυναμικό, και μέγεθος έγχυσης). Συγκεκριμένα, η ικανότητά τους για εναντιοεκλεκτική αναγνώριση, αξιολογήθηκε, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του CS, για ένα σύνολο δέκα αναλόγων NPS, οι δομές των οποίων παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.2. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί, ότι η χρήση των CFs ως CSs για το χειρόμορφο διαχωρισμό εναντιομερών ψυχοδραστικών ενώσεων μελετήθηκε για πρώτη φορά στο πλαίσιο της εν λόγω διατριβής.

Σε μία προσπάθεια βελτίωσης της εναντιοεκλεκτικότητας των υπό μελέτη αναλυτών (Σχήμα 3.2), τόσο η φυσική β-CD όσο και δύο από τα παράγωγα της, carboxymethyl-β-CD (CM-β-CD) και 2-hydroxypropyl-β-CD (2-HP-β-CD), προστέθηκαν στον BGE (20 mM NaH₂PO₄, pH 2.5), σε ένα εύρος συγκεντρώσεων το οποίο κυμαινόταν από 5-15 mM.

Κεφάλαιο 4

Στο Σχήμα 4.4 παρουσιάζεται η μεταβολή της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας των υπό μελέτη αναλυτών (Εξίσωση 2.9) ως συνάρτηση της προστιθέμενης συγκέντρωσης CM-β-CD. Όπως είναι φανερό, με την αύξηση της συγκέντρωσης του προστιθέμενου CS, παρατηρήθηκε μείωση της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας όλων των αναλυτών. Ως αποτέλεσμα, παρατηρείται αύξηση στο χρόνο μετανάστευσης των αναλυτών, αύξηση των αλληλεπιδράσεων των εναντιομερών με το CS και, ως εκ τούτου, βελτίωση του εκάστοτε διαχωρισμού.

Από τις CDs που μελετήθηκαν, η CM-β-CD, βρέθηκε να είναι ο κατάλληλος CS για τον εναντιομερή διαχωρισμό των υπό μελέτη ενώσεων. Αποτέλεσμα το οποίο έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής ομάδας του Hagele *et al.* [172]. Συγκεκριμένα από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, και παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1, η χρήση της CM-β-CD σε συγκέντρωση ίση με 15 mM, οδήγησε σε επίτευξη πλήρους διαχωρισμού μόνο για τα ανάλογα 3-MMC ($R_s=1.5$) και MDPV ($R_s=3.1$), ενώ τα ανάλογα AMP, MA, 4-FA, 3-FEA, 3,4-DMMC, 4-MEC, και MDMC διαχωρίστηκαν μερικώς στα εναντιομερή τους με τιμές διαχωριστικής ικανότητας να κυμαίνονται από 1.1 έως 1.3. Σε αντίθεση με τα εναντιομερή του αναλόγου MDMA, τα οποία δεν διαχωρίστηκαν υπό αυτές τις συνθήκες.



Σχήμα 4.4. Μεταβολή της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας των αναλυτών.

Κεφάλαιο 4

Πίνακας 4.1. Αποτελέσματα χειρόμορφου διαχωρισμού δέκα αναλόγων NPS με χρήση CDs ως CSs (20 mM NaH₂PO₄, 15 mM CS, pH=2.5).

Αναλύτες	Χειρόμορφος Επιλογέας	t ₁ (min)	t ₂ (min)	a	R _s
AMP	β-CD	8.42	8.53	1.013	0.4
	CM-β-CD	15.95	16.38	1.027	1.2
	2-HP-β-CD	8.46	8.56	1.012	0.7
MA	β-CD	9.14	9.27	1.014	0.6
	CM-β-CD	17.58	18.00	1.024	1.3
	2-HP-β-CD	8.93	9.10	1.019	0.8
4-FA	β-CD	8.87	8.95	1.009	0.4
	CM-β-CD	13.73	13.97	1.017	1.1
	2-HP-β-CD	8.49	8.55	1.007	0.3
3-FEA	β-CD	9.57	9.71	1.015	0.5
	CM-β-CD	15.53	15.84	1.020	1.2
	2-HP-β-CD	8.74	8.83	1.010	0.4
MDMA	β-CD	12.13	12.31	1.015	0.6
	CM-β-CD	22.54	-	-	-
	2-HP-β-CD	11.30	11.60	1.027	1.3
3-MMC	β-CD	10.26	10.46	1.019	1.2
	CM-β-CD	15.69	16.06	1.024	1.5
	2-HP-β-CD	9.47	9.71	1.025	1.3
3,4-DMMC	β-CD	12.39	12.59	1.016	0.6
	CM-β-CD	18.73	19.07	1.018	1.2
	2-HP-β-CD	11.24	11.56	1.028	1.1
4-MEC	β-CD	11.65	11.76	1.009	p.s
	CM-β-CD	21.65	22.08	1.020	1.1
	2-HP-β-CD	10.32	10.56	1.023	1.0
MDMC	β-CD	11.41	11.52	1.010	0.3
	CM-β-CD	20.23	20.58	1.017	1.0

Κεφάλαιο 4

	2-HP-β-CD	10.43	10.67	1.023	1.4
	β-CD	13.56	13.82	1.019	1.1
MDPV	CM-β-CD	26.26	27.55	1.049	3.1
	2-HP-β-CD	12.73	-	-	-

Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν ουδέτερες CFs (CF-6, CF-7, IPCF-6, IPCF-7) καθώς επίσης και θεϊκές CFs (SCF-6, SCF-7) σε εύρος συγκεντρώσεων από 1 mM έως 40 mM και 0.2 mM έως 2 mM, αντίστοιχα. Η χρήση των ουδέτερων CFs δεν οδήγησε σε χειρόμορφο διαχωρισμό για κανέναν από τους υπό μελέτη αναλύτες. Συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 40 mM, δε μπόρεσαν να μελετηθούν λόγω δυσκολίας στη διαλυτότητα. Αντίθετα, η χρήση των θεϊκών CFs ως CSs οδήγησε σε αξιοσημείωτα αποτελέσματα. Το τελευταίο ήταν αναμενόμενο αφού όπως φάνηκε σε προηγούμενες μελέτες, οι θεϊκές CFs επιδεικνύουν εξαιρετική εναντιοεκλεκτικότητα προς όλους τους τύπους ενώσεων που περιέχουν αμίνες (amine-containing compounds). Συγκεκριμένα, οι θεϊκές CFs είναι εξαιρετικά αρνητικά φορτισμένα είδη, έτσι, όταν οι θετικά φορτισμένοι αναλύτες αλληλεπιδρούν με αυτές, προκαλείται μεταβολή της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας των υπό μελέτη αναλυτών. Ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης τους αυτής, παρατείνεται ο χρόνος μετανάστευσης των αναλυτών, αυξάνονται οι αλληλεπιδράσεις των εναντιομερών με το μέσο διαχωρισμού και βελτιώνεται ο εκάστοτε διαχωρισμός, υποδεικνύοντας έτσι τον σημαντικό ρόλο των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στη δέσμευση των αναλυτών με τις SCFs [80,173].

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, τα εναντιομερή των αναλόγων MDMA ($R_s = 3.4$), 3-MMC ($R_s = 3.1$), 3,4-DMMC ($R_s = 3.6$), και MDPV ($R_s = 1.8$) διαχωρίστηκαν πλήρως, όταν 1 mM SCF-6 προστέθηκε στο BGE. Αντίθετα, όταν η SCF-7 (1 mM) χρησιμοποιήθηκε ως CS, διαχωρίστηκαν πλήρως στα εναντιομερή τους έξι ανάλογα NPS (MDMA, 3-MMC, 3,4-DMMC, 4-MEC, MDMC, και MDPV) με τις τιμές R_s να κυμαίνονται μεταξύ $2.1 \leq R_s \leq 9.1$, εκ των οποίων τα πέντε ανήκουν στην κατηγορία των καθινονών.

Τα αποτελέσματα του χειρόμορφου διαχωρισμού για όλους τους υπό μελέτη CSs συνοψίζονται στο Σχήμα 4.5. Συγκεκριμένα, στο εν λόγω σχήμα παρουσιάζεται διαγραμματικά ο αριθμός των αναλυτών που διαχωρίζονται με χρήση τόσο CDs όσο

Κεφάλαιο 4

και CFs ως CSs. Οι αναλύτες αυτοί κατηγοριοποιήθηκαν σε τρεις ομάδες, με βάση της τιμές της διαχωριστικής τους ικανότητας (R_s): (i) $R_s < 1.5$, (ii) $R_s \geq 1.5$, και (iii) $R_s = 0$.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η χρήση της SCF-6 οδήγησε σε υψηλότερες τιμές διαχωριστικής ικανότητας για τα ανάλογα αμφεταμίνης, ενώ για τα ανάλογα καθινόνης, ο καλύτερος διαχωρισμός επιτεύχθηκε με χρήση της SCF-7. Τα αποτελέσματα της διαχωριστικής ικανότητας παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2. Επιπρόσθετα, στο Σχήμα 4.6, παρουσιάζονται διαγραμματικά οι τιμές της διαχωριστικής ικανότητας για ένα ανάλογο από την κατηγορία των καθινονών (4-MEC) και των αμφεταμινών (MDMA), στην παρουσία SCF-6 και SCF-7, αντίστοιχα.

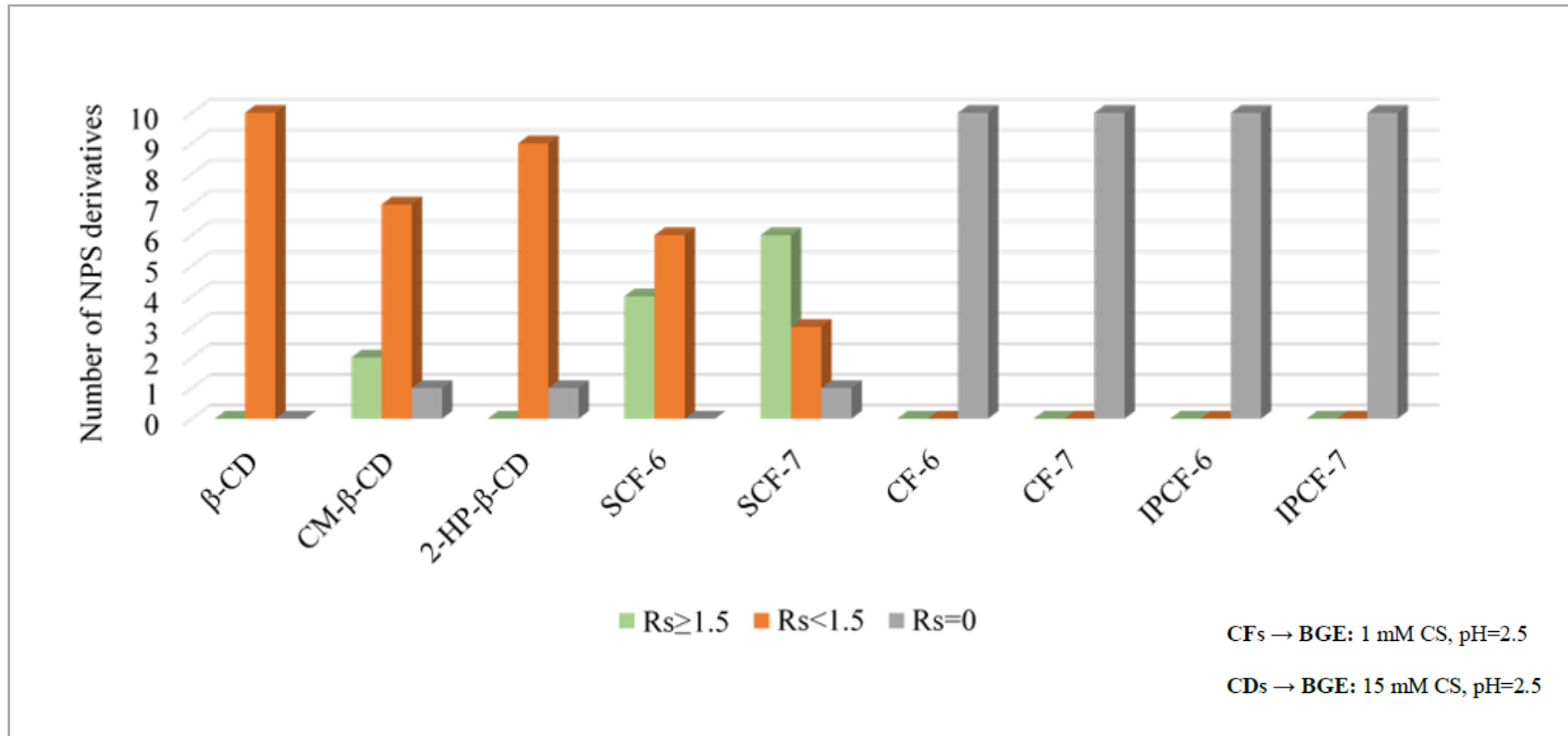
Πίνακας 4.2. Τιμές διαχωριστικής ικανότητας δέκα αναλόγων NPS με χρήση CFs ως CSs.

Αναλύτες	SCF-6	SCF-7
AMP	1.4	1.2
MA	0.4	*
4-FA	1.1	-
3-FEA	1.4	1.0
MDMA	3.4	2.1
3-MMC	3.1	5.8
3,4-DMMC	3.6	9.1
4-MEC	1.0	4.3
MDMC	0.6	2.3
MDPV	1.8	7.8

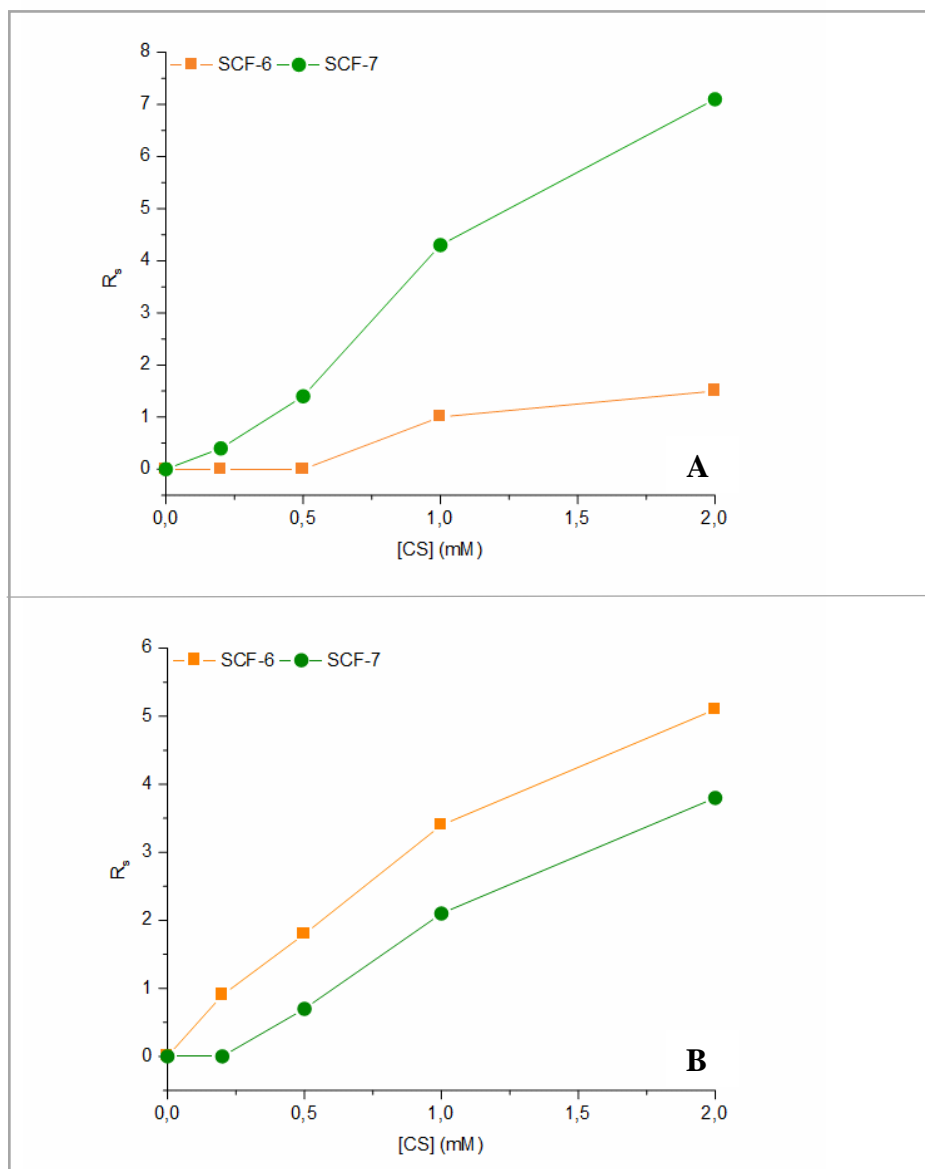
BGE: 20 mM NaH₂PO₄, 1 mM CS, pH=2.5

* Σχάση κορυφής

Το μέγεθος και το σχήμα του CS και η γεωμετρική διάταξη των λειτουργικών του ομάδων προσδιορίζουν την εναντιοεκλεκτικότητά του προς τους διαφορετικούς τύπους των αναλυτών [174]. Ταυτόχρονα, η εναντιοεκλεκτικότητα επηρεάζεται από τη γεωμετρία των αναλυτών, και κατά συνέπεια, από τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυτών και των CSs [142].



Σχήμα 4.5. Γραφική απεικόνιση του αριθμού αναλόγων NPS που διαχωρίζονται με χρήση CDs και CFs.



Σχήμα 4.6. Επίδραση της συγκέντρωσης του CS στη διαχωριστική ικανότητα. Σύγκριση της χρήσης SCF-6 και SCF-7 ως CSs στην περίπτωση του αναλόγου (A) 4-MEC και (B) MDMA.

Στη συνέχεια, λαμβάνοντας υπόψη το πιο πάνω συμπέρασμα, έγινε χρήση δυαδικού συστήματος (dual system) CSs, με απώτερο σκοπό την αύξηση της διαχωριστικής ικανότητας των υπό μελέτη ενώσεων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε δυαδικό σύστημα το οποίο αποτελείται από SCF-6 και SCF-7 σε συγκεντρώσεις 0.5 mM και 1 mM έκαστος. Από τα πειραματικά αποτελέσματα, η διαχωριστική ικανότητα των αναλόγων αμφεταμίνης μειώθηκε ελαφρώς (π.χ. AMP, $R_s=1.4 \rightarrow R_s=1.0$) με τη χρήση του δυαδικού συστήματος (0.5 mM SCF-6/0.5 mM SCF-7). Αντίθετα, στην περίπτωση των αναλόγων καθινόνης, οι τιμές της διαχωριστικής ικανότητας μειώθηκαν αισθητά (π.χ. 3-MMC, $R_s=5.8 \rightarrow R_s=2.4$), χωρίς ωστόσο να χάνεται η εναντιοεκλεκτική αναγνώριση

των εναντιομερών ($R_s \geq 1.5$). Επιπρόσθετα, όπως ήταν αναμενόμενο, η χρήση μίγματος σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (1 mM από κάθε SCF) οδήγησε σε αύξηση των χρόνων έκλουσης των αναλυτών ($t_R > 20$ min). Τέτοιες αλλαγές στην εναντιοεκλεκτική αναγνώριση σε δυαδικά συστήματα CSs είναι δύσκολο να προσδιοριστούν πλήρως. Ίσως κυριαρχούν συνεργειακά ή ανταγωνιστικά φαινόμενα τα οποία καθιστούν αναμενόμενη τη συνολική επίδραση στον χειρόμορφο διαχωρισμό [83]. Το δυαδικό αυτό σύστημα (0.5 mM SCF-6/0.5 mM SCF-7) εξετάστηκε επιπλέον και ως προς τον εναντιομερή διαχωρισμό μίγματος αναλόγων NPS. Κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες, επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός.

4.1.1.3 Επίδραση του pH

Το pH του BGE αποτελεί επίσης μία σημαντική παράμετρο, αφού καθορίζει τον βαθμό ιονισμού των αναλυτών και κατά συνέπεια επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις τους με τους CSs. Προκειμένου να προσδιοριστεί με ακρίβεια η βέλτιστη τιμή pH, έλαβε χώρα περαιτέρω μελέτη αυτής της παραμέτρου. Οι τιμές του pH του BGE (20 mM NaH_2PO_4), το οποίο περιείχε είτε 1 mM SCF-7 είτε 15 mM CM- β -CD ως χειρόμορφα πρόσθετα, προσαρμόστηκε στα 2.5, 3.0 και 3.5. Όπως παρατηρήθηκε στην περίπτωση της SCF-7, η αύξηση του pH του BGE οδήγησε σε αισθητή μείωση, τόσο της διαχωριστικής ικανότητας, όσο και των χρόνων μετανάστευσης όλων των υπό μελέτη ενώσεων. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην αύξηση της EOF, ως συνάρτηση της αύξησης του pH [81,142]. Αντιθέτως, αύξηση της τιμής του pH του BGE, το οποίο περιείχε CM- β -CD ως CS, οδήγησε σε αύξηση των χρόνων ανάλυσης όλων των αναλυτών ($t_R > 45$ min, pH 3.5). Αξίζει να αναφερθεί ότι, στην περίπτωση της CM- β -CD, όταν το pH ήταν ίσο ή μικρότερο από 3 ($\text{pH} \leq 3$), οι αναλύτες εκλούονταν ως θετικά φορτισμένα είδη, ενώ σε υψηλότερες τιμές pH, ως αρνητικά φορτισμένες ενώσεις. Το pH=2.5 επιλέχθηκε ως το βέλτιστο για περαιτέρω πειράματα, λόγω του ότι έδωσε την καλύτερη διαχωριστική ικανότητα και τους μικρότερους χρόνους μετανάστευσης.

4.1.1.4 Επίδραση εφαρμοζόμενης τάσης

Η τάση που εφαρμόζεται στα άκρα της τριχοειδούς στήλης φαίνεται να αποτελεί άλλο ένα παράγοντα που επιδρά σημαντικά στην ικανότητα διαχωρισμού. Η αλλαγή στην τιμή της προκαλεί μεταβολή της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου, την κινητήρια δύναμη πίσω από την ηλεκτροφορητική μετανάστευση των ιόντων, η οποία με τη σειρά της επηρεάζει την ταχύτητα της EOF (V_{eo}) και την ταχύτητα μετανάστευσης των φορτισμένων σωματιδίων (V_{ep}) [175,176]. Με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών διαχωρισμού των υπό ανάλυση ενώσεων, εφαρμόστηκε τάση στο εύρος τιμών 22-30 kV. Όπως ήταν αναμενόμενο, η αύξηση της εφαρμοζόμενης τάσης οδήγησε σε αύξηση της ταχύτητας της EOF, μείωση του χρόνου ανάλυσης και αύξηση της αποδοτικότητας των κορυφών. Εξαιτίας της μείωσης του φαινομένου της διαμήκουσ διάχυσης των μορίων με τη μείωση του χρόνου ανάλυσης, οι κορυφές των αναλυτών στο ηλεκτροφερόγραμμα έγιναν πιο οξείες. Ως εκ τούτου, τα 25 kV επιλέχθηκαν ως η βέλτιστη εφαρμοζόμενη τάση.

4.1.2 Βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού

Σύμφωνα με τις παραπάνω μελέτες, ο βέλτιστος διαχωρισμός των υπό εξέταση αναλόγων NPS επιτεύχθηκε με χρήση 20 mM φωσφορικού νατρίου ως ηλεκτρολυτικό διάλυμα ρυθμισμένο σε τιμή pH ίση με 2.5, με εφαρμοζόμενη τάση ίση με 25 kV και χρήση 1 mM SCF-6 και 1 mM SCF-7 ως CSs στην περίπτωση των αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης, αντίστοιχα. Στον Πίνακα 4.3, παρατίθενται τα αποτελέσματα που λήφθηκαν κάτω από τις βέλτιστες αυτές συνθήκες.

Πίνακας 4.3. Χρόνοι μετανάστευσης, εναντιοεκλεκτικότητα και τιμές διαχωριστικής ικανότητας, για το χειρόμορφο διαχωρισμό δέκα αναλόγων NPS υπό τις βέλτιστες συνθήκες.

Αναλύτες	t_1 (min)	t_2 (min)	α	R_s
AMP	13.43	13.80	1.028	1.4
MA	15.06	15.24	1.012	0.4
4-FA	14.65	14.92	1.018	1.1
3-FEA	15.10	15.48	1.025	1.4

Κεφάλαιο 4

MDMA	18.53	19.82	1.070	3.4
3-MMC	16.89	17.96	1.063	5.8
3,4-DMMC	17.78	22.34	1.256	9.1
4-MEC	14.54	15.20	1.045	4.3
MDMC	16.32	17.44	1.069	2.3
MDPV	19.38	21.47	1.108	7.8

4.1.3 Αξιολόγηση μεθόδου

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε αξιολογήθηκε ως προς την πιστότητα της (precision). Για την πλήρη αξιολόγηση της πιστότητας της μεθόδου, μελετήθηκε, τόσο η επαναληψιμότητα (repeatability, intra-day precision), όσο και η αναπαραγωγιμότητα (reproducibility, inter-day precision) των χρόνων μετανάστευσης των δύο εναντιομερών των αναλυτών (t_1 και t_2) υπό τις βέλτιστες συνθήκες (20 mM NaH_2PO_4 BGE, το οποίο περιείχε 1 mM SCF-6 για τα ανάλογα αμφεταμίνης και 1 mM SCF-7 για τα ανάλογα καθινόνης, pH 2.5).

Για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας, έλαβαν χώρα 5 διαδοχικά ηλεκτροφορητικά πειράματα εντός της ίδιας ημέρας (intra – day precision), ενώ για εύρεση της αναπαραγωγιμότητας, πραγματοποιήθηκαν 5 επαναληπτικά ηλεκτροφορητικά πειράματα για 3 συνεχόμενες μέρες (inter – day precision). Τα αποτελέσματα λήφθηκαν σε όρους σχετικής τυπικής απόκλισης (relative standard deviation, RSD %) και παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.4. Συγκεκριμένα, οι τιμές επαναληψιμότητας που λήφθηκαν των χρόνων μετανάστευσης όλων των αναλυτών ήταν μικρότερες από 1.7 %. Αντίθετα, οι τιμές αναπαραγωγιμότητας ήταν υψηλότερες, όμως δεν ξεπερνούσαν την τιμή 1.9 %. Υποδεικνύοντας την πολύ καλή επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα που χαρακτηρίζει τη μέθοδο που αναπτύχθηκε.

Κεφάλαιο 4

Πίνακας 4.4. Αποτελέσματα από την αξιολόγηση της ηλεκτροφορητικής μεθόδου.

Ένωση	Επαναληψιμότητα (Intra-day precision) (n=5)		Αναπαραγωγιμότητα (Inter-day precision) (n=5)	
	t ₁	t ₂	t ₁	t ₂
	(RSD%)	(RSD%)	(RSD%)	(RSD%)
AMP	0.2	0.2	1.0	0.9
MA	0.7	0.8	1.4	1.5
4-FA	0.4	0.4	1.1	1.1
3-FEA	0.5	0.4	0.9	0.9
MDMA	0.7	0.7	1.7	1.7
3-MMC	1.5	1.6	1.8	1.8
3,4-DMMC	0.3	0.7	0.6	1.7
4-MEC	0.3	0.5	1.0	1.0
MDMC	0.4	0.5	1.0	0.9
MDPV	1.5	1.7	1.3	1.9

4.1.4 Ικανότητα χειρόμορφης αναγνώρισης των CSs (CF, CD) ως προς τους υπό μελέτη αναλύτες

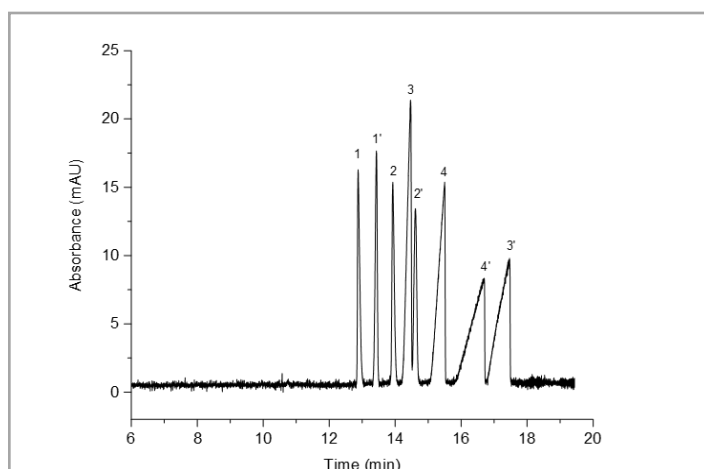
Στη μελέτη αυτή καταδεικνύεται μεγαλύτερη εναντιοεκλεκτικότητα των υπό μελέτη CSs, τόσο CFs όσο και CDs, για συγκεκριμένα ανάλογα (αμφεταμινών ή καθινονών). Αξίζει να αναφερθεί ότι οι ικανότητες χειρόμορφης αναγνώρισης μεταξύ των δύο τύπων CSs (CFs ή CDs), είναι διαφορετικές λόγω της διαφορετικής ραχοκοκαλιάς (backbones) και της υποκατάστασής τους. Τα πειραματικά αποτελέσματα κατέδειξαν ότι, η εναντιοεκλεκτικότητα για όλους τους υπό μελέτη CSs ήταν χαμηλότερη για αναλύτες με άτομο φθορίου στην *para* θέση. Συγκεκριμένα, οι τιμές της διαχωριστικής ικανότητας για την αμφεταμίνη (AMP) κυμαίνονταν από 0.4 έως 1.4, ενώ στην περίπτωση της 4-φθοροαμφεταμίνης (4-FA), από 0.3 έως 1.1. Επιπρόσθετα, η παρουσία ενός επιπλέον μεθυλίου στην *para* θέση του αναλόγου 3,4-διμεθυλμεθκαθινόνη [3,4-DMMC ($0.6 \leq R_s \leq 1.2$)], οδήγησε σε μείωση της ικανότητας χειρόμορφης αναγνώρισης των υπό μελέτη CDs (CD-based CSs), καθώς υψηλότερες τιμές διαχωριστικής ικανότητας παρατηρήθηκαν στην περίπτωση της 3-

Κεφάλαιο 4

μεθυλμεθκαθινόνης [3-MMC ($1.3 \leq R_s \leq 1.5$)], όπου η μεθυλομάδα απουσιάζει από την *para* θέση. Το αντίθετο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε στην περίπτωση χρήσης των θειϊκών κυκλοφρουκτανών (SCFs) ως CSs. Οι SCF-6 και SCF-7 βρέθηκαν να είναι πιο εναντιοεκλεκτικές για ανάλογα με μεθυλομάδα στην *para* θέση. Συγκεκριμένα, στην παρουσία τόσο της SCF-6 όσο και SCF-7, τα ανάλογα 3-MMC και 3,4-DMMC διαχωρίστηκαν πλήρως στα εναντιομερή τους με τιμές διαχωριστικής ικανότητας ίσες με 3.1 και 5.8 (στην περίπτωση του 3-MMC), και 3.6 και 9.1 (στην περίπτωση του 3,4-DMMC), αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, οι CFs κατέδειξαν εξαιρετικά χαμηλή χειρόμορφη αναγνώριση για τη MA. Αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία της μεθυλομάδας στο άτομο του αζώτου της MA επηρεάζει σημαντικά τον χειρόμορφο διαχωρισμό. Οι τιμές της διαχωριστικής ικανότητας των αναλόγων AMP και MA ήταν 1.4 και 0.4, αντίστοιχα, όταν χρησιμοποιήθηκε η SCF-6 ως CS. Αυτό δεν παρατηρείται στην περίπτωση των CSs βασισμένων σε CDs (CDs-based CSs), αφού οι τιμές διαχωριστικής ικανότητας που λήφθηκαν για την AMP και MA, ήταν αρκετά παρόμοιες (π.χ., $R_s \approx 1.3$, CM- β -CD).

4.1.5 Εφαρμογή της μεθόδου-Ταυτόχρονος χειρόμορφος διαχωρισμός

Στη συνέχεια, η προτεινόμενη ηλεκτροφορητική μέθοδος εφαρμόστηκε επιτυχώς για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό μιγμάτων, αναλόγων καθινόνης, αμφεταμινής όσο και συνδυασμό των δύο. Στο Σχήμα 4.7 παρατίθεται το ηλεκτροφερογράμμα που λήφθηκε από τη μελέτη του μίγματος καθινονών (3-MMC, 3,4-DMMC, 4-MEC, και MDMC), με χρήση της SCF-7 (1 mM) ως CS για το διαχωρισμό του συγκεκριμένου μίγματος αναλυτών.



Σχήμα 4.7. Ταυτόχρονος χειρόμορφος διαχωρισμός μίγματος καθινονών. (1,1') 4-Μεθυλαιθκαθινόνη, (2,2') 3-Μεθυλμεθκαθινόνη, (3,3') 3,4-Διμεθυλμεθκαθινόνη, (4,4') 3,4-Μεθυλενοδιοξυμεθκαθινόνη. Συνθήκες: 1 mM SCF-7, 20 mM NaH_2PO_4 , pH=2.5, T = 25 °C, V = 25 kV στην κάθοδο, έγχυση δείγματος = 50 mbar για 5 s, δείγμα: 0.2 mg/mL σε MeOH, ανίχνευση: 210 nm.

Η ταυτοποίηση των κορυφών των αναλυτών έγινε μέσω της διαδικασίας spiking. Τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν κατέδειξαν την επιτυχή εφαρμογή της μεθόδου σε μίγματα ενώσεων, και την εφαρμογή της και για τον διαχωρισμό ενώσεων που έχουν παρόμοιες χημικές δομές, και συγκεκριμένα, ενώσεων που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το είδος και τη θέση των υποκαταστατών (π.χ. αλογόνου, αλκυλομάδας) που περιέχουν στη δομή τους.

4.1.6 Σύγκριση αποτελεσμάτων και υπάρχουσας βιβλιογραφίας

Ο εναντιομερής διαχωρισμός των εν λόγω ενώσεων με χρήση των CFs δεν έχει αναφερθεί σε καμία προηγούμενη μελέτη. Έτσι, η σύγκριση των αποτελεσμάτων με υπάρχουσες μελέτες θα περιοριστεί στη χρήση των CDs ως CSs.

Ο Hagele *et al.* [2] διερεύνησε τον χειρόμορφο διαχωρισμό ενός μεγάλου αριθμού παραγώγων καθινόνης. Πενήντα οκτώ από τα υπό μελέτη ανάλογα διαχωρίστηκαν στα εναντιομερή τους με χρήση τεσσάρων διαφορετικών β-CDs (β-CD, Acetyl-β-CD, 2-HP-β-CD, και CM-β-CD). Ως BGE χρησιμοποιήθηκε μονοβασικό φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4) συγκέντρωσης 10 mM. Σε σύγκριση με την πιο πάνω μελέτη, στην οποία έχουν χρησιμοποιηθεί παρόμοιες συνθήκες χειρόμορφου διαχωρισμού (με βάση την CM-β-CD), στην παρούσα μελέτη επιτεύχθηκε πλήρης χειρόμορφος διαχωρισμός του αναλόγου 3-MMC, αντί μερικού διαχωρισμού (partial separation), ενώ υψηλότερες τιμές διαχωριστικής ικανότητας λήφθηκαν για την 3,4-DMMC και MDPV (τιμές $R_s = 1.2$ έναντι της τιμής $R_s = 0.8$, και $R_s = 3.1$ έναντι της τιμής $R_s = 1.5$, αντίστοιχα). Από την άλλη πλευρά, χαμηλότερη τιμή διαχωριστικής ικανότητας παρατηρήθηκε για το ανάλογο 4-MEC ($R_s = 1.1$ αντί της τιμής $R_s = 3.0$).

Καλύτερα αποτελέσματα χειρόμορφου διαχωρισμού για τα ανάλογα 3,4-DMMC ($R_s = 1.2$), 4-MEC ($R_s = 1.1$), και MDMC ($R_s = 1.0$), αναφέρθηκαν επίσης από την ομάδα του Mohr *et al.* [81]. Αντίθετα, στην παρούσα μελέτη, πλήρης χειρόμορφος διαχωρισμός επιτεύχθηκε για το ανάλογο MDPV με τιμή διαχωριστικής ικανότητας ίση με 3.1 αντί για 1.0.

Επιπρόσθετα, όσον αφορά τα αποτελέσματα για τα ανάλογα της αμφεταμίνης, ο εναντιομερής διαχωρισμός του αναλόγου 4-FA επιτεύχθηκε με επιτυχία από την

Κεφάλαιο 4

ερευνητική ομάδα Řezankova *et al.* [177], σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη στην οποία δεν έγινε εφικτό.

Ωστόσο, εξ όσων γνωρίζουμε, ο επιτυχής εναντιομερής διαχωρισμός αναλόγων NPS με χρήση θεϊκών κυκλοφρουκτανών, αναφέρθηκε εδώ για πρώτη φορά και οδήγησε σε πλήρη διαχωρισμό για έξι εκ των δέκα υπό μελέτη αναλόγων, με τιμές διαχωριστικής ικανότητας να κυμαίνονται από 2.3 έως 9.1.

4.1.7 Συμπεράσματα

Κατά το πρώτο στάδιο της παρούσας διδακτορικής εργασίας, προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες και αναπτύχθηκε μίας απλή, γρήγορη και αξιόπιστη ηλεκτροφορητική μέθοδος για τον χειρόμορφο διαχωρισμό εναντιομερών ψυχοδραστικών ενώσεων, αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης. Με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών διαχωρισμού των υπό εξέταση ενώσεων, μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων παραμέτρων, μεταξύ των οποίων το είδος και η συγκέντρωση του CS (CDs, CFs), η συγκέντρωση και το pH του BGE, καθώς και η εφαρμοζόμενη τάση.

Σημαντική αποδείχθηκε η συγκέντρωση του CS στο BGE, η προσθήκη του οποίου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των ηλεκτροφορητικών ευκινήσιων των αναλυτών στόχων και τη βελτίωση του διαχωρισμού. Η χρήση των CFs ως CSs για τον χειρόμορφο διαχωρισμό εναντιομερών ψυχοδραστικών ενώσεων μελετήθηκε για πρώτη φορά και, όπως αποδείχθηκε, έδωσε εξαιρετικά αποτελέσματα.

Η χρήση των ουδέτερων CFs δεν οδήγησε σε χειρόμορφο διαχωρισμό για κανέναν από τους υπό μελέτη αναλύτες, ενώ η χρήση των θεϊκών CFs επέτρεψε τον αποτελεσματικό διαχωρισμό έξι εκ των δέκα υπό μελέτη NPS. Ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε με χρήση 20 mM φωσφορικού νατρίου ως ηλεκτρολυτικό διάλυμα στην παρουσία 1 mM SCF-6 ή 1 mM SCF-7 ως CSs στην περίπτωση των αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης, αντίστοιχα. Το pH του BGE διατηρήθηκε σταθερό και ίσο με 2.5, ενώ εφαρμόστηκε διαφορά δυναμικού ίση με 25 kV. Ακολούθως, η μέθοδος η οποία αναπτύχθηκε, αξιολογήθηκε ως προς την πιστότητά της και εφαρμόστηκε με επιτυχία σε μίγματα αμφεταμινών και καθινονών.

Κεφάλαιο 4

Ωστόσο, στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί πως η πιο πάνω μέθοδος δεν οδήγησε σε επίτευξη πλήρους διαχωρισμού για κάποια υπό μελέτη ανάλογα αμφетаμινών, με κανένα υπό εξέταση CS, είτε CD, είτε CF. Επομένως, προκύπτει η ανάγκη για την ανάπτυξη μίας βέλτιστης μεθόδου για τον εναντιομερή διαχωρισμό των εν λόγω ενώσεων. Με βάση τα όσα προαναφέρθηκαν, προτείνεται η χρήση προσθέτων, τόσο AAILs καθώς και DESs στον BGE.

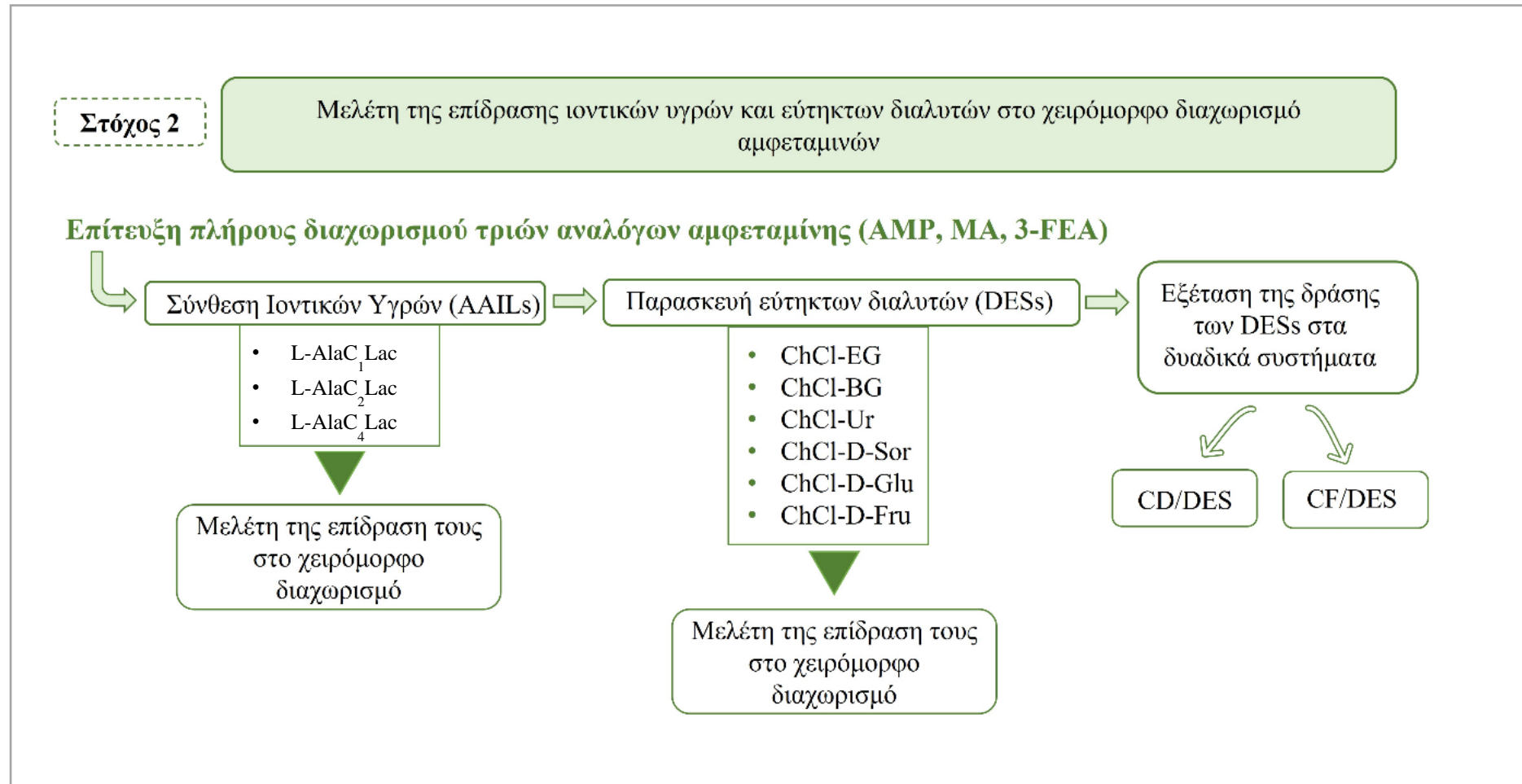
4.2 Μελέτη της επίδρασης AAILs και DESs στον χειρόμορφο διαχωρισμό αμφетаμινών

Στόχο της παρούσας μελέτης αποτελεί η ανάπτυξη μίας βέλτιστης μεθόδου για την επίτευξη πλήρους διαχωρισμού τριών αναλόγων αμφетаμίνης (AMP, MA, 3-FEA), τα οποία δεν είχαν διαχωριστεί πλήρως σε προηγούμενο στάδιο.

Στο στάδιο αυτό, έλαβε χώρα μελέτη της επίδρασης AAILs καθώς και DESs ως πρόσθετα στον BGE ο οποίος περιέχει CS (CDs, (CFs). Επιπρόσθετα, εξετάστηκε η δράση (συνεργειακή/ανταγωνιστική) των DESs σε συνδυασμό με CDs και CFs ως CSs, αντίστοιχα.

Πολλοί ερευνητές επικεντρώθηκαν στη χρήση τόσο των AAILs όσο και των DESs ως πρόσθετα στον BGE με απώτερο σκοπό την επίτευξη πλήρους διαχωρισμού διαφόρων ενώσεων. Ωστόσο, η εφαρμογή τους σε αυτή την κατηγορία ενώσεων (ψυχοδραστικές ενώσεις) δεν έχει, μέχρι τώρα, αναφερθεί. Επιπρόσθετα, αξίζει να τονιστεί ότι, εξ όσων γνωρίζουμε, σε καμία προηγούμενη μελέτη δεν έχει γίνει χρήση των DESs ως πρόσθετα στον BGE ο οποίος περιέχει CFs ως CSs.

Τέλος, με εφαρμογή της προτεινόμενης ηλεκτροφορητικής μεθόδου, κατέστη δυνατός ο πλήρης χειρόμορφος διαχωρισμός των υπό μελέτη αμφетаμινών. Επιπρόσθετα, εξάχθηκαν σημαντικά συμπεράσματα για την πιθανή δράση των DESs (συνεργειακή/ανταγωνιστική) στα δυαδικά συστήματα CD/DES και CF/DES. Ακολούθως, παρέχεται διάγραμμα ροής της πορείας που ακολουθήθηκε για την υλοποίηση του δεύτερου στόχου της εν λόγω Δ.Δ. (Σχήμα 4.8).



Σχήμα 4.8. Διάγραμμα ροής Στόχου 2 της Δ.Δ.

4.2.1 Επίδραση της προσθήκης AAILs

Με σκοπό τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού των αναλόγων αμφεταμίνης (AMP, MA, 3-FEA), τα οποία δεν είχαν πλήρως διαχωριστεί (Υποκεφάλαιο 4.1), μελετήθηκε αρχικά η επίδραση της προσθήκης AAILs ως αφού είχαν ήδη χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε χειρόμορφους διαχωρισμούς στην CE [117]. Συγκεκριμένα, τα AAILs (L-AlaC₁Lac, L-AlaC₂Lac, L-AlaC₄Lac) που συντέθηκαν στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης, προστέθηκαν στον BGE (20 mM NaH₂PO₄, pH=2.5), ο οποίος περιείχε τόσο CD (15 mM CM-β-CD), όσο και CF (1 mM SCF-6), σε συγκεντρώσεις οι οποίες κυμαίνονταν από 2.5 mM έως 7.5 mM και από 2.5 mM έως 20 mM, αντίστοιχα.

Ωστόσο, παρόλο που σε προηγούμενες μελέτες, τα AAILs βελτίωσαν τον εναντιομερή διαχωρισμό ενός μεγάλου αριθμού χειρόμορφων ενώσεων [95,99,178], στην παρούσα μελέτη, δε σημειώθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές στη διαχωριστική ικανότητα των αμφεταμινών. Συγκεκριμένα, από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι τιμές της διαχωριστικής ικανότητας μειώθηκαν ελαφρώς, ενώ σε άλλες, παρέμειναν οι ίδιες ως συνάρτηση της αύξησης της συγκέντρωσης των AAILs.

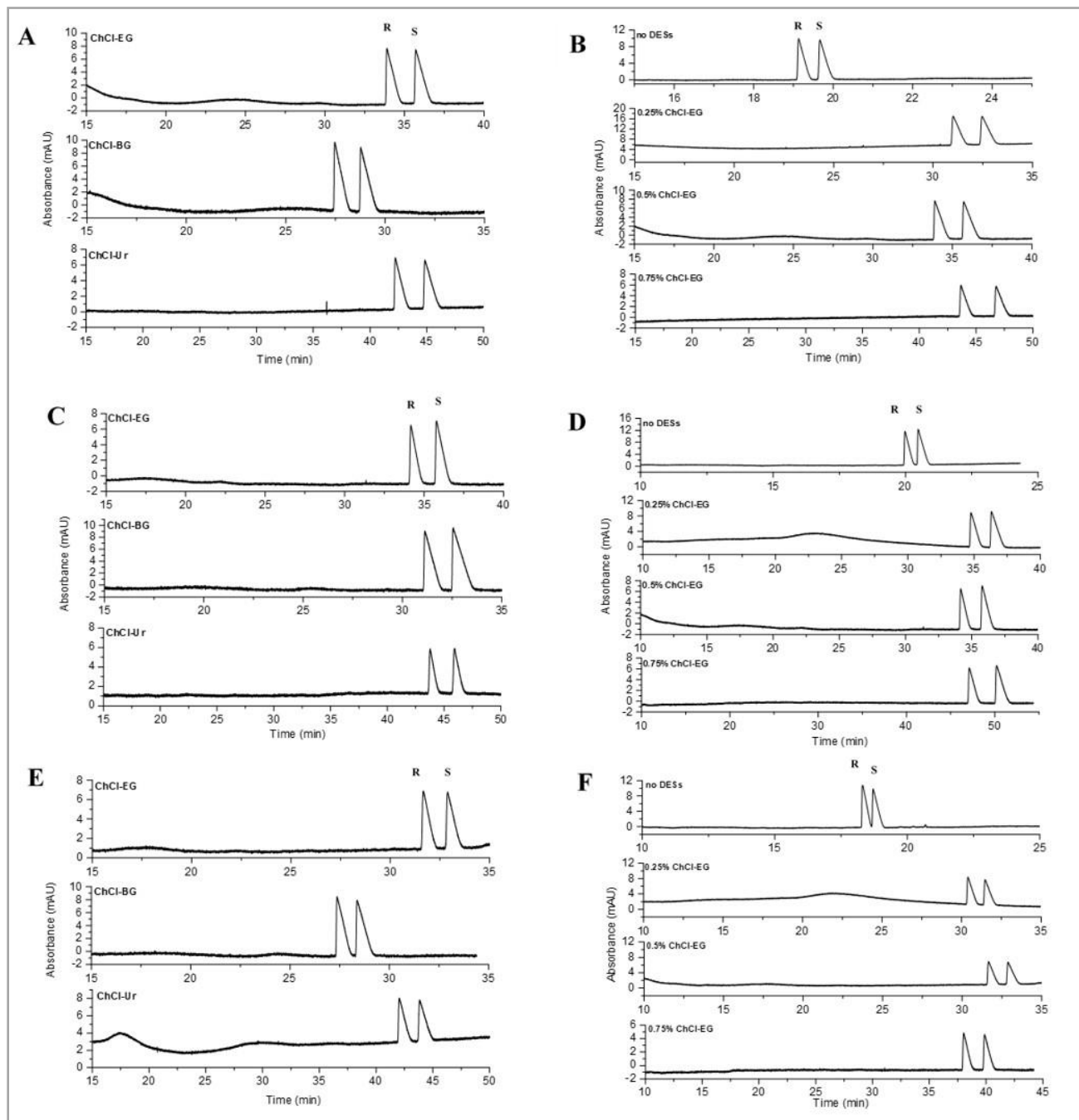
4.2.2 Επίδραση του είδους και του ποσοστού των DESs - Μελέτη του δυαδικού συστήματος CD/DES

Μετά τη μη επιτυχή βελτίωση του διαχωρισμού με χρήση των AAILs, κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη της επίδρασης άλλων προσθέτων, όπως για παράδειγμα DESs, στον BGE. Για τον σκοπό αυτό, τα έξι διαφορετικά DESs τα οποία παρασκευάστηκαν και πάλι στο Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης (Πίνακας 3.1), τόσο χειρόμορφα (ChCl-D-Sor, ChCl-D-Glu, ChCl-D-Fru) όσο και μη χειρόμορφα (ChCl-EG, ChCl-BG, ChCl-Ur), προστέθηκαν σε διαφορετικά ποσοστά, στον BGE ο οποίος περιείχε αρχικά CD ως CS (15 mM CM-β-CD). Το εύρος του ποσοστού των DESs που εξετάστηκαν ήταν από 0 έως 0.025% v/v και 0 έως 0.75% v/v, για τα χειρόμορφα και τα μη χειρόμορφα DESs, αντίστοιχα.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν και παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.9, αξιοσημείωτη βελτίωση στις τιμές της διαχωριστικής ικανότητας παρατηρείται με

Κεφάλαιο 4

συνδυασμό των DESs με την CM-β-CD (δυναμικό σύστημα CM-β-CD/DES), υποδηλώνοντας την ύπαρξη συνεργειακού φαινομένου μεταξύ CM-β-CD και DES (Σχήμα 4.9 B, D, F).

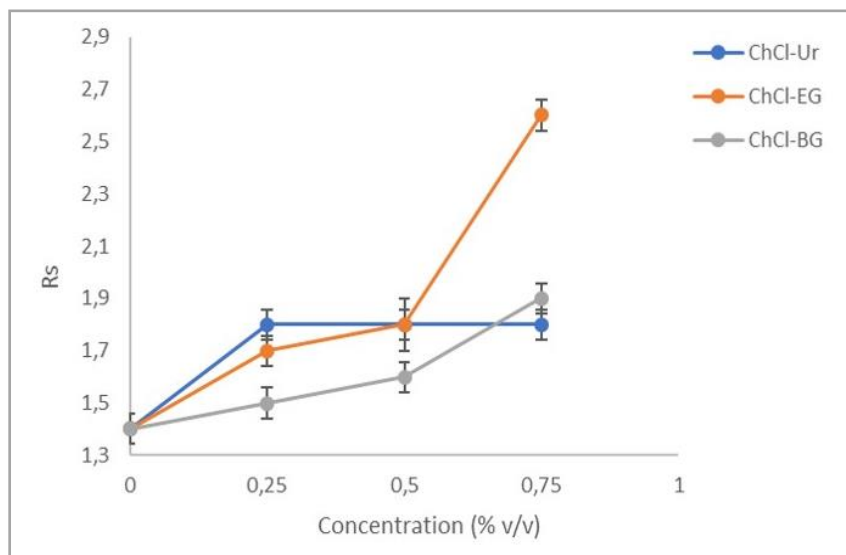


Σχήμα 4.9. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των μη-χειρόμορφων DESs στο χειρόμορφο διαχωρισμό της AMP, MA και 3-FEA σε BGE το οποίο περιέχει 15 mM CM-β-CD. (A) και (B) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της AMP, (C) και (D) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της MA, και (E) και (F) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της 3-FEA, όταν ο τύπος (0.50% v/v) και η συγκέντρωση του DESs μεταβάλλεται, αντίστοιχα.

Κεφάλαιο 4

Συγκεκριμένα, με αύξηση του ποσοστού του DES (ChCl-EG), παρατηρείται αύξηση στους χρόνους μετανάστευσης των αναλυτών καθώς και αξιοσημείωτη βελτίωση στη διαχωριστική τους ικανότητα. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην προσρόφιση των μορίων του DES (ChCl) στα τοιχώματα της στήλης, μέσω ανάπτυξης ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων ομάδων σιλανόλης και του θετικά φορτισμένου ChCl. Αυτό οδηγεί σε μείωση της EOF και ως εκ τούτου σε αύξηση των αλληλεπιδράσεων και βελτίωση του εκάστοτε διαχωρισμού [118,138,179]. Ωστόσο, προέκυψαν υψηλότερες τιμές ρεύματος με την αύξηση του ποσοστού του DES, ως συνέπεια της αύξησης του ιξώδους του ρυθμιστικού διαλύματος [118]. Επομένως, ως βέλτιστο ποσοστό στην περίπτωση των μη χειρόμορφων DES, επιλέχθηκε το 0.50% v/v.

Επιπρόσθετα, με κύριο γνώμονα την καλύτερη διαχωριστική ικανότητα σε συνδυασμό με το γρήγορο χρόνο μετανάστευσης, από τα τρία μη χειρομόμορφα DESs που μελετήθηκαν (ChCl-EG, ChCl-BG, ChCl-Ur), το πρόσθετο ChCl-EG (0.50% v/v), επιλέχθηκε ως το καταλληλότερο για την επίτευξη χειρόμορφου διαχωρισμού των υπό μελέτη αναλυτών, αφού έδωσε την καλύτερη διαχωριστική ικανότητα (Σχήμα 4.10), και τους μικρότερους χρόνους ανάλυσης (Σχήμα 4.9A, C, E).



Σχήμα 4.10. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των μη-χειρόμορφων DESs στον χειρόμορφο διαχωρισμό της AMP.

Η προσθήκη του προαναφερθέντος DES στον BGE (0.5% v/v ChCl-EG) οδήγησε σε επίτευξη πλήρους διαχωρισμού για όλους τους υπό μελέτη αναλύτες. Συγκεκριμένα, οι

Κεφάλαιο 4

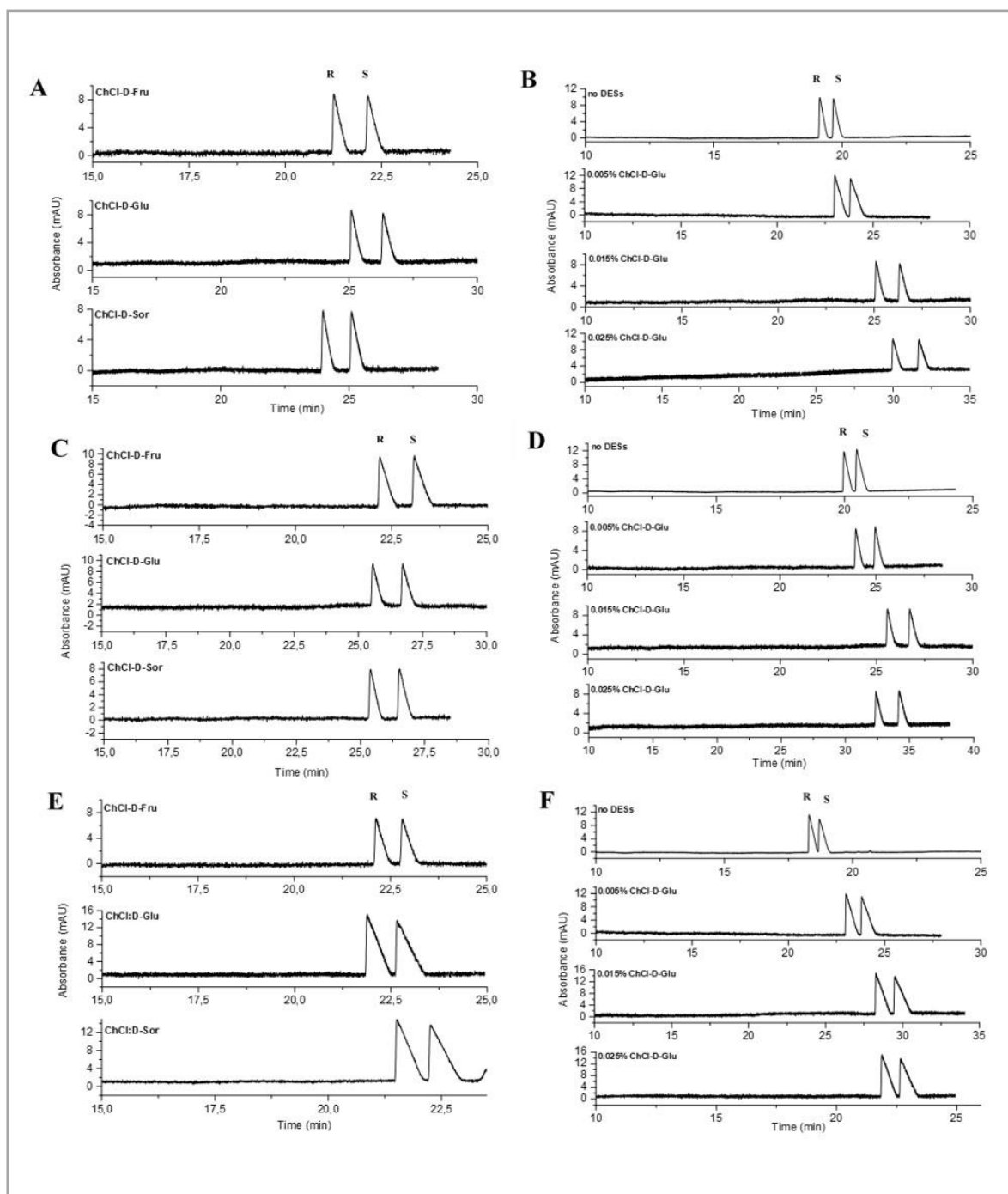
τιμές της διαχωριστικής ικανότητας για τα ανάλογα AMP, MA, 3-FEA αυξήθηκαν από 1.4, 1.1 και 1.0 σε 1.8, 1.8 και 1.5, αντίστοιχα.

Επιπρόσθετα, η αντίστοιχη μελέτη (π.χ. 0.5% v/v ChCl-EG) πραγματοποιήθηκε και σε BGE το οποίο περιείχε β-CD ως CS (15 mM β-CD σε 20 mM NaH₂PO₄, pH 2.5). Όπως ήταν αναμενόμενο, η προσθήκη του DES βελτίωσε τη διαχωριστική ικανότητα, χωρίς ωστόσο να οδηγήσει σε πλήρη διαχωρισμό ($R_s < 1.5$).

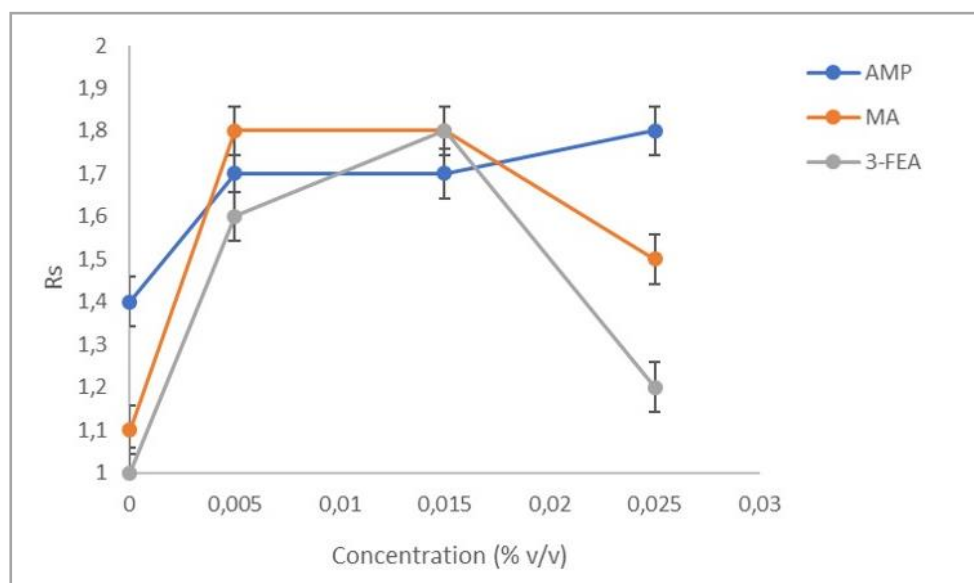
Στην περίπτωση των χειρόμορφων DESs, χαμηλότερα ποσοστά DES (0-0.025% v/v) απαιτήθηκαν για την επίτευξη πλήρους διαχωρισμού (Σχήμα 4.11). Συγκεκριμένα, η αύξηση του ποσοστού του ChCl-D-Glu, οδήγησε σε πλήρη διαχωρισμό μόνο για τα ανάλογα AMP (π.χ. 0.005% v/v, $R_s=1.4 \rightarrow R_s=2.2$) και MA (π.χ. 0.005% v/v, $R_s=1.1 \rightarrow R_s=1.9$). Αντίθετα, η τιμή της διαχωριστικής ικανότητας για το ανάλογο 3-FEA παρέμεινε η ίδια ($R_s \approx 1.1$), ως συνάρτηση της αύξησης του ποσοστού.

Όταν η D-Fru χρησιμοποιήθηκε ως HBD (Σχήμα 4.12), παρατηρήθηκε βελτίωση στις τιμές της διαχωριστικής ικανότητας των αναλόγων MA και 3-FEA, όταν το ποσοστό αυξήθηκε μέχρι το 0.015% v/v. Περαιτέρω αύξηση στο ποσοστό του ChCl-D-Fru (από 0.015% σε 0.025% v/v) οδήγησε σε μείωση των τιμών της διαχωριστικής ικανότητας των αναλόγων MA (από $R_s=1.8$ σε $R_s=1.5$) και 3-FEA (από $R_s=1.8$ σε $R_s=1.2$). Αντίθετα, για το ανάλογο AMP, η αύξηση του ποσοστού του DES οδήγησε σε αύξηση των τιμών της διαχωριστικής ικανότητας.

Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε και με τη χρήση του ChCl-D-Sor ως πρόσθετο στον BGE (π.χ. MA, $R_s=2.0 \rightarrow R_s=1.8$, και για το 3-FEA, $R_s=1.2 \rightarrow R_s=1.1$). Σε αυτή την περίπτωση, παρατηρήθηκε μείωση στην τιμή της διαχωριστικής ικανότητας και για το ανάλογο AMP ($R_s=2.0 \rightarrow R_s=1.9$), με αύξηση του ποσοστού του DES από 0.015% σε 0.025% v/v. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι, πάνω από μία κρίσιμη τιμή ποσοστού του DES, δεν παρατηρείται περαιτέρω βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας, λόγω κορεσμού στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ DES-αναλύτη ή DES-CS [114].



Σχήμα 4.11. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των χειρόμορφων DESs στο χειρόμορφο διαχωρισμό της AMP, MA και 3- FEA στον BGE ο οποίος περιέχει 15 mM CM- β-CD. (A) και (B) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της AMP, (C) και (D) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της MA, και (E) και (F) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της 3-FEA, όταν ο τύπος (0.015% v/v) και η συγκέντρωση του DESs μεταβάλλεται, αντίστοιχα.

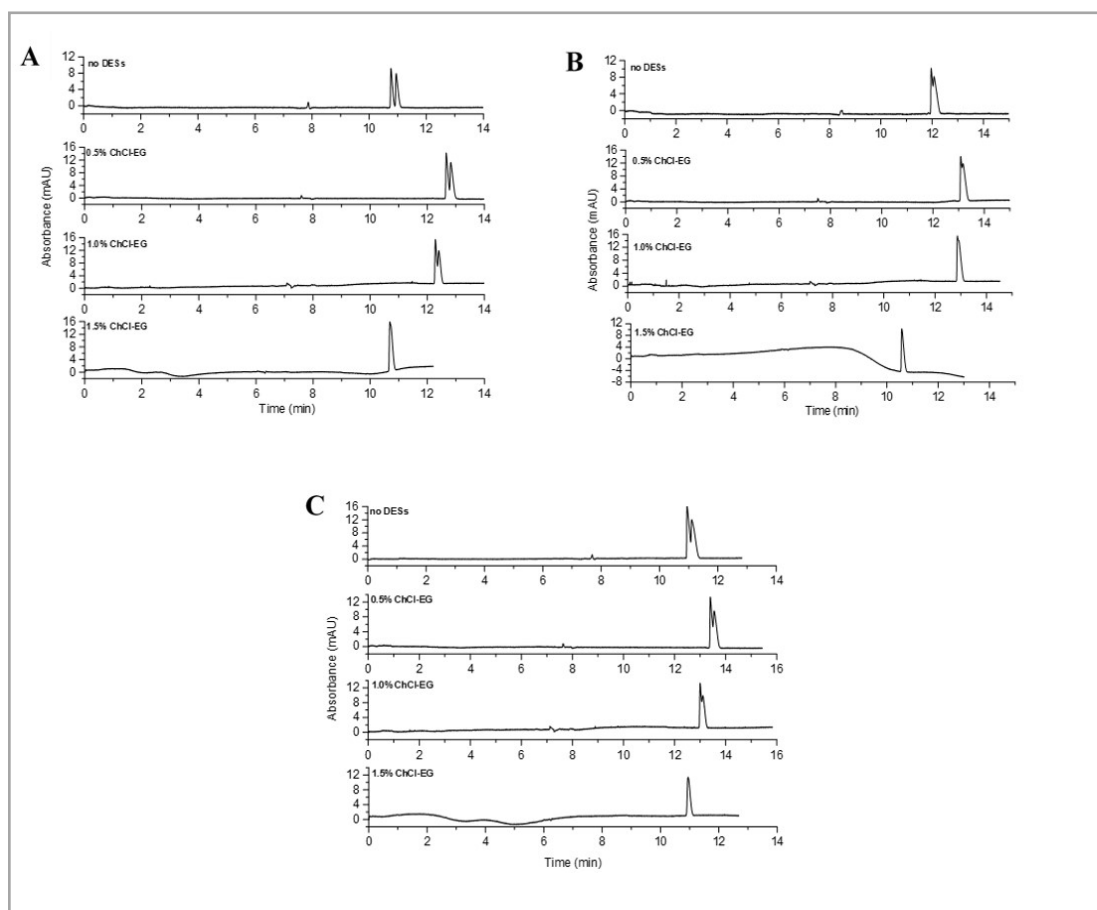


Σχήμα 4.12. Επίδραση της συγκέντρωσης του DES, ChCl-D-Fru, στον χειρόμορφο διαχωρισμό των υπό μελέτη ενώσεων.

4.2.3 Επίδραση του είδους και του ποσοστού των DESs - Μελέτη του δυαδικού συστήματος CF/DES

Η μελέτη της δράσης του DES ως πρόσθετο αξιολογήθηκε περαιτέρω σε BGE ο οποίος περιείχε CF ως CS. Όπως προαναφέρθηκε, εξ' όσων γνωρίζουμε, μία τέτοια μελέτη δεν έχει αναφερθεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία για κανένα αναλύτη. Στο πλαίσιο αυτό, τα προαναφερθέντα DESs, τόσο χειρόμορφα όσο και μη χειρόμορφα, προστέθηκαν σε εύρος ποσοστού από 0 έως 1.5% v/v, στον BGE ο οποίος περιείχεθειϊκή κυκλοφρουκτάνη (1 mM SCF-6 σε 20 mM NaH₂PO₄, pH=2.5) ως CS. Οι ηλεκτροφορητικές συνθήκες διαχωρισμού βελτιστοποιήθηκαν σε προηγούμενη μελέτη (Υποκεφάλαιο 4.1).

Η χρήση του δυαδικού συστήματος CF/DES δεν οδήγησε σε βελτίωση του χειρόμορφου διαχωρισμού για κανένα από τους υπό μελέτη αναλύτες. Συγκεκριμένα, όπως γίνεται φανερό από το Σχήμα 4.13, η αύξηση του ποσοστού του DES, οδηγεί σε μείωση της διαχωριστικής ικανότητας για όλα τα ανάλογα αμφεταμίνης που εξετάστηκαν. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του ανάλογου AMP, η τιμή R_s μηδενίζεται με αύξηση του ποσοστού του ChCl-EG (Σχήμα 4.13A).



Σχήμα 4.13. Επίδραση της συγκέντρωσης του DES, ChCl-EG, στο χειρόμορφο διαχωρισμό της AMP, MA και 3- FEA στον BGE ο οποίος περιέχει 1 mM SCF-6. (A) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της AMP, (B) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της MA, και (C) είναι τα ηλεκτροφερογράμματα της 3-FEA, όταν η συγκέντρωση του DESs μεταβάλλεται.

Για σκοπούς επιβεβαίωσης της δράσης των DESs στο δυαδικό σύστημα CF/DES, πραγματοποιήθηκαν επιπρόσθετα πειράματα με χρήση τόσο της SCF-7 όσο και της ουδέτερης CF-6. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι σε προηγούμενα πειράματα, η χρήση των ουδέτερων CFs δεν οδήγησε σε χειρόμορφο διαχωρισμό για κανένα από τους υπό μελέτη αναλύτες. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν σε όλες τις πιο πάνω περιπτώσεις, αποδείχθηκε η μη ικανότητα συνέργειας στην εναντιοεκλεκτική αναγνώριση του DES σε συνδυασμό με CFs και η ύπαρξη ενός πιθανού ανταγωνιστικού φαινομένου στο δυαδικό σύστημα CF/DES. Όπου το DES ανταγωνίζεται τις αναλυόμενες ουσίες για την συμπλοκοποίηση με την CF.

Επιπρόσθετα, με σκοπό την επιβεβαίωση των εν λόγω αποτελεσμάτων, η ίδια μελέτη πραγματοποιήθηκε (χρήση του δυαδικού συστήματος CF/DES) και με άλλα φθοριωμένα ανάλογα τόσο αμφεταμινών (2-FMA, 3-FMA, 4-FMA, 2-FEA, 3-FEA, 4-

Κεφάλαιο 4

FEA) όσο και σε καθινονών (2-FMC, 3-FMC, 4-FMC), καθώς επίσης και με τρία χλωριωμένα ανάλογα καθινονών (2-CMC, 3-CMC, 4-CMC).

Υπό το πλαίσιο αυτό, 0.50% v/v του ChCl-EG (DES) προστέθηκε αρχικά στον BGE ο οποίος περιείχε τόσοθειϊκή CF-6 όσο καιθειϊκή CF-7 (1 mM SCF-6 ή 1 mM SCF-7 σε 20 mM NaH₂PO₄, pH=2.5) ως CS. Οι ηλεκτροφορητικές συνθήκες διαχωρισμού βελτιστοποιήθηκαν σε προηγούμενη μελέτη (Υποκεφάλαιο 4.1).

Όπως ήταν αναμενόμενο, ο χειρόμορφος διαχωρισμός όλων των υπό μελέτη αναλυτών, επιδεινώθηκε (μείωση του R_s) με την προσθήκη του DES (ChCl-EG), στον BGE. Για παράδειγμα, η τιμή R_s του αναλόγου 3-FMC, μειώθηκε από 1.9 σε 1.4 και από 1.1 σε 0.4, όταν 0.50% v/v ChCl-EG, προστέθηκε στον BGE ο οποίος περιείχε SCF-6 και SCF-7 ως CS, αντίστοιχα. Αποδεικνύοντας τη μη ικανότητα συνέργειας στην εναντιοεκλεκτική αναγνώριση του DES σε συνδυασμό με CFs και την ύπαρξη ενός πιθανού ανταγωνιστικού φαινομένου στο δυαδικό σύστημα CF/DES.

4.2.4 Επίδραση της προσθήκης των αρχικών αντιδραστηρίων

Για τη διερεύνηση της επίδρασης των αρχικών αντιδραστηρίων, έγινε προσθήκη στον BGE ο οποίος περιείχε CD ή CF, ως CS: (i) κάθε μεμονωμένου συστατικού ξεχωριστά (ChCl, EG), (ii) των δυο συστατικών μαζί (ChCl + EG) καθώς και (iii) του DES (ChCl-EG) στον BGE, διατηρώντας την ίδια αναλογία (1:2), η οποία χρησιμοποιήθηκε για τη παρασκευή του DES.

Από τα αποτελέσματα που πάρθηκαν, διαπιστώθηκε ότι, η προσθήκη του ChCl, EG, ChCl + EG, καθώς και του DES (ChCl-EG) στον BGE, ο οποίος περιείχε CM-β-CD, οδήγησε σε αύξηση των χρόνων μετανάστευσης των αναλυτών και βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας, σε σύγκριση με τη χρήση μόνο της CM-β-CD. Συγκεκριμένα, οι τιμές R_s για το ανάλογο AMP, αυξήθηκαν από 1.4 σε 2.1 και 1.9 με την προσθήκη του EG και του ChCl, αντίστοιχα, και σε τιμή R_s ίση με 2.0 με την προσθήκη των δύο συστατικών (ChCl + EG) και σε 1.8 με το DES. Το ίδιο αποτέλεσμα εξάχθηκε και στην περίπτωση του αναλόγου MA. Συγκεκριμένα, πλήρης χειρόμορφος διαχωρισμός επήλθε σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από την προσθήκη του συστατικού ChCl (R_s=1.4) στον BGE. Αντίθετα, μια μικρή βελτίωση στις τιμές R_s παρατηρήθηκε

Κεφάλαιο 4

στην περίπτωση του αναλόγου 3-FEA, μετά την προσθήκη του ChCl, EG και ChCl + EG ($R_s = 1.0 \rightarrow R_s \approx 1.2$). Παρόλα αυτά, πλήρης χειρόμορφος διαχωρισμός επήλθε μετά την προσθήκη του DES (ChCl-EG) στον BGE ($R_s = 1.5$).

Δε σημειώθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές όταν στον BGE περιείχε CF (SCF-6). Συγκεκριμένα, μετά την προσθήκη του EG και του ChCl, αντίστοιχα, οι τιμές R_s ήταν παρόμοιες με αυτές που πάρθηκαν με χρήση μόνο της SCF-6, ενώ η εναντιοεκλεκτική αναγνώριση επιδεινώνεται με την προσθήκη του ChCl + EG (π.χ. AMP, $R_s = 1.1 \rightarrow R_s = 0.6$).

Με βάση (i) τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη, (ii) το γεγονός ότι πλήρης εναντιομερής διαχωρισμός όλων των αναλόγων αμφεταμίνης λήφθηκε μόνο με την προσθήκη του DES στον BGE, και (iii) την απλή παρασκευή του DES (ανάμειξη HBA και HBD), το DES επιλέχθηκε ως το ιδανικό πρόσθετο.

4.2.5 Συμπεράσματα

Στο παρόν στάδιο της Δ.Δ., έλαβε χώρα μελέτη της επίδρασης των AAILs καθώς και των DESs ως πρόσθετα στον BGE, ο οποίος περιείχε CS (CDs και CFs), με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη μιας βέλτιστης μεθόδου για την επίτευξη πλήρους διαχωρισμού τριών αναλόγων αμφεταμίνης (AMP, MA, 3-FEA), τα οποία δεν είχαν διαχωριστεί πλήρως σε προηγούμενο στάδιο. Ενώ επιπλέον εξετάστηκε η δράση (συνεργειακή/ανταγωνιστική) των DESs, σε συνδυασμό με CDs και CFs ως CSs, αντίστοιχα.

Η εφαρμογή των AAILs σε αυτή την κατηγορία ενώσεων (ψυχοδραστικές ενώσεις) δεν έχει αναφερθεί προηγουμένως, ενώ αξίζει να τονιστεί ότι, εξ όσων γνωρίζουμε, σε καμία προηγούμενη μελέτη δεν έχει γίνει χρήση των DESs ως πρόσθετα στον BGE ο οποίος περιέχει CFs ως CSs.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, δεν σημειώθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές σχετικά με την επίδραση των AAILs στη διαχωριστική ικανότητα των εν λόγω ενώσεων. Ο συνδυασμός όμως του DES με τις CDs έδειξε την ικανότητα συνέργειας στην εναντιοεκλεκτική αναγνώριση για όλα τα ανάλογα αμφεταμίνης. Συγκεκριμένα, με την προσθήκη 0.50% v/v του ChCl-EG στον BGE (δυναμικό σύστημα CM-β-

Κεφάλαιο 4

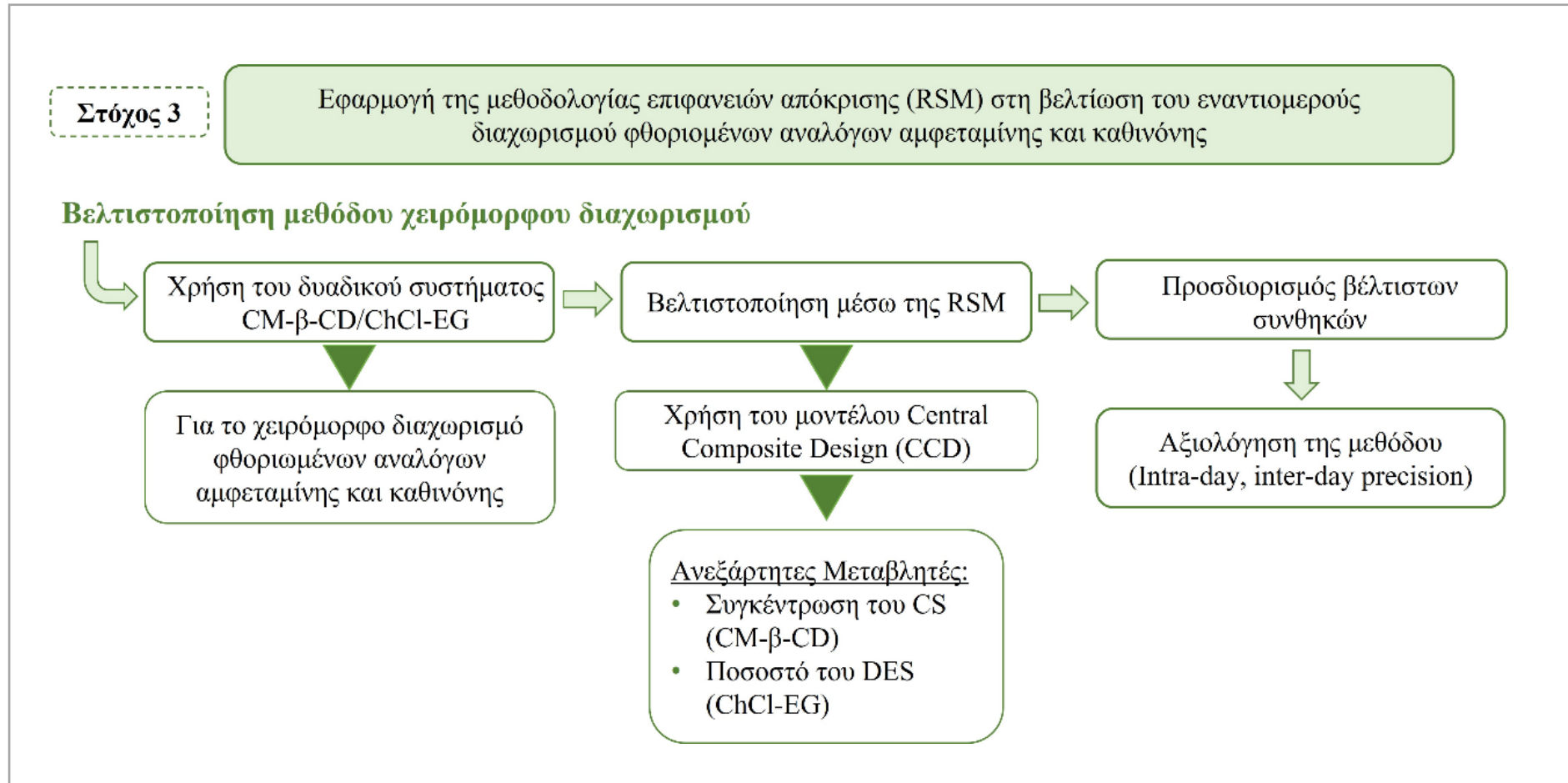
CD/DES), οι τιμές της διαχωριστικής ικανότητας των αναλόγων AMP, MA, και 3-FA αυξήθηκαν από 1.4, 1.1, 1.0 σε 1.8, 1.8, και 1.5, αντίστοιχα, οδηγώντας σε πλήρη χειρόμορφο διαχωρισμό των υπό μελέτη αμφεταμινών. Αντίθετα, πιθανή ανταγωνιστική δράση του DES φαίνεται να κυριαρχεί στα δυαδικά συστήματα CF/DES.

Εν κατακλείδι, με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, αποδείχθηκε πως το δυαδικό σύστημα CM-β-CD/ChCl-EG, μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία για την επίτευξη πλήρους διαχωρισμού ψυχοδραστικών ενώσεων.

4.3 Εφαρμογή της RSM στη βελτίωση του εναντιομερούς διαχωρισμού φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης και καθιόνης

Παρόλο που η εφαρμογή του δυαδικού συστήματος CD/DES (και συγκεκριμένα του CM-β-CD/ChCl-EG) στον χειρόμορφο διαχωρισμό ορισμένων φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης έχει μελετηθεί σε προηγούμενο στάδιο της εν λόγω διατριβής (Υποκεφάλαιο 4.2), δεν υπάρχουν μελέτες στη βιβλιογραφία σχετικά με το χειρόμορφο διαχωρισμό φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης και καθιόνης. Ως εκ τούτου, προκύπτει αναμφίβολα μια ανάγκη για την ανάπτυξη μιας βέλτιστης μεθόδου για το χειρόμορφο διαχωρισμό NPS με χρήση του δυαδικού συστήματος CM-β-CD/ChCl-EG.

Κάτω από αυτό το πλαίσιο, έλαβε χώρα βελτιστοποίηση της μεθόδου χειρόμορφου διαχωρισμού. Κατά τη διαδικασία της βελτιστοποίησης, έλαβε χώρα βελτιστοποίηση των επιπέδων των κρίσιμων μεταβλητών μέσω της RSM και συγκεκριμένα μέσω του μοντέλου CCD. Η συγκέντρωση του CS (CM-β-CD) και το ποσοστό του DES (ChCl-EG), ήταν οι δύο κύριες ανεξάρτητες μεταβλητές (independent variables), οι οποίες επηρεάζουν το συνεργιστικό φαινόμενο (synergistic effect). Τα βέλτιστα επίπεδα των δύο αυτών μεταβλητών προσδιορίστηκαν μέσω της RSM. Ακολούθως, παρέχεται διάγραμμα ροής της πορείας που ακολουθήθηκε για την υλοποίηση του στόχου αυτού της εν λόγω Δ.Δ. (Σχήμα 4.14).



Σχήμα 4.14. Διάγραμμα ροής στόχου 3 της Δ.Δ.

4.3.1 Σχεδιασμός Βελτιστοποίησης (Optimization Design)

Με σκοπό την εύρεση μίας βέλτιστης μεθόδου και την αξιολόγηση της επίδρασης των υπό μελέτη μεταβλητών, οι οποίες επηρεάζουν το συνεργειακό φαινόμενο, έγινε εφαρμογή της RSM μέσω του μοντέλου CCD. Η RSM χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση της επίδρασης των ανεξάρτητων μεταβλητών και των αλληλεπιδράσεων τους στο χειρόμορφο διαχωρισμό των υπό μελέτη αναλυτών. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η συγκέντρωση του CS (CM-β-CD) (A) και το ποσοστό του DES (ChCl-EG) (B). Για κάθε κατηγορία παραγώγων, φθοριωμένων αμφοταμινών και φθοριωμένων καθινονών, χρησιμοποιήθηκε ένας πειραματικός σχεδιασμός 2 μεταβλητών και 5 επιπέδων (-a, -1, 0, +1, +a). Για την επιλογή των ορίων της κάθε εξεταζόμενης μεταβλητής, πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα (Υποκεφάλαιο 4.1 και 4.2). Μία επισκόπηση του πειραματικού σχεδιασμού καθώς και των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν, συνοψίζονται στους Πίνακες 4.5 και 4.6A, 4.6B και 4.7, αντίστοιχα.

Πίνακας 4.5. Επίπεδα ανεξάρτητων μεταβλητών.

Ανεξάρτητη Μεταβλητή	Συμβολισμός	Επίπεδο Μεταβλητής		Σημεία Αστέρος (Axial points)	
		Χαμηλό (-1)	Υψηλό (+1)	-a	+a
Συγκέντρωση CS (mM)	A	5	15	2.92893	17.0711
% DES (% v/v)	B	0.15	0.75	0.0257359	0.874264

Κεφάλαιο 4

Πίνακας 4.6Α. CCD πειραματικός σχεδιασμός και πειραματικά αποτελέσματα για τα ανάλογα φθορομεθαμφεταμίνης (fluormethamphetamine analogs-FMA analogs).

Μεταβλητή			Απόκριση					
Ανάλυση	Συγκέντρωση CS (mM)	% DES (v/v)	Χρόνος (2-FMA) min	R _s (2-FMA)	Χρόνος (3-FMA) min	R _s (3-FMA)	Χρόνος (4-FMA) min	R _s (4-FMA)
1	17.0711	0.45	55.90	6.2	55.50	2.4	39.25	2.1
2	5	0.15	19.50	2.0	16.80	0.6	14.73	0.8
3	15	0.75	72.00	7.6	60.50	3.1	37.00	1.8
4	15	0.15	39.10	5.1	32.10	2.1	23.95	1.4
5	10	0.45	37.00	4.9	37.25	2.1	27.50	1.3
6	2.92893	0.45	15.30	2.1	14.60	1.0	13.60	0.2
7	5	0.75	53.90	3.6	19.00	2.1	15.30	1.1
8	10	0.0257359	16.60	3.0	16.70	1.6	14.15	1.0
9	10	0.45	37.10	4.9	37.30	2.1	27.70	1.3
10	10	0.874264	48.60	4.2	33.00	2.0	18.00	1.2
11	10	0.45	36.80	4.9	37.60	2.2	27.70	1.4

Πίνακας 4.6Β. CCD πειραματικός σχεδιασμός και πειραματικά αποτελέσματα για τα ανάλογα φθοροαιθαμφεταμίνης (fluorethamphetamine analogs-FEA analogs).

Μεταβλητή			Απόκριση					
Ανάλυση	Συγκέντρωση CS (mM)	% DES (v/v)	Χρόνος (2-FEA) min	R _s (2-FEA)	Χρόνος (3-FEA) min	R _s (3-FEA)	Χρόνος (4-FEA) min	R _s (4-FEA)
1	17.0711	0.45	73.50	6.2	43.00	2.1	48.60	1.5
2	5	0.15	24.25	3.6	19.20	1.3	17.30	0.9
3	15	0.75	80.30	7.7	54.26	2.2	44.25	1.7
4	15	0.15	37.90	5.3	33.00	1.8	29.10	1.6
5	10	0.45	16.40	0.7	41.50	1.8	31.00	1.0
6	2.92893	0.45	19.80	3.2	18.85	1.3	16.60	0.5
7	5	0.75	34.20	3.9	37.40	1.6	25.50	1.1
8	10	0.0257359	22.10	3.1	20.10	1.3	17.06	1.1
9	10	0.45	16.50	0.7	41.70	1.9	31.30	1.1
10	10	0.874264	39.50	4.4	40.50	2.0	35.90	1.6
11	10	0.45	16.60	0.7	41.50	1.8	31.50	1.0

Κεφάλαιο 4

Πίνακας 4.7. CCD πειραματικός σχεδιασμός και πειραματικά αποτελέσματα για τα ανάλογα φθορομεθακθινόνης (fluormethcathinone analogs-FMC analogs).

Ανάλυση	Μεταβλητή		Απόκριση					
	Συγκέντρωση CS (mM)	% DES (v/v)	Χρόνος (2-FMC) min	R _s (2-FMC)	Χρόνος (3-FMC) min	R _s (3-FMC)	Χρόνος (4-FMC) min	R _s (4-FMC)
1	17.0711	0.45	31.50	5.7	25.00	1.5	22.60	1.2
2	5	0.15	12.40	2.7	12.55	0.8	12.20	0.3
3	15	0.75	32.10	6.2	24.30	1.4	23.20	1.0
4	15	0.15	17.20	2.7	17.25	0.6	15.30	0.7
5	10	0.45	19.25	2.8	18.40	0.9	17.80	0.8
6	2.92893	0.45	13.65	2.4	13.10	0.7	12.00	0.3
7	5	0.75	17.70	3.1	15.20	0.7	14.80	0.4
8	10	0.0257359	14.00	2.6	12.05	0.8	11.20	0.7
9	10	0.45	19.45	2.6	19.00	0.8	17.90	0.8
10	10	0.874264	23.35	5.4	28.20	1.2	17.70	0.6
11	10	0.45	19.40	2.6	18.40	0.9	17.55	0.7

4.3.2 Ανάλυση παλινδρόμησης και ανάλυση διακύμανσης αποτελεσμάτων

Αρχικά, τα πειραματικά αποτελέσματα, προσαρμόστηκαν σε μία ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης, προκειμένου να αποκτηθούν οι μαθηματικές εξισώσεις που περιγράφουν την εμπειρική σχέση μεταξύ των ανεξάρτητων (A και B) και εξαρτημένων μεταβλητών [η τιμή του διαχωρισμού μεταξύ των δύο εναντιομερών (R_s) και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης (χρόνος έκλουσης του δεύτερου εναντιομερούς)].

Τα ολικά μαθηματικά μοντέλα που προέκυψαν, μέσω της πολλαπλής ανάλυσης παλινδρόμησης, περιγράφονται από αντίστοιχες μαθηματικές εξισώσεις, οι οποίες συνοψίζονται στον Πίνακα 4.8 για τα ανάλογα αμφεταμίνης και στον Πίνακα 4.9 για τα ανάλογα καθινόνης, αντίστοιχα.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, τα τετραγωνικά (quadratic) και γραμμικά (linear) μοντέλα, προσδιορίστηκαν ως τα καλύτερα προσαρμοσμένα μοντέλα για την πλειοψηφία των αποκρίσεων. Αντίθετα, οι αποκρίσεις των αναλόγων καθινόνης (Time 2-FMC και R_s 3-FMC) περιγράφηκαν καλύτερα από τα μοντέλα 2-FI (Πίνακας 4.9).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη στατιστική ανάλυση (Πίνακας 4.8 και 4.9), ANOVA, των προτεινόμενων μοντέλων κατέδειξαν και την ορθότητά τους, δηλαδή, την ικανότητά τους να περιγράφουν επαρκώς τη διακύμανση των αποτελεσμάτων και να αναπαριστούν την πραγματική σχέση μεταξύ των εξεταζόμενων μεταβλητών και

Κεφάλαιο 4

της αντίστοιχης πειραματικής απόκρισης. Συγκεκριμένα, οι στατιστικές παράμετροι που αξιολογήθηκαν, μεταξύ των οποίων οι παράμετροι F (F-values) και p (p-values), ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2), ο προσαρμοσμένος συντελεστής προσδιορισμού (R_{adj}^2) και ο προβλεπόμενος συντελεστής προσδιορισμού (R_{pred}^2), κατέδειξαν την πολύ καλή προβλεψιμότητα των μοντέλων και επέτρεψαν τη μετέπειτα χρήση τους στη διαδικασία της βελτιστοποίησης μέσω της RSM [180,181].

Επιπλέον, μέσω της στατιστικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε (Πίνακας 4.8 και 4.9), προσδιορίστηκαν οι σημαντικοί όροι των εν λόγω μοντέλων επιφανειών απόκρισης. Με τους όρους αυτούς να εμφανίζουν τιμές σημαντικότητας, p, μικρότερες ή ίσες του 0.05 ($p \leq 0.05$), και υψηλές τιμές F (F-value), για επίπεδο σημαντικότητας 95%. Με βάση τα αποτελέσματα που λήφθηκαν (Πίνακας 4.8 και 4.9), οι μεταβλητές με τη μεγαλύτερη επίδραση στις αποκρίσεις, διαφέρουν από αναλύτη σε αναλύτη. Για παράδειγμα, οι γραμμικοί όροι της συγκέντρωσης της CM-β-CD (A), του ποσοστού του ChCl-EG (B), οι τετραγωνικοί όροι της συγκέντρωσης της CM-β-CD (A^2), του ποσοστού του ChCl-EG (B^2), καθώς και ο όρος της αλληλεπίδρασης των κρίσιμων αυτών μεταβλητών (AB) παρουσιάζουν σημαντική επίδραση στο συνολικό χρόνο ανάλυσης του αναλόγου 3-FMA [Time (3-FMA)]. Ενώ, οι γραμμικοί όροι της συγκέντρωσης της CM-β-CD (A) και του ποσοστού του ChCl-EG (B), παρουσιάζουν σημαντική επίδραση στην τιμή του διαχωρισμού μεταξύ των δύο εναντιομερών (R_s).

Στην περίπτωση του συνολικού χρόνου ανάλυσης του αναλόγου 3-FMC [Time (3-FMC)], τα αποτελέσματα κατέδειξαν τη σημαντική επίδραση των τετραγωνικών όρων της συγκέντρωσης της CM-β-CD (A) και του ποσοστού του ChCl-EG (B). Αντίθετα, οι γραμμικοί όροι της συγκέντρωσης της CM-β-CD (A) και του ποσοστού του ChCl-EG (B), καθώς και ο όρος της αλληλεπίδρασης των κρίσιμων αυτών μεταβλητών (AB) παρουσιάζουν σημαντική επίδραση στην τιμή του διαχωρισμού μεταξύ των δύο εναντιομερών (R_s), στην περίπτωση του αναλόγου 3-FMC. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των τετραγωνικών όρων της συγκέντρωσης της CM-β-CD (A^2) και του ποσοστού του ChCl-EG (B^2).

Κεφάλαιο 4

Πίνακας 4.8. Αποτελέσματα ANOVA φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης.

Responses	Source	Sum of squares (SS)	Degree of freedom (DF)	Mean square (MS)	p-value	F-value
Time (2-FMA)	Model				0.0003	25.27
	A	1130.91	1	1130.91	0.0018	21.05
	B	1583.57	1	1583.57	0.0006	29.48
	Residual	429.75	8	53.72		
	$R^2 = 0.8633$, $R^2_{adj} = 0.8292$, $R^2_{pred} = 0.6908$					
<i>Regression equation: $y = 11.89 * A + 14.07 * B + 39.25$</i>						
R _s (2-FMA)	Model				0.0002	29.30
	A	20.80	1	20.80	0.0001	48.75
	B	4.20	1	4.20	0.0138	9.85
	Residual	3.41	8	0.4266		
	$R^2 = 0.8799$, $R^2_{adj} = 0.8498$, $R^2_{pred} = 0.7513$					
<i>Regression equation: $y = 1.61 * A + 0.7246 * B + 4.41$</i>						
Time (3-FMA)	Model				< 0.0001	142.78
	A	1642.83	1	1642.83	< 0.0001	495.59
	B	359.81	1	359.81	0.0001	108.55
	AB	171.61	1	171.61	0.0008	51.77
	A ²	2.24	1	2.24	0.4489	0.6744
	B ²	185.36	1	185.36	0.0007	55.92
	Residual	16.57	5	3.31		
$R^2 = 0.9930$, $R^2_{adj} = 0.9861$, $R^2_{pred} = 0.9507$						
<i>Regression equation: $y = 14.33 * A + 6.71 * B + 6.55 * AB - 0.6292 * A^2 - 5.73 * B^2 + 37.38$</i>						
R _s (3-FMA)	Model				0.0012	17.50
	A	2.51	1	2.51	0.0012	23.84
	B	1.17	1	1.17	0.0102	11.16
	Residual	0.8420	8	0.1052		
	$R^2 = 0.8139$, $R^2_{adj} = 0.7674$, $R^2_{pred} = 0.6014$					
<i>Regression equation: $y = 0.5600 * A + 0.3832 * B + 1.94$</i>						
Time (4-FMA)	Model				0.0003	50.21
	A	564.39	1	564.39	< 0.0001	171.70
	B	45.43	1	45.43	0.0137	13.82
	AB	38.94	1	38.94	0.0184	11.85
	A ²	0.2998	1	0.2998	0.7748	0.0912
	B ²	165.00	1	165.00	0.0009	50.20
	Residual	16.44	5	3.29		
$R^2 = 0.9805$, $R^2_{adj} = 0.9609$, $R^2_{pred} = 0.8613$						
<i>Regression equation: $y = 8.10 * A + 2.38 * B + 3.12 * AB - 0.2304 * A^2 - 5.16 * B^2 + 27.63$</i>						
R _s (4-FMA)	Model				0.0004	23.57
	A	1.99	1	1.99	0.0002	44.44
	B	0.1207	1	0.1207	0.1389	2.70
	Residual	0.3577	8	0.0447		

Κεφάλαιο 4

$R^2 = 0.8549, R^2_{adj} = 0.8187, R^2_{pred} = 0.6815$						
<i>Regression equation: $y = 0.4984 * A + 0.1229 * B + 1.24$</i>						
Time (2-FEA)	Model				0.0014	26.12
	A	2301.58	1	2301.58	0.0005	61.17
	B	740.30	1	740.30	0.0068	19.67
	AB	263.25	1	263.25	0.0457	7.00
	A ²	1525.21	1	1525.21	0.0014	40.53
	B ²	408.90	1	408.90	0.0216	10.87
	Residual	188.14	5	37.63		
$R^2 = 0.9631, R^2_{adj} = 0.9262, R^2_{pred} = 0.7378$						
<i>Regression equation: $y = 16.96 * A + 9.92 * B + 8.11 * AB + 16.43 * A^2 + 8.51 * B^2 + 16.50$</i>						
R_s (2-FEA)	Model				0.0013	26.65
	A	11.86	1	11.86	0.0026	31.05
	B	2.57	1	2.57	0.0485	6.74
	AB	1.10	1	1.10	0.1501	2.89
	A ²	27.96	1	27.96	0.0004	73.17
	B ²	17.29	1	17.29	0.0011	45.26
	Residual	1.91	5	0.3821		
$R^2 = 0.9638, R^2_{adj} = 0.9277, R^2_{pred} = 0.7428$						
<i>Regression equation: $y = 1.22 * A + 0.5673 B + 0.5250 * AB + 2.22 * A^2 + 1.75 * B^2 + 0.70$</i>						
Time (3-FEA)	Model				0.0008	33.05
	A	538.96	1	538.96	0.0005	65.91
	B	412.71	1	412.71	0.0070	12.93
	AB	1.45	1	1.45	0.6910	0.1776
	A ²	100.72	1	100.72	0.0171	12.32
	B ²	65.70	1	65.70	0.0365	8.03
	Residual	40.89	5	8.18		
$R^2 = 0.9706, R^2_{adj} = 0.9413, R^2_{pred} = 0.7913$						
<i>Regression equation: $y = 8.21 * A + 9.23 * B + 0.6025 * AB - 4.22 * A^2 - 3.41 * B^2 + 41.57$</i>						
R_s (3-FEA)	Model				< 0.0001	45.33
	A	0.5687	1	0.5687	< 0.0001	58.25
	B	0.3160	1	0.3160	0.0005	32.42
	Residual	0.0780	8	0.0097		
$R^2 = 0.9189, R^2_{adj} = 0.8987, R^2_{pred} = 0.8592$						
<i>Regression equation: $y = 0.2664 * A + 0.1987 * B + 1.73$</i>						
Time (4-FEA)	Model				<0.0001	47.34
	A	718.30	1	718.30	<0.0001	65.99
	B	312.42	1	312.42	0.0007	28.70
	Residual	87.08	8	10.89		
$R^2 = 0.9221, R^2_{adj} = 0.9026, R^2_{pred} = 0.8268$						
<i>Regression equation: $y = 9.48 * A + 6.25 * B + 29.83$</i>						
	Model				0.0013	26.70
	A	0.9209	1	0.9209	0.0002	95.19
	B	0.0937	1	0.0937	0.0265	9.68

Κεφάλαιο 4

	AB	0.0025	1	0.0025	0.6327	0.2587
	A ²	0.0012	1	0.0012	0.7389	0.1241
R_s	B ²	0.2600	1	0.2600	0.0035	26.88
(4-FEA)	Residual	0.0484	5	0.0097		
R² = 0.9639, R²_{adj} = 0.9278, R²_{pred} = 0.7675						
<i>Regression equation:</i> $y = 0.3393 * A + 0.1082 * B - 0.0250 * AB + 0.0146 * A^2 + 0.2146 * B^2 + 1.03$						

Επιπρόσθετα, να σημειωθεί ότι, με βάση τις τιμές σημαντικότητας, p , που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση, και οι δύο ανεξάρτητες μεταβλητές, συγκέντρωσης της CM-β-CD (A) και το ποσοστό του ChCl-EG (B), είναι στατιστικά σημαντικές ($p \leq 0.05$) για όλες τις αποκρίσεις, εκτός στην περίπτωση της επίδραση στην τιμή του διαχωρισμού μεταξύ των δύο εναντιομερών (R_s) για τους αναλύτες 4-FMA και 4-FMC. Όπου σε αυτές τις περιπτώσεις, το ποσοστό του ChCl-EG (B), δεν επιδρά σημαντικά. Ωστόσο, η μεταβλητή της συγκέντρωσης της CM-β-CD (A), είχε τη μεγαλύτερη συνεισφορά στα μοντέλα, και συνάμα τη μεγαλύτερη επίδραση στις αποκρίσεις, καθώς οι τιμές σημαντικότητας, p , είναι χαμηλότερες από τις αντίστοιχες του ποσοστού του DES (B).

Κεφάλαιο 4

Πίνακας 4.9. Αποτελέσματα ANOVA φθοριωμένων αναλόγων καθιόνης.

Responses	Source	Sum of squares (SS)	Degree of freedom (DF)	Mean square (MS)	p-value	F-value
Time (2-FMC)	Model				0.0002	33.25
	A	246.91	1	246.91	0.0001	60.14
	B	139.64	1	139.64	0.0006	34.01
	AB	23.04	1	23.04	0.0497	5.61
	Residual	28.74	7	4.11		
	$R^2 = 0.9344$, $R^2_{adj} = 0.9063$, $R^2_{pred} = 0.8067$					
<i>Regression equation: $y = 5.56 * A + 4.18 * B + 2.40 * AB + 20$</i>						
R _s (2-FMC)	Model				0.0006	35.79
	A	7.54	1	7.54	0.0005	65.12
	B	7.72	1	7.72	0.0004	66.68
	AB	2.40	1	2.40	0.0061	20.75
	A ²	2.06	1	2.06	0.0083	17.80
	B ²	1.89	1	1.89	0.0099	16.36
	Residual	0.5790	5	0.1158		
$R^2 = 0.9728$, $R^2_{adj} = 0.9456$, $R^2_{pred} = 0.8128$						
<i>Regression equation: $y = 0.9709 * A + 0.9825 * B + 0.7750 * AB + 0.6042 * A^2 + 0.5792 * B^2 + 2.67$</i>						
Time (3-FMC)	Model				0.0003	25.44
	A	117.27	1	117.27	0.0012	23.90
	B	132.35	1	132.35	0.0008	26.98
	Residual	39.01	8	4.91		
	$R^2 = 0.8641$, $R^2_{adj} = 0.8302$, $R^2_{pred} = 0.6883$					
<i>Regression equation: $y = 3.83 * A + 4.07 * B + 18.50$</i>						
R _s (3-FMC)	Model				0.0031	12.90
	A	0.0766	1	0.0766	0.0494	5.63
	B	0.2475	1	0.2475	0.0037	18.19
	AB	0.2025	1	0.2025	0.0062	14.89
	Residual	0.0952	7	0.0136		
$R^2 = 0.8469$, $R^2_{adj} = 0.7812$, $R^2_{pred} = 0.5966$						
<i>Regression equation: $y = 0.0979 * A + 0.1759 * B + 0.2250 * AB + 0.9273$</i>						
Time (4-FMC)	Model				0.0001	68.25
	A	87.72	1	87.72	<0.0001	190.54
	B	48.47	1	48.47	0.0002	105.29
	AB	7.02	1	7.02	0.0113	15.25
	A ²	0.0565	1	0.0565	0.7404	0.1227
	B ²	13.13	1	13.13	0.0031	28.53
	Residual	2.30	5	0.4604		
$R^2 = 0.9856$, $R^2_{adj} = 0.9711$, $R^2_{pred} = 0.8993$						

<i>Regression equation: $y = 3.31 * A + 2.46 * B + 1.32 * AB - 0.1000 * A^2 - 1.52 * B^2 + 17.75$</i>						
R_s (4-FMC)	Model				0.0006	21.39
	A	0.6457	1	0.6457	0.0002	42.23
	B	0.0084	1	0.0084	0.5467	0.4808
	Residual	0.1223	8	0.0153		
	R² = 0.8425, R²_{adj} = 0.8031, R²_{pred} = 0.6771					
<i>Regression equation: $y = 0.2841 * A + 0.0323 * B + 0.6818$</i>						

4.3.3 Ανάλυση επιφανειών απόκρισης

Τα πολυωνυμικά μοντέλα που αναπτύχθηκαν (Εξισώσεις που αναπαρίστανται στον Πίνακα 4.8 και 4.9) χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των τρισδιάστατων διαγραμμάτων επιφανειών απόκρισης (response surface plots), καθώς και των δισδιάστατων ισομετρικών διαγραμμάτων (contour plots), βάσει των οποίων κατέστη δυνατή η γραφική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ των ανεξάρτητων και της εκάστοτε εξαρτώμενης μεταβλητής [τιμή του διαχωρισμού μεταξύ των δύο εναντιομερών (R_s) και συνολικός χρόνος ανάλυσης (χρόνος έκλυσης του δεύτερου εναντιομερούς)].

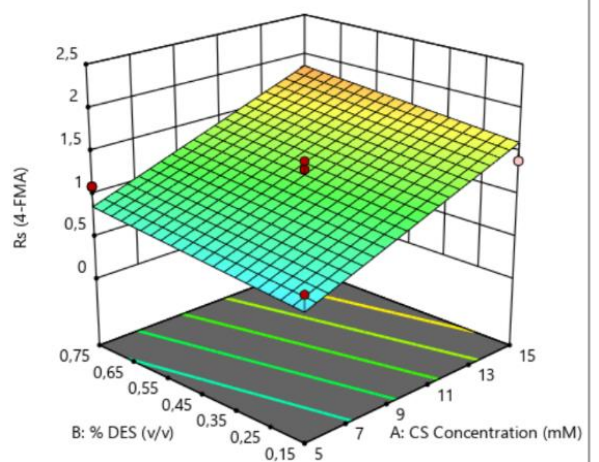
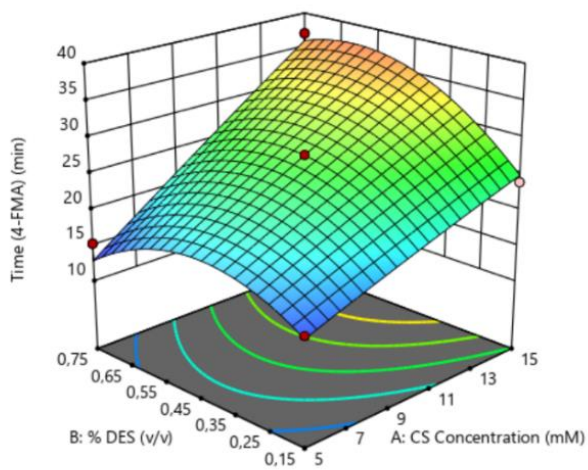
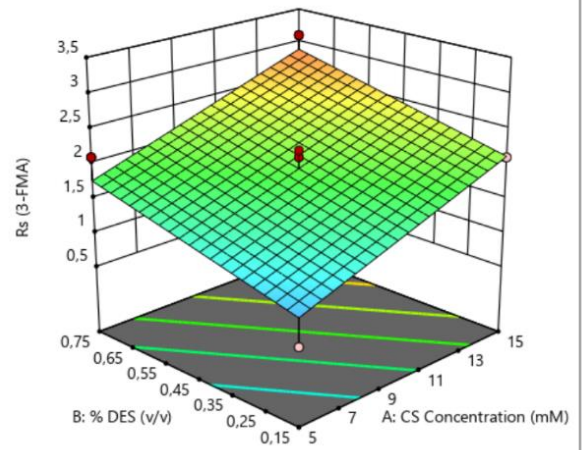
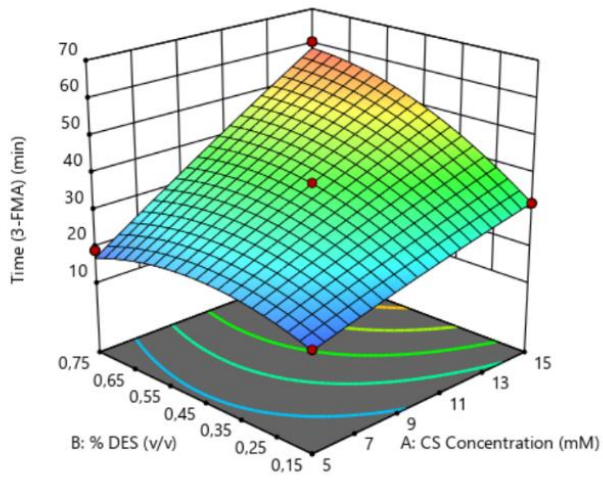
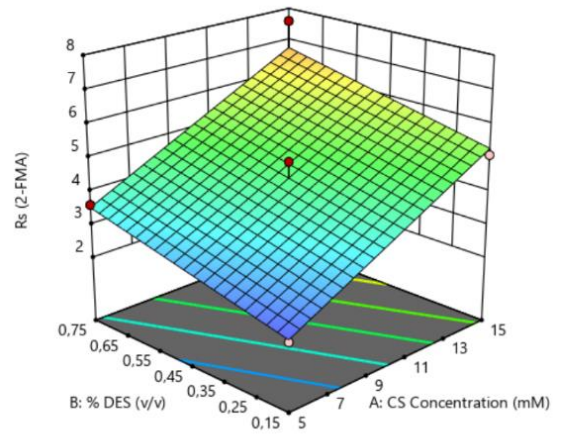
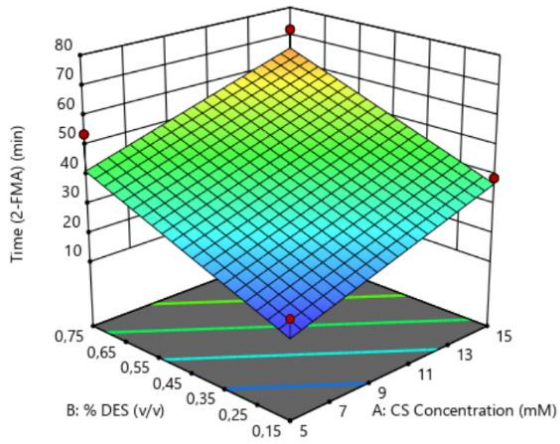
Οι επιφάνειες απόκρισης και τα ισομετρικά διαγράμματα αποτελούν γραφικές αναπαραστάσεις των μοντέλων παλινδρόμησης και θεωρούνται εξαιρετικά χρήσιμες, τόσο για την κατανόηση των σημαντικών επιδράσεων, όσο και για τον προσδιορισμό των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών. Οι επιφάνειες απόκρισης και τα ισομετρικά διαγράμματα που προέκυψαν, για όλους τους υπό μελέτη αναλύτες, απεικονίζονται στο Σχήμα 4.15.

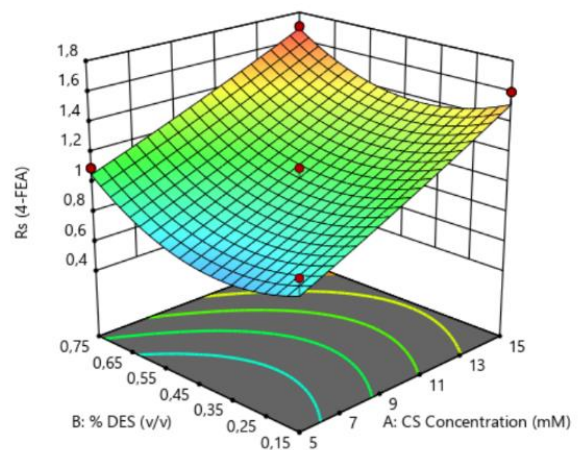
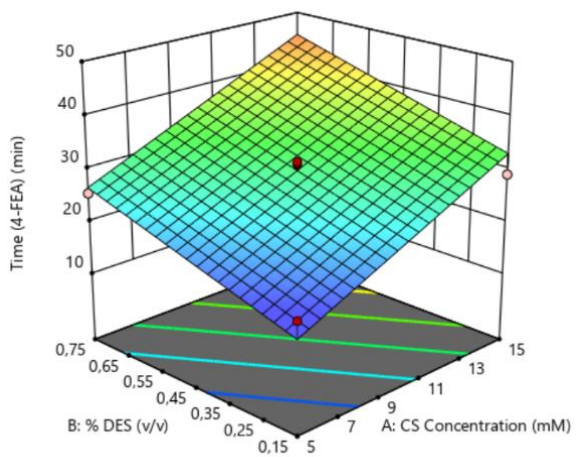
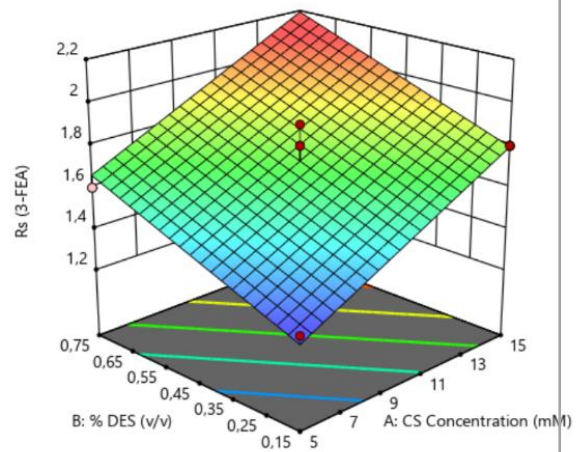
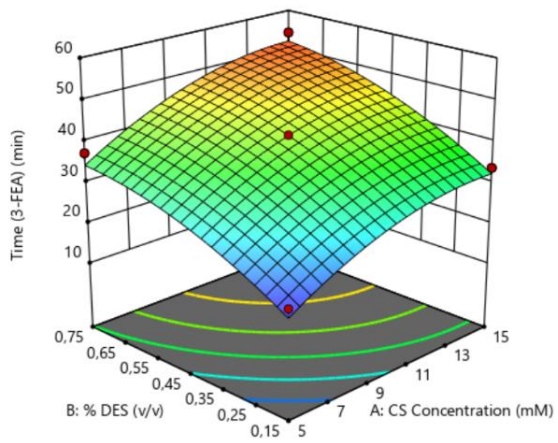
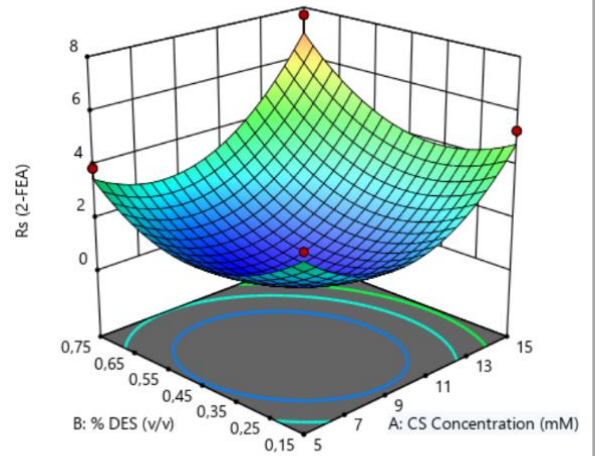
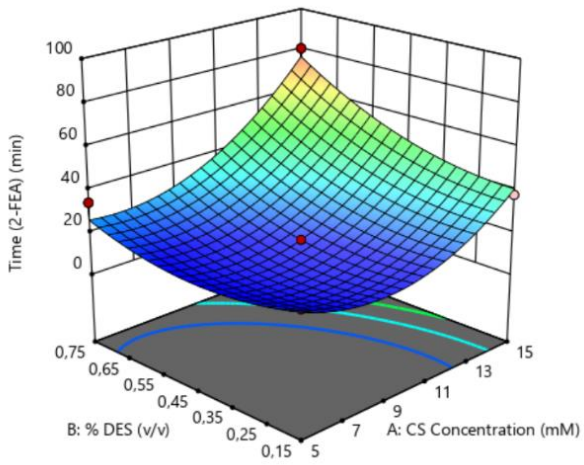
Από τα διαγράμματα που προέκυψαν, διαπιστώθηκε πως και οι δύο ανεξάρτητες μεταβλητές, επηρεάζουν σημαντικά τον εναντιομερή διαχωρισμό και έχουν επίσης σημαντική επίδραση στο συνεργειακό φαινόμενο, με την συγκέντρωση της CM-β-CD να είναι η πιο σημαντική παράμετρος. Γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι ο χειρόμορφος διαχωρισμός των ψυχοδραστικών ενώσεων, μπορεί να βελτιστοποιηθεί σε μικρό χρόνο ανάλυσης μέσω της επιλογής των κατάλληλων πειραματικών συνθηκών.

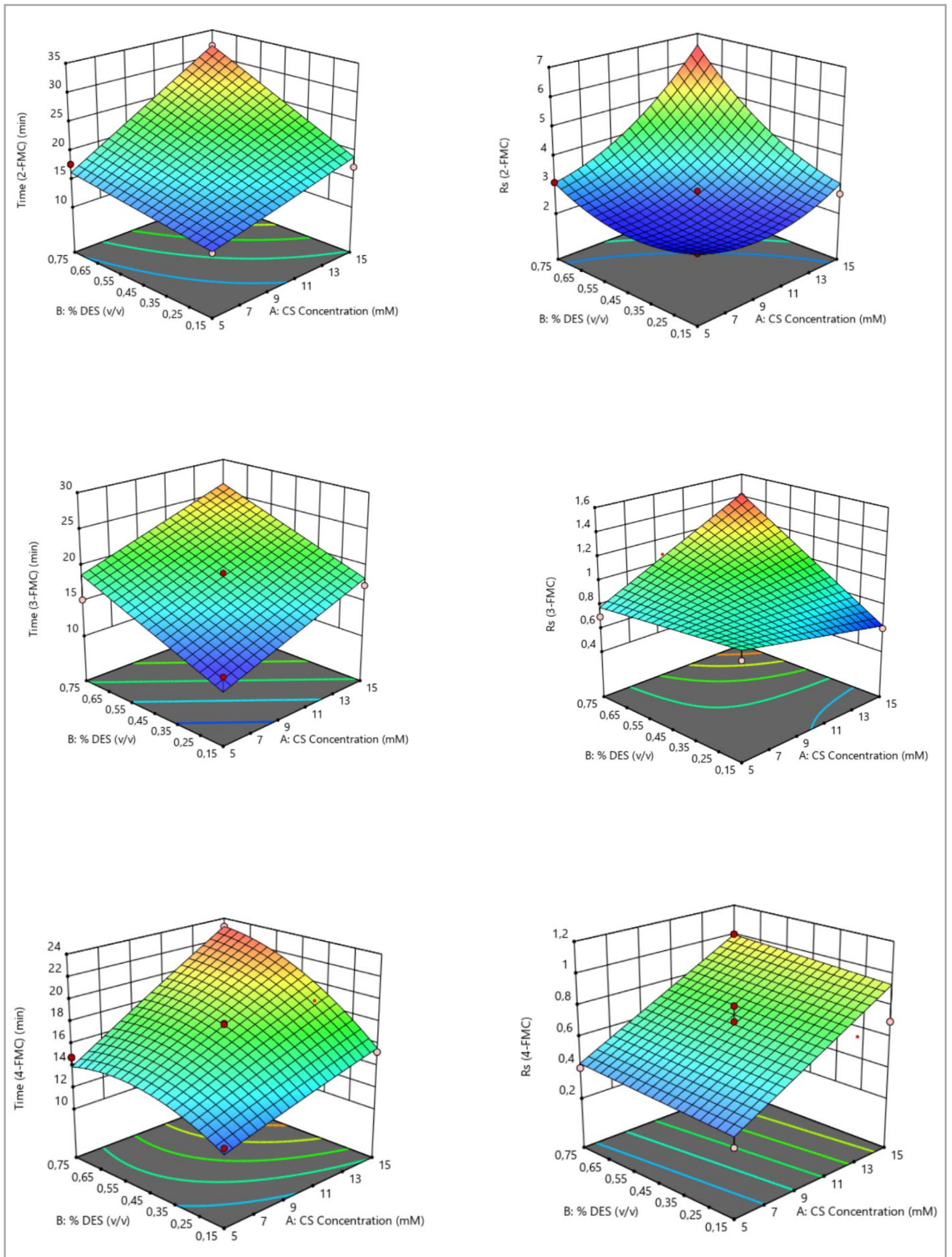
Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της CM-β-CD (A), οδήγησε σε αύξηση των χρόνων μετανάστευσης των αναλυτών και κατά συνέπεια σε

Κεφάλαιο 4

βελτίωση του χειρόμορφου διαχωρισμού τους (αύξηση της τιμής της διαχωριστικής ικανότητας, R_s).







Σχήμα 4.15. Επιφάνειες απόκρισης και ισομετρικά διαγράμματα.

Κεφάλαιο 4

Η αύξηση της συγκέντρωσης της CM-β-CD (A) έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας (μ_{ep}) όλων των αναλυτών, αυξάνοντας έτσι το χρόνο μετανάστευσης των αναλυτών, και βελτιώνοντας τον εκάστοτε διαχωρισμό, ως συνέπεια της συμπλοκοποίησης του εναντιομερούς στην κοιλότητα του CS.

Μία παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε στην περίπτωση της προσθήκης του ποσοστού του ChCl-EG στον BGE ο οποίος περιείχε CM-β-CD. Σε αυτή την περίπτωση, η αύξηση του ποσοστού του ChCl-EG (B) (ανεξάρτητη μεταβλητή), οδήγησε σε αξιοσημείωτη βελτίωση στις τιμές της διαχωριστικής ικανότητας. Όπως προαναφέρθηκε στο Υποκεφάλαιο 4.2.2, αυτό πιθανόν να οφείλεται στην προσρόφηση των μορίων του DES (ChCl) στα τοιχώματα της στήλης, οδηγώντας έτσι σε μείωση της EOF και σε αύξηση των αλληλεπιδράσεων και βελτίωση του εκάστοτε διαχωρισμού [118,138,179].

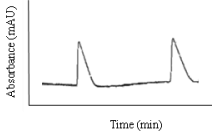
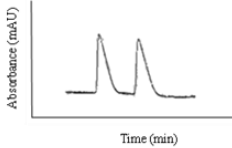
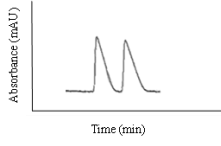
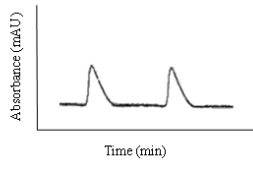
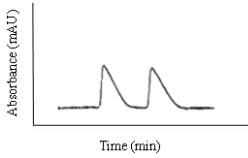
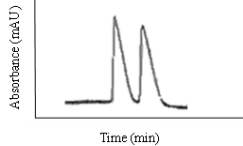
4.3.4 Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών και επικύρωση των μαθηματικών μοντέλων

Μέσω της RSM, κατέστη δυνατή η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για την επίτευξη του καλύτερου εναντιομερούς διαχωρισμού των φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης, σε συνδυασμό με τον γρηγορότερο χρόνο ανάλυσης. Στην περίπτωση των φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης ως βέλτιστες συνθήκες αποδείχθηκαν οι ακόλουθες: 13.84 mM CM-β-CD και 0.15% v/v ChCl-EG. Στην περίπτωση των φθοριωμένων αναλόγων καθινόνης, οι βέλτιστες συνθήκες ήταν αρκετά παρόμοιες, και επιτεύχθηκαν μέσω της χρήσης 14.36 mM CM-β-CD και 0.75% v/v ChCl-EG.

Με σκοπό την επαλήθευση της αξιοπιστίας των μοντέλων επιφανειών απόκρισης, πραγματοποιήθηκαν εκ νέου πειράματα κάτω από τις εκτιμώμενες από τα μοντέλα βέλτιστες συνθήκες. Στους Πίνακες 4.10 και 4.11 παρουσιάζονται οι πειραματικές τιμές καθώς και τα ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν υπό τις βέλτιστες συνθήκες. Στον Πίνακα 4.12 συνοψίζονται οι προβλεπόμενες και πειραματικές τιμές, οι οποίες, όπως αποδείχθηκε, βρίσκονται σε μια πολύ καλή συμφωνία μεταξύ τους, με το ποσοστό σφάλματος να είναι μικρότερο του 3.33% και 4.54% για τα φθοριωμένα ανάλογα αμφεταμίνης και καθινόνης, αντίστοιχα.

Κεφάλαιο 4

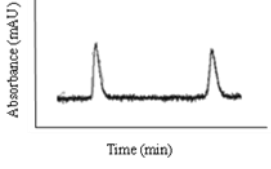
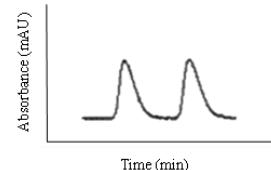
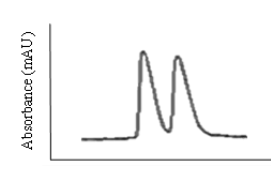
Πίνακας 4.10. Πειραματικές τιμές των φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης υπό τις βέλτιστες συνθήκες. *Συνθήκες:* 13.84 mM CM-β-CD, 0.15% v/v ChCl-EG, 20 mM NaH₂PO₄, pH=2.5, T: 25 °C, V = 25 kV στην κάθοδο, έγχυση δείγματος = 50 mbar για 5 s, δείγμα: 0.2 mg/mL σε MeOH, ανίχνευση: 210 nm.

Φθοριωμένα ανάλογα αμφεταμίνης				Ηλεκτροφερόγραμμα
Αναλύτες	t ₁ (min)	t ₂ (min)	R _s	
2-FMA	33.50	38.25	4.90	
3-FMA	30.95	32.25	1.83	
4-FMA	24.15	24.80	1.50	
2-FEA	29.34	33.00	3.78	
3-FEA	31.50	33.00	1.65	
4-FEA	29.20	30.00	1.50	

Η ισχυρή συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ των προτεινόμενων και πειραματικών τιμών, τόσο του χρόνου ανάλυσης όσο και των τιμών της διαχωριστικής ικανότητας, επιβεβαίωσε την εγκυρότητα και αποτελεσματικότητα των μοντέλων να αντικατοπτρίζουν τις τιμές της απόκρισης και, συνεπώς, να προσδιορίζουν τις βέλτιστες συνθήκες χειρόμορφου διαχωρισμού.

Κεφάλαιο 4

Πίνακας 4.11. Πειραματικές τιμές των φθοριωμένων αναλόγων καθιόνης υπό τις βέλτιστες συνθήκες. *Συνθήκες:* 14.36 mM CM-β-CD, 0.75% v/v ChCl-EG, 20 mM NaH₂PO₄, pH=2.5, T: 25 °C, V = 25 kV στην κάθοδο, έγχυση δείγματος = 50 mbar για 5 s, δείγμα: 0.2 mg/mL σε MeOH, ανίχνευση: 210 nm.

Φθοριωμένα ανάλογα καθιόνης				
Αναλύτες	t ₁ (min)	t ₂ (min)	R _s	Ηλεκτροφερόγραμμα
2-FMC	28.10	32.10	6.70	
3-FMC	27.75	28.50	1.50	
4-FMC	22.55	23.00	1.00	

Πίνακας 4.12. Βέλτιστες συνθήκες. Προτεινόμενες και πειραματικές τιμές. *Συνθήκες:* *13.84 mM CM-β-CD, 0.15% v/v ChCl-EG, **14.36 mM CM-β-CD, 0.75% v/v ChCl-EG, 20 mM NaH₂PO₄, pH=2.5, T: 25 °C, V = 25 kV στην κάθοδο, έγχυση δείγματος = 50 mbar για 5 s, δείγμα: 0.2 mg/mL σε MeOH, ανίχνευση:

Εξαρτημένες Μεταβλητές	Προτεινόμενες Τιμές	Πειραματικές Τιμές	% Σφάλμα
Time (2-FMA)*	37.36	38.25	2.39
R _s (2-FMA)*	4.92	4.90	0.46
Time (3-FMA)*	31.21	32.25	3.33
R _s (3-FMA)*	1.84	1.83	0.55
Time (4-FMA)*	24.04	24.80	3.17
R _s (4-FMA)*	1.49	1.50	1.08
Time (2-FEA)*	32.19	33.00	2.50
R _s (2-FEA)*	3.75	3.78	0.73
Time (3-FEA)*	32.01	33.00	3.09
R _s (3-FEA)*	1.70	1.65	2.93
Time (4-FEA)*	30.85	30.00	2.77
R _s (4-FEA)*	1.38	1.50	1.26
Time (2-FMC)**	31.12	32.10	3.15
R _s (2-FMC)**	6.63	6.70	0.99
Time (3-FMC)**	29.00	28.50	1.76
R _s (3-FMC)**	1.43	1.50	4.54

Κεφάλαιο 4

Time (4-FMC)**	22.66	23.00	1.52
R _s (4-FMC)**	0.99	1.00	1.10

Για περαιτέρω επιβεβαίωση της εγκυρότητας και αποτελεσματικότητας των εν λόγω μοντέλων, επιπρόσθετα διεργαστηριακά πειράματα (interlaboratory experiments) πραγματοποιήθηκαν στο ερευνητικό εργαστήριο του Τμήματος Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου του Graz (Graz University, Austria) υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Dr. Martin Schmid, στο πλαίσιο του προγράμματος Erasmus Placement με χρήση ακόμα τριών φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης, του 2-FA, 3-FA και 4-FA, υπό τις βέλτιστες συνθήκες που προσδιορίστηκαν μέσω της RSM (13.84 mM CM-β-CD και 0.15% v/v ChCl-EG). Από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, οι τιμές της διαχωριστικής ικανότητας των αναλυτών 2-FA, 3-FA, και 4-FA ήταν 1.7, 1.5, και 1.3, αντίστοιχα, σε χρόνο ανάλυσης μικρότερο από 29.11, 27.92, και 21.38 min.

4.3.5 Επικύρωση Μεθόδου

Μετά τη διαδικασία βελτιστοποίησης, ακολούθησε η επικύρωση της εν λόγω μεθόδου. Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκε ως προς την πιστότητα της (precision). Για την πλήρη αξιολόγηση της πιστότητας, μελετήθηκε, τόσο η επαναληψιμότητα (repeatability, intra-day precision), όσο και η αναπαραγωγιμότητα (reproducibility, inter-day precision) των χρόνων μετανάστευσης των δυο εναντιομερών των αναλυτών (t_1 και t_2) υπό τις βέλτιστες συνθήκες (20 mM NaH₂PO₄, το οποίο περιείχε 13.84 mM CM-β-CD και 0.15% v/v ChCl-EG για τα ανάλογα αμφεταμίνης ή 14.36 mM CM-β-CD και 0.75% v/v ChCl-EG για τα ανάλογα καθινόνης, pH=2.5).

Για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας, ακολούθηθηκε η πορεία η οποία αναφέρθηκε λεπτομερώς στο Υποκεφάλαιο 3.1.2.2. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, οι τιμές επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας των χρόνων μετανάστευσης όλων των αναλυτών ήταν μικρότερες από 0.72% και 1.59%, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας έτσι την πολύ καλή επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα που χαρακτηρίζει τη μέθοδο που αναπτύχθηκε.

4.3.6 Ικανότητα χειρόμορφης αναγνώρισης του δυαδικού συστήματος CM-β-CD/ChCl-EG ως προς τους υπό μελέτη αναλύτες

Σε αυτήν τη μελέτη, το δυαδικό σύστημα CM-β-CD/ChCl-EG κατέδειξε διαφορετική εναντιοεκλεκτικότητα (μεγαλύτερη ή μικρότερη) για συγκεκριμένα ανάλογα (αμφεταμινών ή καθινονών), τα οποία διαφέρουν ελάχιστα στη δομή τους. Η διαφορετική εναντιοεκλεκτικότητα παρατηρήθηκε μεταξύ ενώσεων που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη θέση (*ortho*, *meta*, *para*) της υποκατάστασης του αλογόνου (συγκεκριμένα φθορίου).

Από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν και συνοψίζονται στους Πίνακες 4.10 και 4.11, καταδεικνύεται ότι η εναντιοεκλεκτικότητα του δυαδικού συστήματος CM-β-CD/ChCl-EG ήταν χαμηλότερη για αναλύτες με άτομο φθορίου στην *para* θέση (*para* position). Συγκεκριμένα, η ικανότητα χειρόμορφης αναγνώρισης του εν λόγω δυαδικού συστήματος μειώνεται ακολουθώντας τη σειρά: άτομο φθορίου στην *ortho*-θέση > *meta*-θέση > *para*-θέση. Για παράδειγμα, οι τιμές της διαχωριστικής ικανότητας των αναλόγων φθορομεθαμφεταμίνης (FMA analogs), μειώθηκαν από 4.90 (2-FMA) σε 1.83 (3-FMA) και 1.50 (4-FMA), στην περίπτωση παρουσίας του ατόμου του φθορίου στην *ortho*-θέση, *meta*-θέση και *para*-θέση, αντίστοιχα. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε προηγούμενη μελέτη, στην οποία χρησιμοποιήθηκε CD ή CF ως CS (Υποκεφάλαιο 4.1.4) και η εναντιοεκλεκτικότητα μειώθηκε για το ανάλογο της 4-FA σε σύγκριση με της AMP.

Επιπρόσθετα, το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε τόσο στην περίπτωση των αναλόγων φθοροαιθαμφεταμίνης (FEA analogs) (Πίνακας 4.10), όσο και των αναλόγων φθορομεθκαθινόνης (FMC analogs) (Πίνακας 4.11). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η θέση της υποκατάστασης του ατόμου του φθορίου στην δομή των NPS επηρεάζει σημαντικά τον χειρόμορφο διαχωρισμό.

Επιπλέον, η εναντιοεκλεκτικότητα του δυαδικού συστήματος CM-β-CD/ChCl-EG, δεν επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία μεθυλομάδας (ανάλογα FMA) ή αιθυλομάδας (ανάλογα FEA), στο άτομο του αζώτου των φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τιμές της διαχωριστικής ικανότητας, τόσο των φθορομεθαμφεταμινών όσο και των φθοροαιθαμφεταμινών, ήταν αρκετά παρόμοιες (Πίνακας 4.10).

4.3.7 Συμπεράσματα

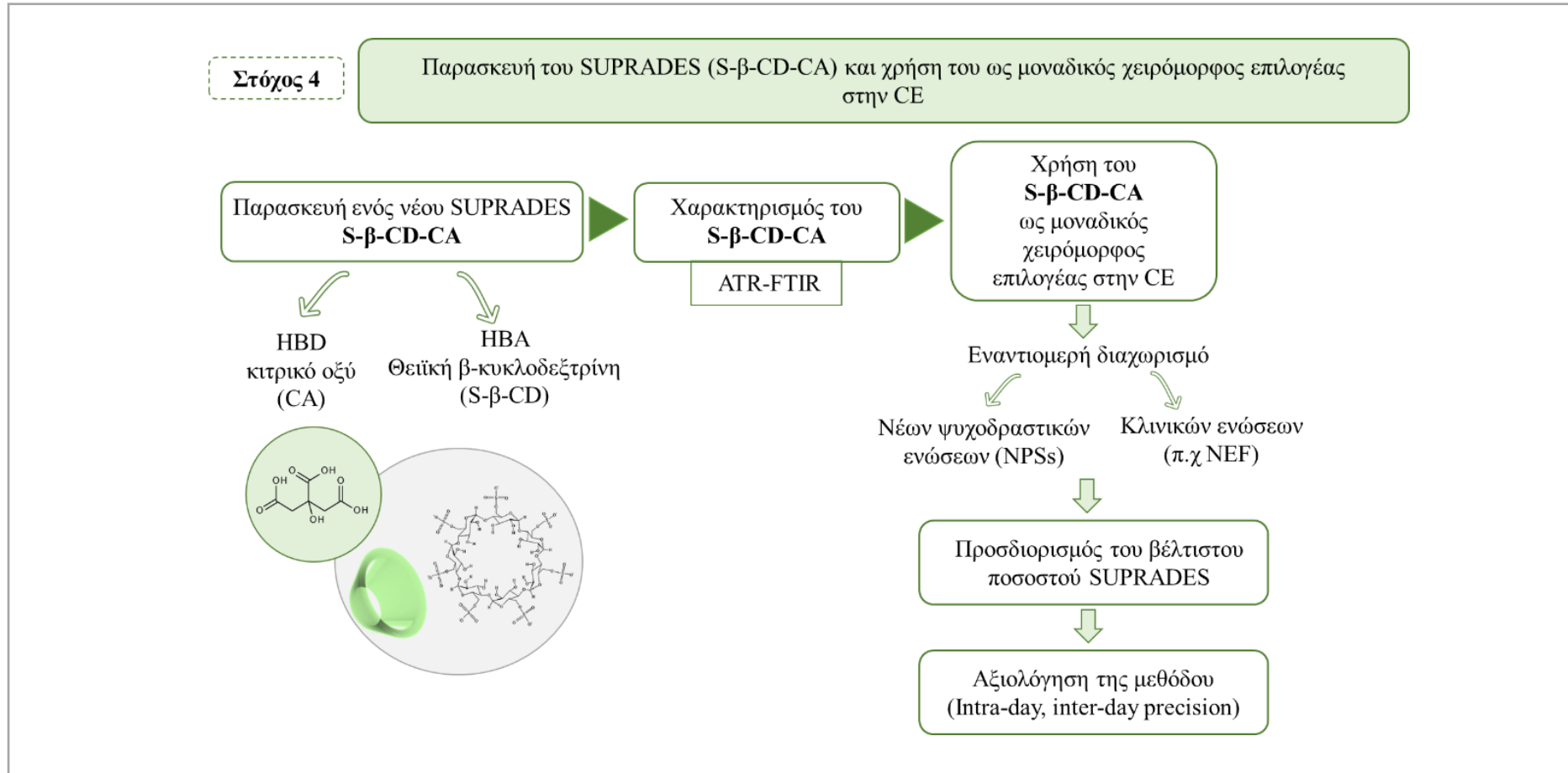
Συνοψίζοντας, στο παρόν στάδιο, έλαβε χώρα βελτιστοποίηση μίας στερεοεκλεκτικής μεθόδου για τον εναντιομερή διαχωρισμό φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης με χρήση ενός δυαδικού συστήματος το οποίο αποτελείται από CM-β-CD και ChCl-EG, μέσω της RSM. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της CM-β-CD και του ποσοστού του DES (ChCl-EG) στη μεγιστοποίηση των τιμών της διαχωριστικής ικανότητας σε συνδυασμό με την ελαχιστοποίηση του χρόνου ανάλυσης. Μεταξύ των παραμέτρων που εξετάστηκαν, η συγκέντρωση της CM-β-CD παρουσίασε τη σημαντικότερη επίδραση στην απόκριση. Οι βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν αποδείχθηκαν αρκετά παρόμοιες, για τα φθοριωμένα ανάλογα τόσο αμφεταμίνης όσο και καθινόνης. Οι βέλτιστες συνθήκες των φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης ήταν οι ακόλουθες: 13.84 mM CM-β-CD και 0.15% v/v ChCl-EG, ενώ στην περίπτωση των φθοριωμένων αναλόγων καθινόνης, οι βέλτιστες συνθήκες επιτεύχθηκαν μέσω της χρήσης 14.36 mM CM-β-CD και 0.75% v/v ChCl-EG. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, η μέθοδος αυτή αποδείχθηκε καταλληλότερη για την επίτευξη πλήρους διαχωρισμού των φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης, τονίζοντας τη σημαντικότητα των DESs ως πρόσθετα στην CE. Επιπλέον, η προτεινόμενη μέθοδος παρουσίασε ικανοποιητική ακρίβεια, και απέδειξε ότι μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία για τον εναντιομερή διαχωρισμό NPS, τα οποία διαφέρουν ελάχιστα στη δομή τους.

4.4 Παρασκευή του SUPRADES (S-β-CD-CA) και χρήση του ως μοναδικός CS στην CE

Τα DESs και συγκεκριμένα οι υπερμοριακοί εύτηκτοι διαλύτες (Supramolecular Deep Eutectic Solvents, SUPRADESs), έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, ο αριθμός των δημοσιεύσεων στη βιβλιογραφία σχετικά με τα SUPRADESs και τις εφαρμογές τους είναι περιορισμένος. Παρόλα αυτά, από τις ήδη υπάρχουσες δημοσιεύσεις, υποδεικνύεται ότι η β-CD, είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ως HBA στην περίπτωση των SUPRADESs [90].

Κεφάλαιο 4

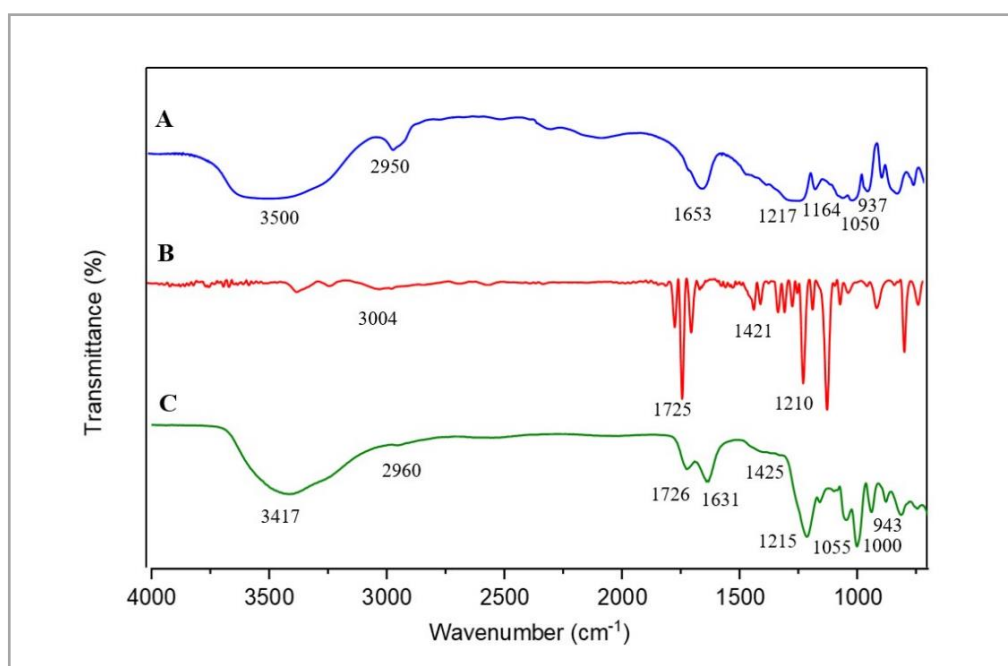
Υπό τις συνθήκες αυτές, κύριος στόχος αυτής της μελέτης ήταν η παρασκευή, για πρώτη φορά, ενός SUPRADES, ονόματι S-β-CD-CA, ο οποίος αποτελείτο από θειϊκή β-κυκλοδεξτρίνη (S-β-CD) ως HBA και κιτρικό οξύ (CA) ως HBD. Ακολούθως, ως επιπρόσθετος στόχος τέθηκε η χρήση του προαναφερθέντος SUPRADES ως ο μοναδικός CS για τον εναντιομερή διαχωρισμό (i) αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την παρουσία και τη θέση υποκατάστατων και (ii) της κλινικής ένωσης Νεφοπάμης (Nefopam, NEF). Το διάγραμμα ροής της πορείας που ακολουθήθηκε για την υλοποίηση του τέταρτου στόχου της εν λόγω Δ.Δ. φαίνεται στο Σχήμα 4.16.



Σχήμα 4.16. Διάγραμμα ροής στόχου 4 της Δ.Δ.

4.4.1 Χαρακτηρισμός του SUPRADES, S-β-CD-CA

Για την επιβεβαίωση του σχηματισμού του S-β-CD-CA, τον προσδιορισμό των λειτουργικών ομάδων που υπάρχουν στο SUPRADES αλλά και για την επιβεβαίωση της ύπαρξης δεσμών στα επιμέρους συστατικά, δηλαδή μεταξύ των μορίων HBA (S-β-CD) και HBD (CA), χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (ATR-FTIR). Τα φάσματα ATR-FTIR πάρθηκαν μέσω του φασματόμετρου υπέρυθρης ακτινοβολίας (IR Spirit-Shimadzu, Japan) με ρυθμό 25 σάρωσεις/sec, ενώ η περιοχή συχνοτήτων που λήφθηκαν τα φάσματα ήταν στα $(500-4000) \text{ cm}^{-1}$ και παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.17.



Σχήμα 4.17. Φάσματα ATR-FTIR (A) S-β-CD, (B) CA και (C) S-β-CD-CA.

Όπως φαίνεται, κανένας νέος χημικός δεσμός δε σχηματίστηκε κατά την παρασκευή του S-β-CD-CA, υποδηλώνοντας το σχηματισμό ευτηκτικού μίγματος. Συγκεκριμένα, στο φάσμα της S-β-CD [Σχήμα 4.17 (A)] παρατηρούνται χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης οι οποίες οφείλονται σε δονήσεις τάσης και κάμψης των χαρακτηριστικών ομάδων. Στους $3300-3500 \text{ cm}^{-1}$ σε δόνηση τάσης του δεσμού O-H (O-H stretching vibration), 2930 cm^{-1} σε δόνηση τάσης του δεσμού C-H (C-H stretching vibration), 1640 cm^{-1} σε δόνηση κάμψης του δεσμού O-H (O-H bending vibration) και 1155 cm^{-1} σε δόνηση του δεσμού C-O (C-O vibration). Στο φάσμα FTIR του CA [Σχήμα 4.17 (B)] εμφανίζονται χαρακτηριστικές κορυφές για τις δονήσεις

τάσεις των O-H (O-H stretching) στους 3004 cm^{-1} , C=O bond στους 1725 cm^{-1} , CH₂ στους 1421 cm^{-1} και C-O (C-O stretching) στους 1210 cm^{-1} , αντίστοιχα.

Όπως προαναφέρθηκε, το SUPRADES, S-β-CD-CA, παρασκευάζεται μέσω του συνδυασμού των αρχικών αντιδραστηρίων S-β-CD και CA. Επομένως, το φάσμα ATR-FTIR του παρασκευασθέν SUPRADES [Σχήμα 4.17 (C)] φαίνεται να έχει ελάχιστες διαφορές, όπως μετατόπιση των κορυφών και αλλαγή στην ένταση των κορυφών, σε σύγκριση με τα φάσματα ATR-FTIR των μεμονωμένων συστατικών (S-β-CD, CA) [182]. Το τελευταίο υποδεικνύει την ύπαρξη δεσμών υδρογόνου μεταξύ των επιμέρους συστατικών του SUPRADES.

4.4.2 Εναντιομερής διαχωρισμός φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης με χρήση του S-β-CD-CA ως μοναδικός CS

Στη μελέτη αυτή, αξιολογήθηκε, για πρώτη φορά, η χρήση ενός SUPRADES, του S-β-CD-CA, ως ο μοναδικός CS για την επίτευξη πλήρους εναντιομερούς διαχωρισμού έξι φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης, 2-FA, 3-FA, 4-FA, 2-FMA, 3-FMA και 4-FMA. Οι δομές των αναλυτών παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.7 και Σχήμα 3.8. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι όλα τα πειράματα για τη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκαν στο ερευνητικό εργαστήριο του Τμήματος Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου του Graz (Graz University, Austria) υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Dr. Martin Schmid, στο πλαίσιο του προγράμματος Erasmus Placement, σε αυτοματοποιημένο σύστημα Agilent ^{3D}CE system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) εφοδιασμένο με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (Diode Array Detector, DAD). Όλες οι ηλεκτροφορητικές παραμέτροι διατηρήθηκαν σταθερές, με βάση τη μελέτη που έγινε σε προηγούμενο στάδιο (Υποκεφάλαιο 4.1.1).

Για την αξιολόγηση της χρήσης του SUPRADES ως ο μοναδικός CS, έγιναν προσθήκες του μέσα στον BGE (20 mM NaH₂PO₄, pH 2.5), σε διαφορετικά ποσοστά, τα οποία κυμαίνονταν από 0 έως 0.050% v/v για τα ανάλογα, 2-FA, 3-FA, 2-FMA και 3-FMA, και από 0 έως 0.15% v/v για τα *para* υποκατεστημένα ανάλογα 4-FA και 4-FMA, αντίστοιχα. Τα συνολικά αποτελέσματα των χρόνων μετανάστευσης και των τιμών της διαχωριστικής ικανότητας που προέκυψαν συνοψίζονται στον Πίνακα 4.13. Επιπρόσθετα, στις περιπτώσεις πολύ χαμηλής ανάλυσης όπου ήταν δύσκολο να

Κεφάλαιο 4

προσδιορίζεται με ακρίβεια η τιμή της διαχωριστικής ικανότητας, αξιολογήθηκε και ο παράγοντας Kaiser (f/g), οι τιμές του οποίου παρατίθενται στον Πίνακα 4.13

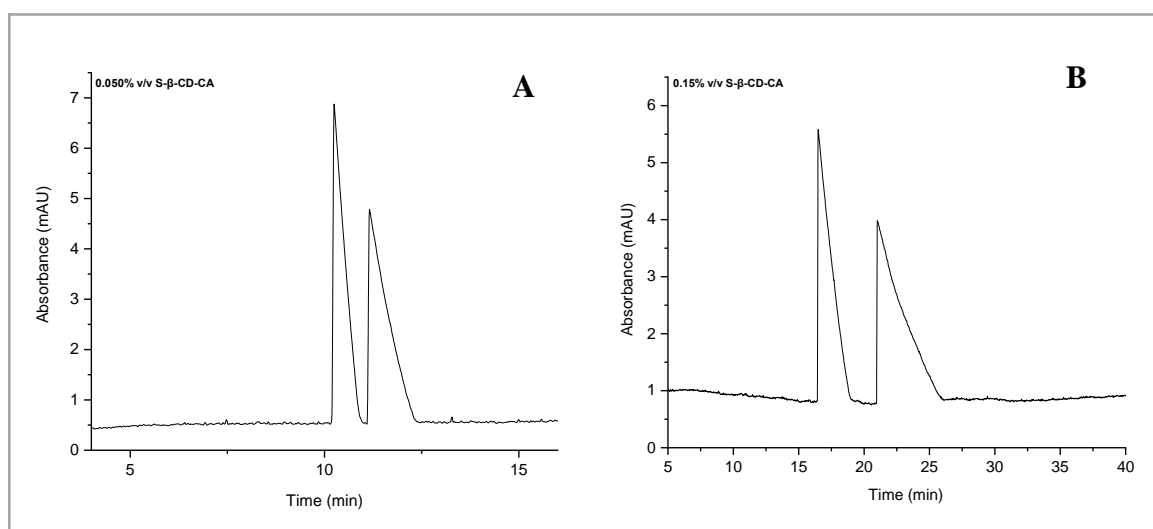
Πίνακας 4.13. Χρόνοι μετανάστευσης, παράγοντας Kaiser και τιμές διαχωριστικής ικανότητας, για το χειρόμορφο διαχωρισμό έξι φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης με χρήση της S-β-CD-CA ως CS.

Ένωση	Ποσοστό SUPRADES (% v/v)	t ₁ (min)	t ₂ (min)	R _s	f/g
2-FA	0	6.58	-	-	-
	0.005	8.07	8.16	0.1	0.08
	0.010	8.10	8.41	0.4	0.43
	0.015	9.49	10.48	0.8	0.85
	0.025	9.19	9.98	0.6	0.60
	0.050	12.97	16.23	1.6	1.00
3-FA	0	6.61	-	-	-
	0.005	8.11	8.21	0.2	0.15
	0.010	8.16	8.50	0.5	0.37
	0.015	9.54	10.60	0.8	0.87
	0.025	9.31	10.20	1.0	0.88
	0.050	13.15	16.65	1.5	1.00
4-FA	0	6.59	-	-	-
	0.005	7.83	-	-	-
	0.010	8.17	8.26	0.1	0.06
	0.015	8.62	8.86	0.4	0.37
	0.025	8.33	8.50	0.4	0.42
	0.050	9.89	10.55	0.8	0.92
	0.10	12.91	15.00	1.1	0.95
	0.15	16.49	21.00	1.8	1.00
2-FMA	0	6.53	-	-	-
	0.005	8.44	8.61	0.3	0.22
	0.010	8.62	9.05	0.5	0.36
	0.015	9.53	11.47	1.0	0.91
	0.025	9.36	10.52	0.7	0.93
	0.050	13.17	17.33	1.6	1.00
3-FMA	0	6.75	-	-	-
	0.005	8.42	8.54	0.1	0.10
	0.010	8.16	8.50	0.5	0.43
	0.015	9.85	11.01	0.7	0.88
	0.025	9.47	10.70	0.9	0.90
	0.050	13.46	17.09	1.7	1.00
4-FMA	0	6.74	-	-	-
	0.005	7.99	8.04	0.1	0.02
	0.010	7.86	8.00	0.3	0.36
	0.015	8.74	9.10	0.6	0.68

Κεφάλαιο 4

0.025	8.58	8.87	1.0	0.88
0.050	10.25	11.16	1.5	1.00
0.10	13.71	16.78	1.8	1.00
0.15	18.43	26.47	2.3	1.00

Παρατηρήθηκε μία αξιοσημείωτη βελτίωση στις τιμές της διαχωριστικής ικανότητας κατά την προσθήκη του S-β-CD-CA στον BGE. Συγκεκριμένα, με την προσθήκη του ελάχιστου ποσοστού της S-β-CD-CA (0.005% v/v), οι κορυφές αρχίζουν να σχάζονται και οι αναλύτες διαχωρίζονται μερικώς στα εναντιομερή τους. Αξιοσημείωτη βελτίωση στις τιμές της διαχωριστικής ικανότητας παρατηρείται με την αύξηση του ποσοστού (% v/v) του SUPRADES, οδηγώντας έτσι σε πλήρη διαχωρισμό των υπό μελέτη ενώσεων σε χρόνο μικρότερο των 21 min. Ωστόσο, η αύξηση του ποσοστού πέραν του 0.15% v/v οδήγησε στην αύξηση του ηλεκτρικού ρεύματος λόγω της αύξησης του ιζώδους του ρυθμιστικού διαλύματος [118]. Έτσι, ως βέλτιστο ποσοστό επιλέχθηκε το 0.050% v/v της S-β-CD-CA, το οποίο οδήγησε σε πλήρη χειρόμορφο διαχωρισμό πέντε εκ των έξι υπό μελέτη αναλόγων (2-FA, 3-FA, 2-FMA, 3-FMA, 4-FMA). Παράλληλα, υψηλότερο ποσοστό (0.15% v/v) απαιτήθηκε για την επίτευξη πλήρους διαχωρισμού του *para* υποκατεστημένου αναλόγου, ονόματι 4-FA. Στο Σχήμα 4.18 παρουσιάζονται τα ηλεκτροφερογράμματα των ενώσεων 4-FMA και 4-FA μετά την προσθήκη του βέλτιστου ποσοστού SUPRADES σε κάθε περίπτωση.



Σχήμα 4.18. Τα ηλεκτροφερογράμματα (A) της ένωσης 4-FMA και (B) της ένωσης 4-FA, όταν χρησιμοποιήθηκε η βέλτιστη συγκέντρωση του SUPRADES (% v/v), αντίστοιχα (20 mM NaH₂PO₄, pH=2.5).

4.4.2.1 Επίδραση της προσθήκης των αρχικών αντιδραστηρίων της S-β-CD-CA

Περαιτέρω μελέτη για την επιβεβαίωση των πιο πάνω αποτελεσμάτων έγινε με την εξέταση της επίδρασης της προσθήκης των αρχικών αντιδραστηρίων (starting materials) του SUPRADES, για τον εναντιομερή διαχωρισμό της ένωσης 4-FMA. Συγκεκριμένα, για την υλοποίηση της μελέτης αυτής, έγινε προσθήκη: (i) κάθε μεμονωμένου συστατικού ξεχωριστά (S-β-CD, CA), (ii) των δυο συστατικών μαζί (S-β-CD + CA) καθώς και (iii) του SUPRADES (S-β-CD-CA) στον BGE, διατηρώντας την ίδια αναλογία (1:2), η οποία χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του SUPRADES.

Από τα αποτελέσματα που πάρθηκαν, διαπιστώθηκε ότι, η προσθήκη της S-β-CD αλλά και των δύο συστατικών μαζί, δεν οδήγησε σε σημαντική βελτίωση του χειρόμορφου διαχωρισμού. Αντίθετα, η προσθήκη του CA, δεν οδήγησε σε καμία αλλαγή στην τιμή της διαχωριστικής ικανότητας ($R_s=0$). Συγκεκριμένα, η τιμή της διαχωριστικής ικανότητας του αναλόγου 4-FMA, για ποσοστό 0.050% v/v, πήρε την τιμή 0.4 μέσω της προσθήκης της S-β-CD, και 0.8 όταν προστέθηκαν και τα δύο συστατικά (S-β-CD + CA), στον BGE, αντίστοιχα. Αντίθετα, πλήρης χειρόμορφος διαχωρισμός επήλθε, όταν το SUPRADES προστέθηκε στον BGE ($R_s=1.5$, 0.050% v/v). Από τα πιο πάνω αποτελέσματα που προέκυψαν, καταδεικνύεται ότι το S-β-CD-CA (SUPRADES), μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοναδικός CS για τον εναντιομερή διαχωρισμό χειρόμορφων ενώσεων, επεκτείνοντας σημαντικά το πεδίο εφαρμογής των SUPRADESs στην CE.

4.4.3 Εναντιομερής διαχωρισμός αναλόγων καθινόνης με χρήση του S-β-CD-CA ως μοναδικός CS

Με σκοπό την περαιτέρω αξιολόγηση της χρήσης της S-β-CD-CA ως ο μοναδικός CS, πραγματοποιήθηκαν πειράματα και για τον χειρόμορφο διαχωρισμό πέντε αναλόγων καθινόνης (3-MMC, 4-MMC, 3,4-DMMC, MDMC, 4-MEC). Το προαναφερθέν SUPRADES προστέθηκε μέσα στον BGE (20 mM NaH_2PO_4 , pH 2.5), σε διαφορετικά ποσοστά, τα οποία κυμαίνονταν από 0 έως 0.10% v/v για όλα τα ανάλογα, εκτός από το ανάλογο 3,4-DMMC, αφού σε αυτή την περίπτωση απαιτήθηκαν χαμηλότερα ποσοστά για την επίτευξη πλήρους διαχωρισμού (0 έως 0.050% v/v). Τα συνολικά

Κεφάλαιο 4

αποτελέσματα των χρόνων μετανάστευσης και των τιμών της διαχωριστικής ικανότητας που προέκυψαν συνοψίζονται στον Πίνακα 4.14.

Πίνακας 4.14. Χρόνοι μετανάστευσης και τιμές διαχωριστικής ικανότητας για το χειρόμορφο διαχωρισμό πέντε αναλόγων καθινόνης με χρήση της S-β-CD-CA ως CS.

Ένωση	Ποσοστό SUPRADES (% v/v)	t ₁ (min)	t ₂ (min)	R _s
3-MMC	0	6.84	-	-
	0.010	8.18	8.26	0.3
	0.015	8.45	8.54	0.4
	0.025	8.92	9.29	0.8
	0.050	10.49	11.32	1.5
	0.075	12.30	14.16	1.9
	0.10	14.03	17.23	2.2
4-MMC	0	6.57	-	-
	0.010	8.08	8.2	0.4
	0.015	8.51	8.70	0.5
	0.025	9.25	9.66	0.8
	0.050	10.7	11.70	1.3
	0.075	12.3	14.16	1.9
	0.10	16.65	21.46	2.1
3,4-DMMC	0	6.85	-	-
	0.010	8.78	9.24	1.0
	0.015	8.86	9.26	1.2
	0.025	9.35	9.67	1.4
	0.050	15.04	23.14	2.4
MDMC	0	6.53	-	-
	0.010	8.23	8.31	0.1
	0.015	7.08	7.15	0.3
	0.025	9.3	9.64	0.6
	0.050	12.09	13.29	1.0
	0.075	17.71	20.74	1.3
	0.10	35.69	38.97	1.5
4-MEC	0	7.03	-	-
	0.010	8.63	8.75	0.4
	0.015	8.94	9.02	0.5
	0.025	9.83	10.31	0.9
	0.050	11.19	12.31	1.6
	0.075	13.74	15.97	1.9
	0.10	18.02	24.02	2.4

Παρατηρήθηκε ότι (i) με την προσθήκη 0.010% v/v του S-β-CD-CA, οι αναλύτες διαχωρίζονται μερικώς στα εναντιομερή τους και (ii) με την αύξηση του ποσοστού (%)

Κεφάλαιο 4

v/v) του SUPRADES βελτιώνονται οι τιμές της διαχωριστικής ικανότητας. Επομένως, το βέλτιστο ποσοστό για τον πλήρη χειρόμορφο διαχωρισμό των αναλόγων 3-MMC, 3,4-DMMC και 4-MEC ήταν 0.050% v/v S-β-CD-CA, , ενώ για τα ανάλογα 4-MMC και MDMC ήταν 0.075% και 0.10% v/v, αντίστοιχα.

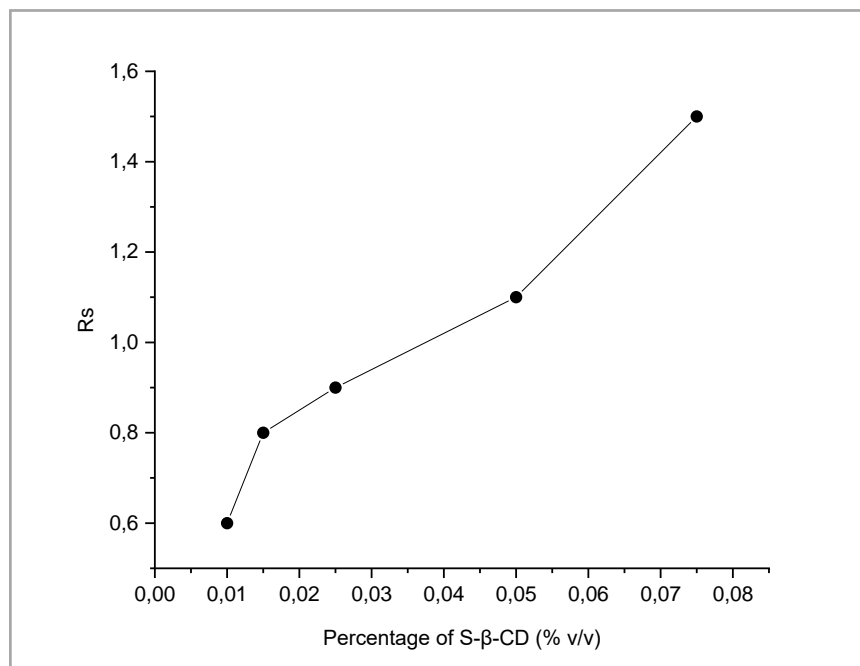
4.4.4 Επικύρωση Μεθόδου

Η πιο πάνω μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς την πιστότητα της όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στο Υποκεφάλαιο 3.1.2.2. Από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, οι τιμές RSD που λήφθηκαν ήταν μικρότερες από 1.82% και 2.30%, αντίστοιχα, υποδηλώνοντας και πάλι την εξαιρετική επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου.

4.4.5 Εναντιομερής διαχωρισμός της NEF με χρήση του S-β-CD-CA ως CS

Η χρήση του SUPRADES μελετήθηκε περαιτέρω για τον χειρόμορφο διαχωρισμό της κλινικής ουσίας Νεφοπάμης (Nefopam, NEF). Το NEF είναι ένα μη οπιοειδές, αναλγητικό φάρμακο το οποίο χορηγείται κυρίως για τη θεραπεία μέτριου, οξείου ή χρόνιου πόνου [183]. Για τη χειρόμορφη ανάλυση του, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι στην CE, κυρίως με τη χρήση των παραγώγων των CDs ως CSs [184], με τη χρήση αντιβιοτικών (erythromycin lactobionate και chondroitin sulfate) [185,186], αλλά και με τη χρήση θειϊκών CFs (SCF-6) [99].

Σε αυτή τη μελέτη, το SUPRADES προστέθηκε μέσα στον BGE (100 mM Tris / 10 mM Borate, pH 8.0), σε διαφορετικά ποσοστά, τα οποία κυμάνθηκαν από 0 έως 0.075% v/v. Ο πλήρης διαχωρισμός των εναντιομερών επιτεύχθηκε με χρήση του ποσοστού 0.075% v/v (Σχήμα 4.19). Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν έρχονται σε συμφωνία με τις δυο προηγούμενες μελέτες (Υποκεφάλαιο 4.4.2.1 και 4.4.2.2), υποδηλώνοντας την επιτυχή χρήση του SUPRADES και για το διαχωρισμό κλινικών ενώσεων.



Σχήμα 4.19. Επίδραση του ποσοστού του S-β-CD-CA, στο χειρόμορφο διαχωρισμό του NEF (BGE: 100 mM Tris / 10 mM Borate, pH 8.0).

4.4.6 Επικύρωση Μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας, εκτελέστηκαν 5 διαδοχικά ηλεκτροφορητικά πειράματα εντός της ίδιας ημέρας (intra – day precision), ενώ για αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας, πραγματοποιήθηκαν 5 επαναληπτικά ηλεκτροφορητικά πειράματα για 3 συνεχόμενες μέρες (inter – day precision). Τα αποτελέσματα λήφθηκαν και πάλι σε όρους RSD %. Οι τιμές επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας που λήφθηκαν για τους χρόνους μετανάστευσης της NEF ήταν μικρότερες από 1.30% και 1.90%, αντίστοιχα.

4.4.7 Συμπεράσματα

Στη μελέτη αυτή επιτεύχθηκε με επιτυχία η παρασκευή, για πρώτη φορά, ενός υπερμοριακού εύτηκτου διαλύτη, S-β-CD-CA, ο οποίος σηματοδότησε το πρώτο παράδειγμα χειρόμορφης αναγνώρισης, τόσο για ψυχοδραστικές ενώσεις (αμφεταμίνες, καθινόνες) όσο και για κλινικές ενώσεις (π.χ. NEF). Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, καταδεικνύεται η βιωσιμότητά του ως μοναδικός CS,

Κεφάλαιο 4

ο οποίος έχει τη δυνατότητα να διευρύνει σημαντικά τις εφαρμογές για τα SUPRADESs στην CE.

5. Γενικά Συμπεράσματα

Τα τελευταία χρόνια, η παραγωγή των NPS αυξάνεται με μεγάλη ταχύτητα λόγω της περιορισμένης ικανότητας αντίχενωσης και παρακολούθησης αυτών των ενώσεων, οδηγώντας έτσι σε παγκόσμιο πρόβλημα. Επιπρόσθετα, λόγω της ύπαρξης ενός στερεογονικού κέντρου στη δομή πολλών NPS, απαντώνται σε δύο εναντιομερείς μορφές με δυνητικά διαφορετική φαρμακολογική δράση. Συγκεκριμένα, μόνο ένας μικρός αριθμός δημοσιεύσεων ασχολείται με τις εναντιοεκλεκτικές επιδράσεις των NPS, αφού η σύνθεσή τους πραγματοποιείται σε μυστικά και παράνομα εργαστήρια. Έτσι, δεδομένης της αυξημένης ανάγκης για μελέτη της φαρμακολογικής δράσης των καθαρών εναντιομερών, καθίσταται αναγκαία η ανάπτυξη ενόργανων αναλυτικών μεθόδων για χειρόμορφο διαχωρισμό.

Συμπερασματικά με τη διεκπεραίωση της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής, επιτεύχθηκαν οι επιμέρους στόχοι οι οποίοι ορίστηκαν αρχικά, ενώ εξήχθησαν σημαντικά συμπεράσματα σε κάθε επιμέρους στάδιο. Συγκεκριμένα:

Πρώτο στάδιο της Δ.Δ.:

- Έλαβε χώρα μελέτη διαφόρων ηλεκτροφορητικών παραμέτρων
 - Σημαντική παράμετρος αποδείχθηκε η συγκέντρωση του CS στον BGE
 - Η χρήση των ουδέτερων CFs, δεν οδήγησε σε χειρόμορφο διαχωρισμό για κανένα από τους υπό μελέτη αναλύτες
 - Η SCF-6 επιλέχθηκε ως ο καταλληλότερος CS στην περίπτωση των αναλόγων αμφεταμίνης
 - Πλήρης χειρόμορφος διαχωρισμός των αναλόγων καθινόνης επιτεύχθηκε με χρήση της SCF-7 ως CS
- Προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για το χειρόμορφο διαχωρισμό εναντιομερών ψυχοδραστικών ενώσεων
 - Συνθήκες: 20 mM φωσφορικό νάτριο ως ηλεκτρολυτικό διάλυμα στην παρουσία 1 mM SCF-6 ή 1 mM SCF-7 ως CSs στην περίπτωση των αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης, αντίστοιχα. Το pH του BGE διατηρήθηκε σταθερό και ίσο με 2.5, ενώ εφαρμόστηκε διαφορά δυναμικού ίση με 25 kV

Κεφάλαιο 5

Δεύτερο στάδιο της Δ.Δ.:

- Μελετήθηκε η επίδραση AAILs καθώς και DESs ως πρόσθετα στον BGE ο οποίος περιείχε CS (CDs, CFs)
 - Δεν σημειώθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές σχετικά με την επίδραση των AAILs στη διαχωριστική ικανότητα των εν λόγω ενώσεων
 - Βελτίωση στις τιμές της διαχωριστικής ικανότητας παρατηρήθηκε με συνδυασμό των DESs με την CM-β-CD
 - Η χρήση του δυαδικού συστήματος CF/DES, δεν οδήγησε σε βελτίωση του χειρόμορφου διαχωρισμού για κανένα υπό μελέτη αναλύτη
- Μελετήθηκε η συνεργειακή/ανταγωνιστική δράση των DESs, σε συνδυασμό με τις CDs και CFs
 - Ο συνδυασμός του DES με τις CDs έδειξε την ικανότητα συνέργειας στην εναντιοεκλεκτική αναγνώριση για όλα τα ανάλογα αμφεταμίνης
 - Πιθανή ανταγωνιστική δράση του DES φαίνεται να κυριαρχεί στα δυαδικά συστήματα CF/DES
- Το δυαδικό σύστημα CM-β-CD/ChCl-EG, μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία για την επίτευξη πλήρους διαχωρισμού ψυχοδραστικών ενώσεων

Τρίτο στάδιο της Δ.Δ.:

- Βελτιστοποίηση μίας στερεοεκλεκτικής μεθόδου για τον εναντιομερή διαχωρισμό φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης με χρήση του δυαδικού συστήματος CM-β-CD/ChCl-EG, μέσω της RSM
- Μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της CM-β-CD (5-15 mM) και του ποσοστού του DES (ChCl-EG) (0.15-0.75% v/v) στη μεγιστοποίηση των τιμών της διαχωριστικής ικανότητας σε συνδυασμό με την ελαχιστοποίηση του χρόνου ανάλυσης
- Η μέθοδος η οποία αναπτύχθηκε, αποδείχθηκε καταλληλότερη για την επίτευξη πλήρους διαχωρισμού των φθοριωμένων αναλόγων αμφεταμίνης και καθινόνης, τονίζοντας την σημαντικότητα των DES ως πρόσθετα στην CE
- Η μέθοδος επέδειξε ικανοποιητική ακρίβεια, και μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία για τον εναντιομερή διαχωρισμό NPS, τα οποία διαφέρουν ελάχιστα στη δομή τους

Τέταρτο στάδιο της Δ.Δ.:

- Παρασκευάστηκε για πρώτη φορά το SUPRADES ονόματι S-β-CD-CA και ακολούθως χρησιμοποιήθηκε ως CS στην CE
- Αποτελεί το πρώτο παράδειγμα SUPRADES το οποίο παρουσιάζει ικανότητα χειρόμορφης αναγνώρισης, τόσο για ψυχοδραστικές ενώσεις (αμφεταμίνες, καθινόνες) όσο και για κλινικές ενώσεις

Εν κατακλείδι, η παρούσα έρευνα συνιστά μία ολοκληρωμένη μελέτη, κατά την οποία, προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για τον χειρόμορφο διαχωρισμό διαφόρων ψυχοδραστικών ενώσεων.

6. Μελλοντική Εργασία

Με την ολοκλήρωση αυτής της Δ.Δ. εξήχθησαν κάποια σημαντικά συμπεράσματα τα οποία οδηγούν σε νέους ερευνητικούς προβληματισμούς. Η χρήση DESs σε συνδυασμό με CDs, έδειξε να βελτιώνει τη διαχωριστική ικανότητα μέσω συνεργειακής δράσης. Αντίθετα, πιθανή ανταγωνιστική δράση κυριαρχεί στα δυαδικά συστήματα CFs και DESs. Επομένως, προτείνεται μελλοντικά να μελετηθούν ο μηχανισμός συμπλοκοποίησης των CDs/DESs και CFs/DESs, ώστε να εξηγηθεί και ο τρόπος αλληλεπίδρασης του συμπλόκου CD/DES και CF/DES με τον αναλύτη, αντίστοιχα. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, προτείνονται οι φασματοσκοπικές τεχνικές, φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού (UV-Vis) και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR), οι οποίες συνηθίζονται για τη διερεύνηση του μηχανισμού εναντιοεκλεκτικής αναγνώρισης.

Επιπρόσθετα, το SUPRADES (S-β-CD-CA), το οποίο παρασκευάστηκε για πρώτη φορά, έδειξε ότι μπορεί χρησιμοποιηθεί ως μοναδικός CS για τον διαχωρισμό τόσο ψυχοδραστικών ενώσεων όσο και κλινικών ενώσεων. Έτσι, προτείνεται αρχικά, η παρασκευή και άλλων νέων SUPRADESs με βάση τις CDs και CFs καθώς και η αξιολόγηση της εναντιοεκλεκτικής τους ικανότητας ως προς διάφορους αναλύτες.

7. Βιβλιογραφία

- [1] Couto, R. A. S., Gonçalves, L. M., Carvalho, F., Rodrigues, J. A., Rodrigues, C. M. P., Quinaz, M. B. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2018, 48, 372–390.
- [2] Hägele, J. S., Hubner, E. M., Schmid, M. G. *Electrophoresis* 2019, 40, 1787–1794.
- [3] Seibert, E., Kunert, O., Pferschy-Wenzig, E. M., Schmid, M. G. *Molecules* 2022, 27, 1–8.
- [4] Trachsel, D. *Drug Test. Anal.* 2012, 4, 577–590.
- [5] Rickli, A., Hoener, M. C., Liechti, M. E. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2015, 25, 365–376.
- [6] Zhou, X., Bouitbir, J., Liechti, M. E., Krähenbühl, S., Mancuso, R. V. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21.
- [7] Grumann, C., Auwärter, V. *Drug Test. Anal.* 2018, 10, 1184–1191.
- [8] Apirakkan, O., Frinculescu, A., Shine, T., Parkin, M. C., Cilibrizzi, A., Frascione, N., Abbate, V. *Drug Test. Anal.* 2018, 10, 372–378.
- [9] Colestock, T., Wallach, J., Mansi, M., Filemban, N., Morris, H., Elliott, S. P., Westphal, F., Brandt, S. D., Adejare, A. *Drug Test. Anal.* 2018, 10, 272–283.
- [10] Metternich, S., Zörntlein, S., Schönberger, T., Huhn, C. *Drug Test. Anal.* 2019, 11, 833–846.
- [11] Brandt, S. D., Baumann, M. H., Partilla, J. S., Kavanagh, P. V., Power, J. D., Talbot, B., Twamley, B., Mahony, O., O’Brien, J., Elliott, S. P., Archer, R. P., Patrick, J., Singh, K., Dempster, N. M., Cosbey, S. H. *Drug Test. Anal.* 2014, 6, 684–695.
- [12] Tracy, D. K., Wood, D. M., Baumeister, D. *BMJ* 2017, 356, 1–7.
- [13] Spálovská, D., Králík, F., Kohout, M., Jurásek, B., Habartová, L., Kuchař, M., Setnička, V. *Chirality* 2018, 30, 548–559.
- [14] de Almeida, C. M., Pinto, F. E., dos Santos, N. A., de Souza, L. M., Merlo, B. B., Thompson, C. J., Romão, W. *Microchem. J.* 2019, 149, 104002.
- [15] Rojkiewicz, M., Kuś, P., Kusz, J., Książek, M. *Forensic Toxicol.* 2018, 36, 141–150.
- [16] Brandt, S. D., King, L. A., Evans-Brown, M. *Drug Test. Anal.* 2014, 6, 587–597.
- [17] *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2022) European Drug Report 2022: trends and developments.* 2022.

- [18] Rasmussen, L. B., Olsen, K. H., Johansen, S. S. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2006, *842*, 136–141.
- [19] Almeida, A. S., Silva, B., de Pinho, P. G., Remião, F., Fernandes, C. *Molecules* 2022, *27*, 1–33.
- [20] *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2023) European Drug Report 2023: trends and developments. 2023.*
- [21] Weiß, J. A., Kadkhodaei, K., Schmid, M. G. *Sci. Justice* 2017, *57*, 6–12.
- [22] Shulgin, A., Pihkal, A. *Chemical Love Story*, 1995.
- [23] Sitte, H. H., Freissmuth, M. *Trends Pharmacol. Sci.* 2015, *36*, 41–50.
- [24] Jirovský, D., Lemr, K., Ševčík, J., Smysl, B., Stránský, Z. *Forensic Sci. Int.* 1998, *96*, 61–70.
- [25] Albals, D., Heyden, Y. Vander, Schmid, M. G., Chankvetadze, B., Mangelings, D. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, *121*, 232–243.
- [26] Baumann, M. H., Ayestas, M. A., Partilla, J. S., Sink, J. R., Shulgin, A. T., Daley, P. F., Brandt, S. D., Rothman, R. B., Ruoho, A. E., Cozzi, N. V. *Neuropsychopharmacology* 2012, *37*, 1192–1203.
- [27] Blough, B. E., Landavazo, A., Decker, A. M., Partilla, J. S., Baumann, M. H., Rothman, R. B. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014, *231*, 4135–4144.
- [28] Cozzi, N. V., Brandt, S. D., Daley, P. F., Partilla, J. S., Rothman, R. B., Tulzer, A., Sitte, H. H., Baumann, M. H. *Eur. J. Pharmacol.* 2013, *699*, 180–187.
- [29] Eshleman, A. J., Wolfrum, K. M., Hatfield, M. G., Johnson, R. A., Murphy, K. V., Janowsky, A. *Biochem. Pharmacol.* 2013, *85*, 1803–1815.
- [30] Iversen, L., Gibbons, S., Treble, R., Setola, V., Huang, X. P., Roth, B. L. *Eur. J. Pharmacol.* 2013, *700*, 147–151.
- [31] Simmler, L. D., Rickli, A., Hoener, M. C., Liechti, M. E. *Neuropharmacology* 2014, *79*, 152–160.
- [32] Simmler, L. D., Buser, T. A., Donzelli, M., Schramm, Y., Dieu, L. H., Huwyler, J., Chaboz, S., Hoener, M. C., Liechti, M. E. *Br. J. Pharmacol.* 2013, *168*, 458–470.
- [33] Simmler, L. D., Rickli, A., Schramm, Y., Hoener, M. C., Liechti, M. E. *Biochem. Pharmacol.* 2014, *88*, 237–244.
- [34] Baumann, M. H., Solis, E., Watterson, L. R., Marusich, J. A., Fantegrossi, W. E., Wiley, J. L. *J. Neurosci.* 2014, *34*, 15150–15158.
- [35] Spálovská, D., Maříková, T., Kohout, M., Králík, F., Kuchař, M., Setnička, V.

- Forensic Toxicol.* 2019, 37, 366–377.
- [36] Plotka, J. M., Biziuk, M., Morrison, C. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2011, 30, 1139–1158.
- [37] Lee, J. S., Yang, W. K., Han, E. Y., Lee, S. Y., Park, Y. H., Lim, M. A., Chung, H. S., Park, J. H. *Forensic Sci. Int.* 2007, 173, 68–72.
- [38] Collins, M. *Drug Test. Anal.* 2011, 3, 404–416.
- [39] Mohr, S., Weiß, J. A., Spreitz, J., Schmid, M. G. *J. Chromatogr. A* 2012, 1269, 352–359.
- [40] Majchrzak, M., Celiński, R., Kuś, P., Kowalska, T., Sajewicz, M. *Forensic Toxicol.* 2018, 36, 33–50.
- [41] Valente, M. J., Guedes De Pinho, P., De Lourdes Bastos, M., Carvalho, F., Carvalho, M. *Arch. Toxicol.* 2014, 88, 15–45.
- [42] Taschwer, M., Weiß, J. A., Kunert, O., Schmid, M. G. *Forensic Sci. Int.* 2014, 244, e56–e59.
- [43] No Title http://www.emcdda.europa.eu/media-library/interactive-demystifying-chemistry-synthetic-cathinones_en.
- [44] Van Eeckhaut, A., Michotte, Y. *Chiral Separations by Capillary Electrophoresis*, CRC Press, 2009.
- [45] Nguyen, L. A., He, H., Pham-Huy, C. *Int. J. Biomed. Sci.* 2006, 2, 85–100.
- [46] GAL, J. *Chirality* 2011, 23, 1–16.
- [47] Prelog, V., Helmchen, G. *Angew. Chemie Int. Ed. English* 1982, 21, 567–583.
- [48] Cahn, R. S., Ingold, C., Prelog, V. *Angew. Chemie Int. Ed. English* 1966, 5, 385–415.
- [49] No Title <https://socratic.org/questions/what-is-a-dextrorotatory-compound>.
- [50] Wolf, C. *Dynamic Stereochemistry of Chiral Compounds: Principles and Applications*, Chemistry, T. R. S. of, Ed., 2008.
- [51] Wolf, C. The Royal Society of Chemistry, 2008, pp. 6–28.
- [52] No Title <https://chem.libretexts.org>.
- [53] Taschwer, M., Grascher, J., Schmid, M. G. *Forensic Sci. Int.* 2017, 270, 232–240.
- [54] Silva, B., Fernandes, C., Tiritan, M. E., Pinto, M. M. M., Valente, M. J., Carvalho, M., de Pinho, P. G., Remião, F. *Forensic Toxicol.* 2016, 34, 372–385.
- [55] Fernandes, C., Tiritan, M. E., Pinto, M. *Chromatographia* 2013, 76, 871–897.
- [56] Schwaninger, A. E., Meyer, M. R., Maurer, H. H. *J. Chromatogr. A* 2012, 1269,

- 122–135.
- [57] Rentsch, K. M. *J. Biochem. Biophys. Methods* 2002, 54, 1–9.
- [58] Mantim, T., Nacapricha, D., Wilairat, P., Hauser, P. C. *Electrophoresis* 2012, 33, 388–394.
- [59] Baumann, M., Glennon, R., Wiley, J. *Current Topics in Behavioral Neurosciences 32 The Science Behind the Headlines*, 2016.
- [60] Aturki, Z., Schmid, M. G., Chankvetadze, B., Fanali, S. *Electrophoresis* 2014, 35, 3242–3249.
- [61] Hägele, J. S., Schmid, M. G. *Chirality* 2018, 30, 1019–1026.
- [62] Osorio-Olivares, M., Rezende, M. C., Sepúlveda-Boza, S., Cassels, B. K., Baggio, R. F., Muñoz-Acevedo, J. C. *Tetrahedron Asymmetry* 2003, 14, 1473–1477.
- [63] Miller, B., Kim, J., Concheiro, M. *Forensic Sci. Int.* 2017, 274, 13–21.
- [64] Kokiashvili, N. G., Wongwan, S., Landgraf, C., Michaelis, K., Hammitzsch-Wiedemann, M., Scriba, G. K. E. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009, 50, 1050–1053.
- [65] Cason, T. A. D. A. L., Young, R., Glennon, R. A. 1997, 58, 1109–1116.
- [66] Wang, S. M., Wang, T. C., Giang, Y. S. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005, 816, 131–143.
- [67] Kraemer, T., Maurer, H. H. *Ther. Drug Monit.* 2002, 24, 277–289.
- [68] De La Torre, R., Farré, M., Roset, P. N., Pizarro, N., Abanades, S., Segura, M., Segura, J., Camí, J. *Ther. Drug Monit.* 2004, 26, 137–144.
- [69] Schurig, V. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2002, 21, 647–661.
- [70] Ward, T. J., Ward, K. D. *Anal. Chem.* 2010, 82, 4712–4722.
- [71] Beesley, T. E., Scott, R. P. W. *Chiral Chromatography*, Wiley, 1998.
- [72] Chankvetadze, B. *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, Wiley, 1997.
- [73] Alremeithi, R., Meetani, M. A., Alaidaros, A. A., Lanjawi, A., Alsumaiti, K. J. *Anal. Methods Chem.* 2018, 2018.
- [74] Wallenborg, S. R., Lurie, I. S., Arnold, D. W., Bailey, C. G. *Electrophoresis* 2000, 21, 3257–3263.
- [75] D., B. L., Haynie., T. *Chiral drug separation*, Encyclopedia of Chemical Processing, 2006.
- [76] WEIß, J. A., MOHR, S., SCHMID, M. G. *Chirality* 2015, 27, 211–215.
- [77] Leslie, B. Y., Easson, H., Stedman, E. *Biochem. J.* 1933, 27, 1257–1266.
- [78] Davankov, V. A. *Chirality* 1997, 9, 99–102.

- [79] Berthod, A. *Anal. Chem.* 2006, 78, 2093–2099.
- [80] Jiang, C., Tong, M. Y., Breitbach, Z. S., Armstrong, D. W. *Electrophoresis* 2009, 30, 3897–3909.
- [81] Mohr, S., Pilaj, S., Schmid, M. G. *Electrophoresis* 2012, 33, 1624–1630.
- [82] Gübitz, G., Schmid, M. G. *Electrophoresis* 2007, 28, 114–126.
- [83] Fillet, M., Hubert, P., Crommen, J. J. *Chromatogr. A* 2000, 875, 123–134.
- [84] Salvador, A., Varesio, E., Dreux, M., Veuthey, J. L. *Electrophoresis* 1999, 20, 2670–2679.
- [85] Crini, G. *Chem. Rev.* 2014, 114, 10940–10975.
- [86] Duchêne, D., Wouessidjewe, D. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1990, 16, 2487–2499.
- [87] Zhang, X., Zhang, C., Sun, G., Xu, X., Tan, Y., Wu, H., Cao, R., Liu, J., Wu, J. *Instrum. Sci. Technol.* 2012, 40, 194–215.
- [88] Lai, W.-F. *Deliv. Ther. Biogerontological Interv.* 2019, 46, 49–59.
- [89] Bishop, S. C., McCord, B. R., Gratz, S. R., Loeliger, J. R., Witkowski, M. R. *J. Forensic Sci.* 2005, 50, 1–10.
- [90] Janicka, P., Kaykhaii, M., Płotka-Wasyłka, J., Gębicki, J. *Green Chem.* 2022, 24, 5035–5045.
- [91] BURRAI, L., NIEDDU, M., PIRISI, M. A., CARTA, A., BRIGUGLIO, I., BOATTO, G. *Chirality* 2013, 25, 617–621.
- [92] G., C., S., F., É., F., G., T., M., F., Morin-Crini N *Fundamentals and Applications of Cyclodextrins*, Environmental Chemistry for a Sustainable World, 2018.
- [93] Kawamura, M., Uchiyama, T., Kuramoto, T., Tamura, Y., Mizutani, K. *Carbohydr. Res.* 1989, 192, 83–90.
- [94] Kawamura, M., Uchiyama, T. *Carbohydr. Res.* 1994, 260, 297–304.
- [95] Stavrou, I. J., Breitbach, Z. S., Kapnissi-Christodoulou, C. P. *Electrophoresis* 2015, 36, 3061–3068.
- [96] Immel, S., Schmitt, G. E., Lichtenthaler, F. W. *Carbohydr. Res.* 1998, 313, 91–105.
- [97] Sawada, M., Tanaka, T., Takai, Y., Hanafusa, T., Taniguchi, T., Kawamura, M., Uchiyama, T. *Carbohydr. Res.* 1991, 217, 7–17.
- [98] Sun, P., Armstrong, D. W. *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 4904–4918.
- [99] Nicolaou, A. G., Mavroudi, M. C., Stavrou, I. J., Weatherly, C. A., Kapnissi-Christodoulou, C. P. *Electrophoresis* 2019, 40, 539–546.
- [100] Maier, V., Kalíková, K., Příbylka, A., Vozka, J., Smuts, J., Švidrnock, M.,

- Ševčík, J., Armstrong, D. W., Tesařová, E. *J. Chromatogr. A* 2014, 1338, 197–200.
- [101] Reijenga, J. C., Verheggen, T. P. E. M., Chiari, M. *J. Chromatogr. A* 1999, 838, 111–119.
- [102] Kapnissi-Christodoulou, C. P., Stavrou, I. J., Mavroudi, M. C. *J. Chromatogr. A* 2014, 1363, 2–10.
- [103] Tang, S., Liu, S., Guo, Y., Liu, X., Jiang, S. *J. Chromatogr. A* 2014, 1357, 147–157.
- [104] Flieger, J., Feder-Kubis, J., Tatarczak-Michalewska, M. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 1–39.
- [105] Stavrou, I. J., Kapnissi-Christodoulou, C. P. *Electrophoresis* 2013, 34, 524–530.
- [106] Greño, M., Marina, M. L., Castro-Puyana, M. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2018, 48, 429–446.
- [107] Bwambok, D. K., Challa, S. K., Lowry, M., Warner, I. M. *Anal. Chem.* 2010, 82, 5028–5037.
- [108] DAVID K. BWAMBOK, HADI M. MARWANI, VIVIAN E. FERNAND, SAYO O. FAKAYODE, M. L., IOAN NEGULESCU, ROBERT M. STRONGIN, I. M. W. *Chirality* 2008, 20, 151–158.
- [109] Berthod, A., Ruiz-Ángel, M. J., Carda-Broch, S. *J. Chromatogr. A* 2008, 1184, 6–18.
- [110] Berthod, A., Ruiz-Ángel, M. J., Carda-Broch, S. *J. Chromatogr. A* 2018, 1559, 2–16.
- [111] Nie, L., Yohannes, A., Yao, S. *J. Chromatogr. A* 2020, 1626, 461384.
- [112] Greño, M., Marina, M. L., Castro-Puyana, M. *J. Chromatogr. A* 2018, 1568, 222–228.
- [113] Salido-Fortuna, S., Greño, M., Castro-Puyana, M., Marina, M. L. *J. Chromatogr. A* 2019, 1607.
- [114] Zhang, Q., Zhang, J., Xue, S., Rui, M., Gao, B., Li, A., Bai, J., Yin, Z., Anochie, E. M. *J. Sep. Sci.* 2018, 41, 4525–4532.
- [115] Christou, A., Stavrou, I. J., Kapnissi-Christodoulou, C. P. *Electrophoresis* 2021, 42, 1945–1955.
- [116] García-Cansino, L., Marina, M. L., García, M. Á. *Microchem. J.* 2021, 171.
- [117] Stalcup, A. M., Cabovska, B. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2004, 27, 1443–1459.

- [118] Deng, S., Pan, J., Wang, M., Huang, Y., Xia, Z. *Talanta* 2020, 220, 121419.
- [119] Moufawad, T., Moura, L., Ferreira, M., Bricout, H., Tilloy, S., Monflier, E., Costa Gomes, M., Landy, D., Fourmentin, S. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2019, 7, 6345–6351.
- [120] Delgado-Mellado, N., Larriba, M., Navarro, P., Rigual, V., Ayuso, M., García, J., Rodríguez, F. *J. Mol. Liq.* 2018, 260, 37–43.
- [121] Tomé, L. I. N., Baião, V., da Silva, W., Brett, C. M. A. *Appl. Mater. Today* 2018, 10, 30–50.
- [122] Alshitari, W., Abd El-Hady, D. *Chromatographia* 2021, 84, 1151–1162.
- [123] Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., Jérôme, F. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 7108–7146.
- [124] Smith, E. L., Abbott, A. P., S., K. R. *Chem. Rev.* 2014, 114, 11060–11082.
- [125] Shekaari, H., Zafarani-Moattar, M. T., Shayanfar, A., Mokhtarpour, M. *J. Mol. Liq.* 2018, 249, 1222–1235.
- [126] Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., Tambyrajah, V. *Chem. Commun.* 2003, 70–71.
- [127] Tang, B., Row, K. H. *Monatshefte fur Chemie* 2013, 144, 1427–1454.
- [128] Reinhardt, D., Ilgen, F., Kralisch, D., König, B., Kreisel, G. *Green Chem.* 2008, 10, 1170–1181.
- [129] García, G., Aparicio, S., Ullah, R., Atilhan, M. *Energy and Fuels* 2015, 29, 2616–2644.
- [130] Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2014, 2, 1063–1071.
- [131] Aroso, I. M., Craveiro, R., Rocha, Â., Dionísio, M., Barreiros, S., Reis, R. L., Paiva, A., Duarte, A. R. C. *Int. J. Pharm.* 2015, 492, 73–79.
- [132] Sportiello, L., Favati, F., Condelli, N., Di Cairano, M., Caruso, M. C., Simonato, B., Tolve, R., Galgano, F. *Food Chem.* 2023, 405, 134703.
- [133] Marchel, M., Rayaroth, M. P., Wang, C., Kong, L., Khan, J. A., Boczkaj, G. *Chem. Eng. J.* 2023, 144971.
- [134] El Achkar, T., Moufawad, T., Ruellan, S., Landy, D., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S. *Chem. Commun.* 2020, 56, 3385–3388.
- [135] Panda, S., Fourmentin, S. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2022, 29, 264–270.
- [136] El Achkar, T., Moura, L., Moufawad, T., Ruellan, S., Panda, S., Longuemart, S., Legrand, F. X., Costa Gomes, M., Landy, D., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S.

- Int. J. Pharm.* 2020, 584, 119443.
- [137] Fourmentin, S. 2020, 119443.
- [138] Salido-Fortuna, S., Casado, N., Castro-Puyana, M., Marina, M. L. *Microchem. J.* 2021, 160, 105669.
- [139] Ángeles García, M., Jiménez-Jiménez, S., Marina, M. L. *J. Chromatogr. A* 2022, 1673.
- [140] Mu, Y., Wu, X., Huang, Y. P., Liu, Z. S. *Electrophoresis* 2019, 40, 1992–1995.
- [141] Weiß, J. A., Taschwer, M., Kunert, O., Schmid, M. G. *J. Sep. Sci.* 2015, 38, 825–828.
- [142] Merola, G., Fu, H., Tagliaro, F., Macchia, T., Mccord, B. R. *Electrophoresis* 2014, 35, 3231–3241.
- [143] Li, L., Lurie, I. S. *Forensic Sci. Int.* 2015, 254, 148–157.
- [144] Taschwer, M., Hofer, M. G., Schmid, M. G. *Electrophoresis* 2014, 35, 2793–2799.
- [145] Nowak, P. M., Olesek, K., Woźniakiewicz, M., Kościelniak, P. *Electrophoresis* 2018, 39, 2406–2409.
- [146] Fejős, I., Varga, E., Benkovics, G., Malanga, M., Sohajda, T., Szemán, J., Béni, S. *Electrophoresis* 2017, 38, 1869–1877.
- [147] Lee, W. S., Chan, M. F., Tam, W. M., Hung, M. Y. *Forensic Sci. Int.* 2007, 165, 71–77.
- [148] Wu, H., Yuan, B., Liu, Y. M. *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 3118–3123.
- [149] Xie, H. Y., He, Y. Z. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2010, 29, 629–635.
- [150] Lurie, I. S., Odeneal, N. G., McKibben, T. D., Casale, J. F. *Electrophoresis* 1998, 19, 2918–2925.
- [151] Synthesis, A. 2011, 43, 34–43.
- [152] Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. *Principles of instrumental analysis*, 6th ed., Saunder College, 1998.
- [153] Frenz, J., Hancock, W. S. *Trends Biotechnol* 1991, 9, 243–250.
- [154] Nicolaou, I. N., Kapnissi-christodoulou, C. P. *J. Chromatogr. Sci.* 2011, 49, 265–271.
- [155] Juvancz, Z., Kendrovics, R. B., Iványi, R., Szente, L. *Electrophoresis* 2008, 29, 1701–1712.
- [156] Issaq, H. J. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2002, 25, 1153–1170.
- [157] Spisso, A., Gomez, F. J. V., Fernanda Silva, M. *Electrophoresis* 2018, 39, 1621–

- 1627.
- [158] Holland, L. A., Chetwyn, N. P., Perkins, M. D., Lunte, S. M. *Pharm. Res.* 1997, *14*.
- [159] Landers, J. P. *Handbook of capillary electrophoresis*, 1996.
- [160] Heiger, D. N. *High performance capillary electrophoresis: an introduction : a primer*, Agilent Technologies, 2000.
- [161] Josefsson, L. *Bioanalytical separation using capillary electrophoresis Applications with microbubbles and proteins*, 2017.
- [162] Terabe, S. *Annu. Rev. Anal. Chem* 2009, *2*, 99–120.
- [163] Terabe, S. 2008, *8*, 291–301.
- [164] Chi, L., Li, Z., Dong, S. 2009, 179–185.
- [165] Guillaume, Y. C., Peyrin, E., Pharmacie, D., Saint-jacques, P. *Anal. Chem* 1999, *71*, 2046–2052.
- [166] Parmar, V., Patel, G., Abu-thabit, N. Y. *Responsive cyclodextrins as polymeric carriers for drug delivery applications*, Elsevier Ltd., 2018.
- [167] Amini, A., Beijersten, I., Pettersson, C., Westerlund, D. Enantiomeric separation of local anaesthetic drugs by micellar electrokinetic capillary chromatography with taurodeoxycholate as chiral selector. *J. Chromatogr. A* 1996, *737*, 301–313.
- [168] Stauffer, M. *Calibration and Validation of Analytical Methods A Sampling of Current Approaches*, Vol.55., IntechOpen, 2018.
- [169] Peng Li, Shao Ping Li, Y. T. W. *Electrophoresis* 2006, *27*, 4808–4819.
- [170] Jozef L. Beckers, P. B. *Electrophoresis* 2003, *24*, 518–535.
- [171] Zhang, Q. F., Li, S. C., Lai, W. P., Cheung, H. Y. *Food Chem.* 2009, *113*, 684–691.
- [172] Hägele, J. S., Hubner, E. M., Schmid, M. G. *Chirality* 2020, *32*, 1191–1207.
- [173] Armstrong, G. H. and D. W. In *Chiral Separations: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1985.
- [174] Armstrong, D. W., Nair, U. B. *Electrophoresis* 1997, *18*, 2331–2342.
- [175] Valls, J., Millán, S., Martí, M. P., Borràs, E., Arola, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *J. Chromatogr. A* 2009, *1216*, 7143–7172.
- [176] Wang, S.-P., Huang, K.-J. *J. Chromatogr. A* 2004, *1032*, 273–279.
- [177] Řezanková, K., Kohoutová, R., Kuchař, M., Král, V., Řezanka, P. *Chem. Pap.* 2018, *72*, 2737–2743.

- [178] CHRISTOFOROS A. HADJISTASI, 1 IOANNIS J. STAVROU, 1 RALUCA-IOANA STEFAN-VAN STADEN, 2 HASSAN Y. ABOUL-ENEIN, 3, AND, KAPNISSI-CHRISTODOULOU¹, C. P. *Chirality* 2013, 25, 556–560.
- [179] Ma, X., Du, Y., Sun, X., Liu, J., Huang, Z. *J. Chromatogr. A* 2019, 1601, 340–349.
- [180] Pinto, D., Vieira, E. F., Peixoto, A. F., Freire, C., Freitas, V., Costa, P., Delerue-Matos, C., Rodrigues, F. *Food Chem.* 2021, 334, 127521.
- [181] Christou, A., Stavrou, I. J., Kapnissi-Christodoulou, C. P. *Ultrason. Sonochem.* 2021, 76, 105630.
- [182] Shafie, M. H., Yusof, R., Gan, C. Y. *J. Mol. Liq.* 2019, 288.
- [183] Mather, G. G., Labroo, R., Le Guern, M. E., Lepage, F., Gillardin, J. M., Levy, R. H. *Chirality* 2000, 12, 153–159.
- [184] Yanes, E. G., Gratz, S. R., Sutton, R. M. C., Stalcup, A. M. *Anal. Bioanal. Chem.* 2001, 369, 412–417.
- [185] Zhang, Q., Du, Y., Chen, J., Xu, G., Yu, T., Hua, X., Zhang, J. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, 406, 1557–1566.
- [186] Yang, F., Du, Y., Chen, B., Fan, Q., Xu, G. *Chromatographia* 2010, 72, 489–493.