



ΕΑΠ

Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία

«Αναλυτικές τεχνικές για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση  
εναντιομερών δραστικών ουσιών σε σκευάσματα»

Καλλιόπη Λεβισιάνου

Επιβλέπων καθηγητής: Χρήστος Κοντογιάννης

Πάτρα, Ιούλιος 2024



«Αναλυτικές τεχνικές για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση  
εναντιομερών δραστικών ουσιών σε σκευάσματα»

Καλλιόπη Λεβισιάνου

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Χρήστος Κοντογιάννης

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Ευάγγελος Μπακέας

Πάτρα, Ιούλιος 2024

## Περίληψη

Σκοπός της εργασίας είναι μια βιβλιογραφική ανασκόπηση των αναλυτικών τεχνικών για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση εναντιομερών δραστικών ουσιών σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Αρχικά, γίνεται μια εκτενής αναφορά στα εναντιομερή: επεξηγείται ο όρος στερεογονικό κέντρο και εναντιομέρεια, αναφέρεται με ποιο τρόπο ονομάζονται οι απεικονίσεις τους, η οπτική στροφή και οι διαφορές στις φαρμακολογικές δράσεις τους, όπου είναι δυνατό: το ένα μόνο εναντιομερές να παρουσιάζει φαρμακολογική δράση και το άλλο είτε να είναι πρόσμιξη, είτε να μην έχει φαρμακολογική δράση, είτε να είναι τοξικό, τα δυο εναντιομερή να έχουν σχεδόν την ίδια φαρμακολογική δράση και περίπου στον ίδιο βαθμό, τα δυο εναντιομερή να έχουν παρόμοια φαρμακολογική δράση, αλλά να διαφέρουν στην δραστικότητά τους ή ακόμη και να έχουν εντελώς διαφορετικές φαρμακολογικές δράσεις. Έτσι, αναφέροντας και το αξιοσημείωτο παράδειγμα της θαλιδομίδης, τονίζεται η σημασία του διαχωρισμού των εναντιομερών όταν πρόκειται για φάρμακα.

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται οι δυο μεγάλες οικογένειες αναλυτικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση εναντιομερών: η χρωματογραφία και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση. Όσον αφορά τη χρωματογραφία, αποκρυσταλλώνονται οι όροι στατική και κινητή φάση και αναφέρονται τα είδη της χρωματογραφίας, ανάλογα με το είδος της κινητής φάσης (υγρή, αέρια ή υπερκρίσιμου υγρού) και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας που έχει διαφορετική στατική φάση από τις άλλες τρεις. Σε κάθε είδος συζητείται η βασική αρχή, η οργανολογία και οι μέθοδοι διαχωρισμού των εναντιομερών που έχουν χρησιμοποιηθεί στην καθεμία. Παρομοίως, αναλύεται και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση. Απαριθμούνται τα είδη της: τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης, ισοταχοφόρηση, ισοηλεκτρική εστίαση, τριχοειδής ηλεκτροφόρηση πηκτής, ηλεκτροκινητική χρωματογραφία και ηλεκτροχρωματογραφία. Έπειτα, γίνεται εμβάθυνση στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζώνης και στην ηλεκτροκινητική χρωματογραφία, οι οποίες χρησιμοποιούνται για διαχωρισμό εναντιομερών με τον ίδιο τρόπο με τη χρωματογραφία. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε συλλογή δημοσιεύσεων που αφορούσαν ανάπτυξη μεθόδων διαχωρισμού εναντιομερών και σχολιάστηκαν τα αποτελέσματα.

**Λέξεις – Κλειδιά:** εναντιομερή, διαχωρισμός, χρωματογραφία, τριχοειδής ηλεκτροφόρηση

## **Abstract**

The purpose of the work is a literature review of analytical techniques for the identification and quantification of enantiomeric active substances in pharmaceutical preparations. First, an extensive reference is made to enantiomers: the term stereogenic center and enantiomerism are explained, how their representations are named, optical rotation and the differences in their pharmacological actions, where possible: only one enantiomer has a pharmacological action and the other either be an impurity, or have no pharmacological action, or be toxic, the two enantiomers have almost the same pharmacological action and to about the same degree, the two enantiomers have similar pharmacological action, but differ in their activity or even have completely different pharmacological actions. Thus, bringing the remarkable example of thalidomide, the importance of the separation of enantiomers when it comes to drugs is emphasized.

Next, the two major families of analytical techniques used for the identification and quantification of enantiomers are presented: chromatography and capillary electrophoresis. Regarding chromatography, the terms stationary and mobile phase are crystallized and the types of chromatography are mentioned according to the type of mobile phase (liquid, gas or supercritical fluid) and thin layer chromatography which has a different stationary phase from the other three. In each species the basic principle, instrumentation and enantiomer separation methods that have been used in each are discussed. Similarly, capillary electrophoresis is analyzed. Its types are listed: capillary zone electrophoresis, isotachophoresis, isoelectric focusing, capillary gel electrophoresis, electrokinetic chromatography, and electrochromatography. Then, capillary zone electrophoresis and electrokinetic chromatography are presented in detail, which are used to separate enantiomers in the same way as chromatography. At the same time, publications related to the development of enantiomer separation methods were collected and the results were discussed.

**Keywords:** enantiomers, separation, chromatography, capillary electrophoresis

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	iii
Abstract .....	iv
Περιεχόμενα .....	v
Κατάλογος Εικόνων / Διαγραμμάτων.....	vi
Κατάλογος Πινάκων.....	viii
Συνοπτομογραφίες & Ακρωνύμια.....	ix
1. Εναντιομερή.....	1
1.1 Εναντιομέρεια στις οργανικές ενώσεις.....	1
1.2 Απεικονίσεις των εναντιομερών.....	2
1.3 Φυσικές και βιολογικές δράσεις των εναντιομερών.....	5
2. Τεχνικές διαχωρισμού εναντιομερών .....	13
2.1. Χρωματογραφία .....	13
2.1.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης .....	14
2.1.2 Αέρια χρωματογραφία.....	31
2.1.3 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.....	38
2.1.4 Χρωματογραφία υπερκρίσιμου υγρού.....	57
2.2 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση .....	62
2.2.1 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης .....	64
2.2.2 Ηλεκτροκινητική χρωματογραφία .....	79
3. Αποτελέσματα-Συμπεράσματα .....	90
Βιβλιογραφία .....	95

## Κατάλογος Εικόνων / Διαγραμμάτων

<b>Εικόνα 1-1:</b> Σχηματική απεικόνιση της έννοιας του εναντιομερούς.....	1
<b>Εικόνα 1-2:</b> Σχηματική απεικόνιση σειράς προτεραιότητας κατά Cahn-Ingold-Prelog (τροποποιημένο) .....	2
<b>Εικόνα 1-3:</b> Σχηματική απεικόνιση πολωσιμέτρου.....	3
<b>Εικόνα 1-4:</b> (+)- (αριστερά) και (-)- (δεξιά) καρβόνι (τροποποιημένο).....	5
<b>Εικόνα 1-5:</b> Εναντιομερή της ντοπαμίνης.....	5
<b>Εικόνα 1-6:</b> Τα εναντιομερή της προμεθαζίνης.....	6
<b>Εικόνα 1-7:</b> Τα δυο εναντιομερή της βαρφαρίνης.....	7
<b>Εικόνα 1-8:</b> Τα δυο ισομερή της ουπερζίνης.....	7
<b>Εικόνα 1-9:</b> Δομή της πενικιλίνης V.....	8
<b>Εικόνα 1-10:</b> S- και R- ιβουπροφένη.....	9
<b>Εικόνα 1-11:</b> Η ρακέμωση των εναντιομερών της θαλομίδης.....	10
<b>Εικόνα 2-1:</b> Αρχή της HPLC κανονικής φάσης.....	15
<b>Εικόνα 2-2:</b> Αρχή της HPLC αντίστροφης φάσης.....	16
<b>Εικόνα 2-3:</b> Εργαστηριακή διάταξη HPLC.....	18
<b>Εικόνα 2-4:</b> Η δομή των 5 εναντιομερών που μελέτησαν οι Jibuti et al.....	23
<b>Εικόνα 2-5:</b> Η δομή της θυροξίνης.....	26
<b>Εικόνα 2-6:</b> Εργαστηριακή διάταξη αέριας χρωματογραφίας.....	31
<b>Εικόνα 2-7:</b> Τριχοειδής στήλη.....	33
<b>Εικόνα 2-8:</b> Διαδικασία δοκιμής διαλυτών ανάπτυξης.....	44
<b>Εικόνα 2-9:</b> Αντίδραση παραγωγοποίησης της ατενολόλης και της προπρανολόλης με S-ναπροξένη.....	49
<b>Εικόνα 2-10:</b> Δομή της S-βεραπιμίλης.....	52
<b>Εικόνα 2-11:</b> Δομή της βανκομυκίνης.....	54
<b>Εικόνα 2-12:</b> Χρωματογράφημα TLC διαχωρισμού των εναντιομερών της βεραπιμίλης.....	55
<b>Εικόνα 2-13:</b> Σχηματική αναπαράσταση της αρχής της SFC.....	59
<b>Εικόνα 2-14:</b> Οργανολογία χρωματογραφία υπερκρίσιμου υγρού.....	61
<b>Εικόνα 2-15:</b> Αρχή της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης.....	64
<b>Εικόνα 2-16:</b> Δομή της ριβαστιγμίνης.....	71
<b>Εικόνα 2-17:</b> Δομή της κεφοταξίμης.....	76

<b>Εικόνα 2-18:</b> Δομή της κολχικίνης.....	81
<b>Εικόνα 2-19:</b> Δομή της βουπροπιόνης.....	86
<b>Διάγραμμα 2-1:</b> Αντιστροφή σειράς έκλουσης εναντιομερών για την αμλοδιπίνη με προσθήκη φορμικού οξέος.....	25
<b>Διάγραμμα 2-2:</b> Χρωματογράφημα που δείχνει το διαχωρισμό των δυο εναντιομερών της θυροξίνης.....	28
<b>Διάγραμμα 2-3:</b> Χρωματογράφημα της ανάλυσης και του διαχωρισμού των εναντιομερών της προμεθαζίνης με ακετυλο-σαλικυλικό οξύ ως εσωτερικό πρότυπο.....	30
<b>Διάγραμμα 2-4:</b> Χρωματογράφημα που λήφθηκε με αρχική θερμοκρασία στους 145°C και είχε άνοδο 1.2 °C/min μέχρι τους 215°C και πίεση 83 kPa.....	37
<b>Διάγραμμα 2-5:</b> Ηλεκτροφερόγραμμα διαχωρισμού των εναντιομερών της αμλοπιδίνης.....	68
<b>Διάγραμμα 2-6:</b> Φάσματα UV των εναντιομερών της αμλοπιδίνης σε πρότυπο διάλυμα (αριστερά) και σε φαρμακευτικό δείγμα δεξιά αμλοπιδίνης (δεξιά).....	69
<b>Διάγραμμα 2-7:</b> Ηλεκτροφερόγραμμα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/ τριαιθυλαμίνης (Α) και φωσφορικών/ τρις(υδροξυμεθύλ) αμινομεθανίου.....	74
<b>Διάγραμμα 2-8:</b> Ηλεκτροφερόγραμμα του προσδιορισμού της S-ριβαστιγμίνης σε φαρμακευτικό σκεύασμα.....	76
<b>Διάγραμμα 2-9:</b> Ηλεκτροφερόγραμμα του διαχωρισμού των εναντιομερών της κεφοταξίμης με CM-b-CD ως χειρόμορφο επιλογή.....	78
<b>Διάγραμμα 2-10:</b> Ηλεκτροφερογράφημα του διαχωρισμού των εναντιομερών της κολχικίνης με διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες.....	83
<b>Διάγραμμα 2-11:</b> Διαχωρισμός των εναντιομερών της βουπροπιόνης σε φαρμακευτικά σκευάσματα.....	89
<b>Διάγραμμα 3.1:</b> Διάγραμμα ροής με προτεινόμενους χειρισμούς ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του δείγματος.....	93
<b>Διάγραμμα 3.2:</b> Διάγραμμα ροής με προτεινόμενους χειρισμούς για την περίπτωση που το δείγμα δεν είναι σε μορφή δισκίου. ....	94

## Κατάλογος Πινάκων

<b>Πίνακας 1-1:</b> Εναντιομερή φάρμακα και η φαρμακολογική δράση κάθε εναντιομερούς.....	11
<b>Πίνακας 2-1:</b> Χρωματογραφικοί διαχωρισμοί με χρωματογραφία ανταλλαγής υποκαταστατών με την προσέγγιση Davankon.....	20
<b>Πίνακας 1-2:</b> Χρωματογραφικοί διαχωρισμοί με δυναμική χρωματογραφία ανταλλαγής υποκαταστατών.....	21
<b>Πίνακας 2-3:</b> Αποτελέσματα της της ακρίβειας της μεθόδου όσον αφορά την αποκλίση από την πραγματική τιμή (accuracy), αλλά και τη ακρίβεια όσον αφορά τις αποκλισεις μεταξύ των μετρήσεων του ίδιου δείγματος.....	29
<b>Πίνακας 2-4:</b> Ταξινόμηση των οργανικών ουσιών με βάση την πολικότητά τους.....	41
<b>Πίνακας 2-5:</b> Κατάταξη των συχνά χρησιμοποιούμενων διαλυτών εμφάνισης με αύξουσα πολικότητα.....	42
<b>Πίνακας 2-6:</b> Αποτελέσματα βελτιστοποίησης της μεθόδου.....	67
<b>Πίνακας 2-7:</b> Πειραματικά δεδομένα για τα διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα αμλοπιδίνης.....	70
<b>Πίνακας 2-8:</b> Δεδομένα της επικύρωσης της μεθόδου.....	90
<b>Πίνακας 2.1:</b> Πίνακας των δημοσιεύσεων που αναλύθηκαν για την κάθε τεχνική.....	91



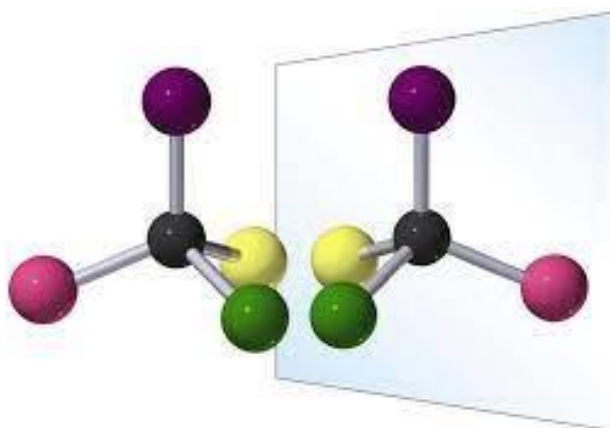
## **Συντομογραφίες & Ακρωνύμια**

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
GC	Gas Chromatography
TLC	Thin Layer Chromatography
SFC	Supercritical fluid chromatography
CZE	Capillary Zone Electrophoresis,
ITP	Isotachophoresis
CGE	Capillary Gel Electrophoresis
EKC	Electrokinetic Chromatography
CD	Cyclodextrine

## 1. Εναντιομερή

### Εναντιομέρεια στις οργανικές ενώσεις

Το φαινόμενο της εναντιομέρειας έχει τη βάση του στο γεγονός ότι ένα άτομο άνθρακα μπορεί να σχηματίσει 4 δεσμούς, οι οποίοι σχηματίζουν ένα τετράεδρο. Έτσι αν ένα άτομο άνθρακα συνδεθεί με 4 διαφορετικούς υποκαταστάτες, το είδωλό του δε θα ταυτίζεται με αυτό, αλλά θα έχουν τη σχέση που έχουν το δεξί και το αριστερό χέρι, παρουσιάζουν δηλαδή χειρομορφία (Εικόνα 1-1). Οι δυο αυτές ενώσεις ονομάζονται εναντιομερή και ο άνθρακας με τον οποίο συνδέονται οι υποκαταστάτες ονομάζεται στερεογονικό κέντρο (McMurry, 2009).



Εικόνα 1-1: Σχηματική απεικόνιση της έννοιας του εναντιομερούς

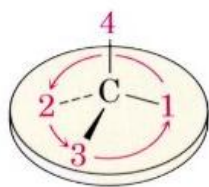
Η σύνθεση μιας χειρόμορφης ουσίας δίνει ένα μίγμα των εναντιομερών σε ισομοριακή αναλογία, το οποίο καλείται ρακεμικό. Το μίγμα αυτό δεν έχει την ιδιότητα να στρέφει το πολωμένο φως, ιδιότητα που έχουν τα δυο εναντιομερή που το απαρτίζουν. Συμβολίζεται είτε με το σύμβολο ( $\pm$ ), είτε με το πρόθεμα D-/L-, που υποδηλώνουν μίγμα δεξιόστροφης και αριστερόστροφης μορφής της ένωσης (McMurry, 2009).

## Απεικονίσεις των εναντιομερών

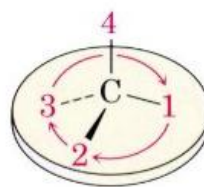
Έτσι λοιπόν, κάθε χειρόμορφη ένωση έχει δυο εναντιομερή, τα οποία για να διαχωρίζονται ονομάζονται R- ή S- ισομερές ανάλογα με τον προσανατολισμό των υποκαταστατών. Ο προσανατολισμός τους βρίσκεται αποδίδοντας προτεραιότητα στους υποκαταστάτες, ανάλογα με τους κανόνες Cahn-Ingold-Prelog:

1. Το άτομο που συνδέεται με το στερεογονικό κέντρο με το μεγαλύτερο ατομικό αριθμό έχει τη μεγαλύτερη προτεραιότητα (1), το δεύτερο σε ατομικό βάρος τον αριθμό (2) και τελευταίο το μικρότερο σε ατομικό βάρος, το οποίο πολλές φορές είναι το H.
2. Αν δεν είναι δυνατό να αποδοθεί προτεραιότητα μεταξύ των ατόμων που συνδέονται αμέσως με τον άνθρακα, τότε συγκρίνονται τα αμέσως επόμενα.
3. Αν πάλι δεν είναι δυνατό να αποδοθεί προτεραιότητα και πάλι, συγκρίνονται τα επόμενα άτομα και ούτω καθ' εξής, μέχρι να βρεθούν οι κατάλληλοι υποκαταστάτες

Η R-απεικόνιση αποδίδεται όταν η σειρά των υποκαταστατών 1,2 και 3 είναι αντίστροφη με τη φορά των δεικτών του ρολογιού, υπό την προϋπόθεση ότι ο τέταρτος υποκαταστάτης (συνήθως υδρογόνο) τοποθετείται στην κάθετη κορυφή του τετραέδρου, ενώ αν συμπίπτει αποδίδεται η απεικόνιση S- (Εικόνα 1-2) (McMurry, 2009).



1. Απεικόνιση R



2. Απεικόνιση S

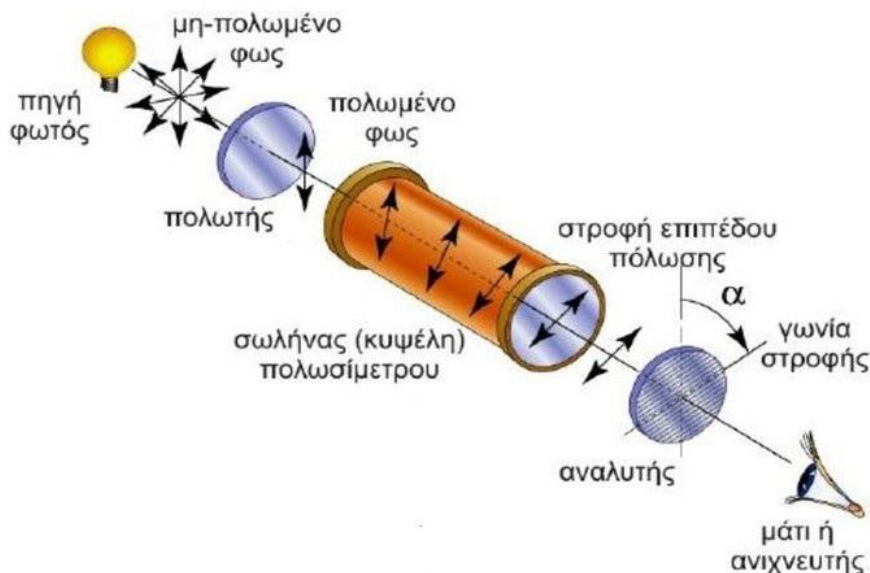
Εικόνα 1-2: Σχηματική απεικόνιση σειράς προτεραιότητας κατά Cahn-Ingold-Prelog (τροποποιημένο) (McMurry, 2009)

Όπως, προειπώθηκε, τα εναντιομερή μιας ένωσης στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός, η μια αριστερόστροφα (-) και η άλλη δεξιόστροφα (+), αλλά η απόλυτη τιμή της στροφής είναι η ίδια. Σημαντικό είναι ότι οι απεικονίσεις + ή - δε συνδέονται με τις απεικονίσεις R και S, καθώς μια απεικόνιση R μπορεί να είναι αριστερόστροφη ή το αντίστροφο.

Η ανακάλυψη αυτή έγινε από τον Biot τον 19<sup>ο</sup> αιώνα, ο οποίος μελετούσε τη φύση του πολωμένου, στο επίπεδο, φωτός. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων του παρατήρησε ότι αν μια δέσμη πολωμένου φωτός διέλθει από τα διαλύματα ορισμένων οργανικών ενώσεων, όπως η καμφορά, τότε το επίπεδο του πολωμένου φωτός στρέφεται (McMurry, 2009).

Το μέγεθος της στροφής του επιπέδου του πολωμένου φωτός μπορεί να μετρηθεί με ειδικό όργανο, το οποίο ονομάζεται πολωσίμετρο (Εικόνα 1-3). Οι παράμετροι από τις οποίες εξαρτάται είναι:

- η συγκέντρωση της ουσίας
- το μήκος της κυψέλης του δείγματος.



Εικόνα 1-3: Σχηματική απεικόνιση πολωσιμέτρου

Συγγενές μέγεθος είναι και η ειδική στροφή  $[\alpha]_D$ , η οποία είναι η στροφή που παρατηρείται όταν το μήκος κύματος του φωτός είναι 589 nm, το μήκος της κυψελίδας του δείγματος είναι 1 dm και η συγκέντρωση του δείγματος είναι 1 g/mL. Σε αυτές τις συνθήκες, η ειδική στροφή είναι πλέον φυσική σταθερά και συνδέεται με την παρατηρούμενη στροφή με τον εξής τύπο:

$$[\alpha]_D = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$

όπου:  $[\alpha]_D$  = ειδική στροφή

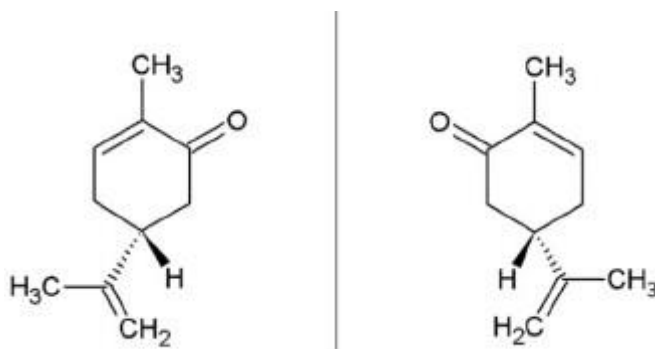
$\alpha$  = η μετρούμενη στροφή

$l$  = το μήκος της κυψελίδας του δείγματος

$c$  = η συγκέντρωση του δείγματος (McMurry, 2009).

## Φυσικές και βιολογικές δράσεις των εναντιομερών

Αξιοσημείωτο είναι ότι τα δυο εναντιομερή μιας ένωσης εμφανίζουν διαφορετικές φυσικές ιδιότητες. Εδώ μπορεί να αναφερθεί η καρβόνη, η οποία ανήκει στα τερπένια και είναι μια από τις ουσίες που εξετάζονται για πιθανές χρήσεις σε τομείς όπως η φαρμακευτική. Το ένα εναντιομερές της καρβόνης, η (+)-καρβόνη βρίσκεται στους σπόρους του αγριοκύμινου και είναι υπεύθυνη για την οσμή του, ενώ η (-)-καρβόνη βρίσκεται στο δυόσμο και δίνει την χαρακτηριστική οσμή του (Εικόνα 1-4) (McMurry, 2009).



Εικόνα 1-4: (+)- (αριστερά) και (-)- (δεξιά) καρβόνη (τροποποιημένο)

([https://www.researchgate.net/figure/The-two-enantiomers-of-a-carvone-1\\_fig2\\_273134789](https://www.researchgate.net/figure/The-two-enantiomers-of-a-carvone-1_fig2_273134789))

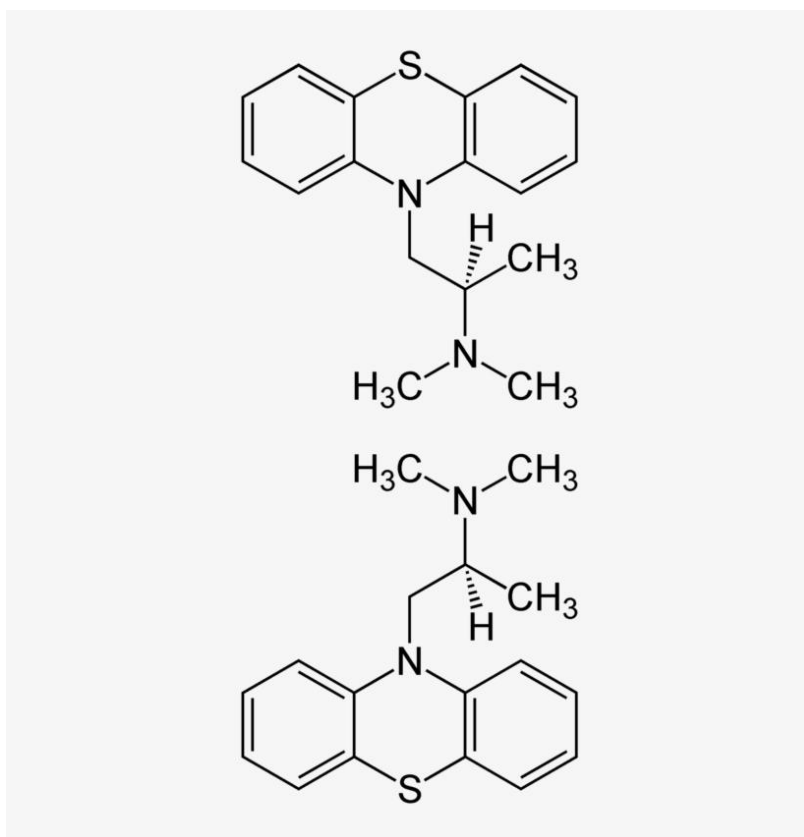
Ωστόσο, μπορεί να μη διαφέρουν μόνο οι φυσικές ιδιότητές τους, αλλά και οι βιολογικές. Μπορεί το ένα εναντιομερές να παρουσιάζει βιολογική δράση και το άλλο όχι ή να είναι και τοξικό για τον οργανισμό. Παραδείγματος χάριν, η ντοπαμίνη περιέχει άνθρακα ως στερεογονικό κέντρο, άρα έχει 2 εναντιομερή. Από αυτά, το αριστερόστροφο L-εναντιομερές χρησιμοποιείται ως φάρμακο για την νόσο του Parkinson, μια χρόνια πάθηση που επηρεάζει το ΚΝΣ (κεντρικό νευρικό σύστημα), ενώ το δεξιόστροφο D- είναι τοξικό για τα νευρικά κύτταρα (Εικόνα 1-5) (Wang et al., 2009).



Εικόνα 1-5: Εναντιομερή της ντοπαμίνης ([https://www.researchgate.net/figure/L-DOPA-and-D-DOPA-enantiomers-showing-distinct-physiological-effects-to-humans\\_fig1\\_338826352](https://www.researchgate.net/figure/L-DOPA-and-D-DOPA-enantiomers-showing-distinct-physiological-effects-to-humans_fig1_338826352))

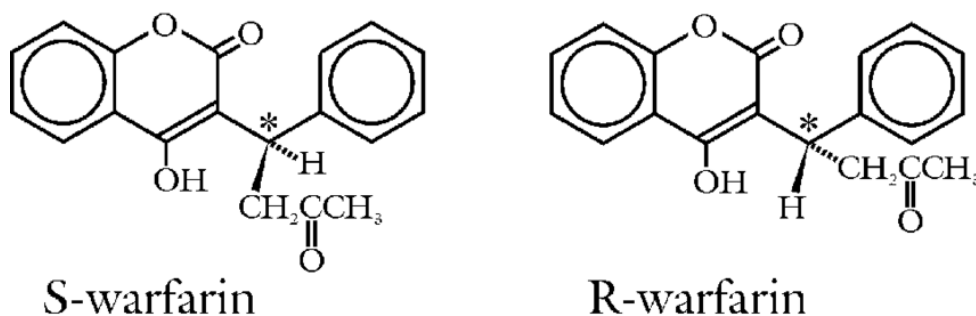
Ένα ακόμη παράδειγμα αποτελεί η προποξυφαίνη, της οποίας τα εναντιομερή διατίθενται ξεχωριστά, καθώς το ένα εναντιομερές, η δεξτροπροποξυφαίνη, είναι αναλγητικό και έχει την ονομασία Darvon, ενώ το άλλο εναντιομερές, η λεβοπροποξυφαίνη είναι αντιβηχικό και ονομάζεται Novrad. Παρατηρείται ότι οι ονομασίες των δυο φαρμάκων είναι και αυτές κατοπτρικά είδωλα (DARVON-NOVRAD) (Drayer, 1986).

Υπάρχουν άλλες περιπτώσεις, όπου τα δυο εναντιομερή έχουν ίδια φαρμακολογική δράση, όπως η προμεθαζίνη. Η προμεθαζίνη είναι ένα αντισταμινικό που χορηγείται για τα συμπτώματα της αλλεργίας, αλλά και για τη ναυτία, τον εμετό και ως ηρεμιστικό. Δρα ως παρεμποδιστής του υποδοχέα H1. Διατίθεται ως ρακεμικό μίγμα (Εικόνα 1-6) (Wang et al., 2009).



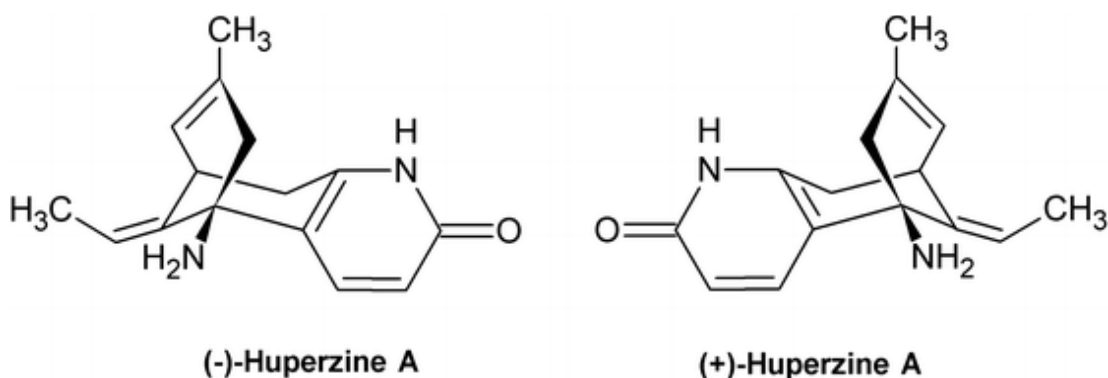
Εικόνα 1-6: Τα εναντιομερή της προμεθαζίνης ([https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-promethazine-enantiomers-and-trimeprazine-enantiomers\\_fig1\\_234169593](https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-promethazine-enantiomers-and-trimeprazine-enantiomers_fig1_234169593))

Τέλος, συμβαίνει τα δυο εναντιομερή να έχουν την ίδια δράση, αλλά διαφορετική δραστηριότητα. Χαρακτηριστική είναι η βαρφαρίνη, η οποία χορηγείται ως αντιπηκτικό, όπου το S- εναντιομερές είναι περίπου 5 φορές πιο δραστικό από το R- εναντιομερές (Εικόνα 1-7) (Hou et al., 2007).



Εικόνα 1-7: Τα δυο εναντιομερή της βαρφαρίνης ( [https://www.researchgate.net/figure/Warfarin-R-and-S-enantiomers-The-asterisks-denote-the-chiral-centre-of-each-molecule\\_fig2\\_242623402](https://www.researchgate.net/figure/Warfarin-R-and-S-enantiomers-The-asterisks-denote-the-chiral-centre-of-each-molecule_fig2_242623402))

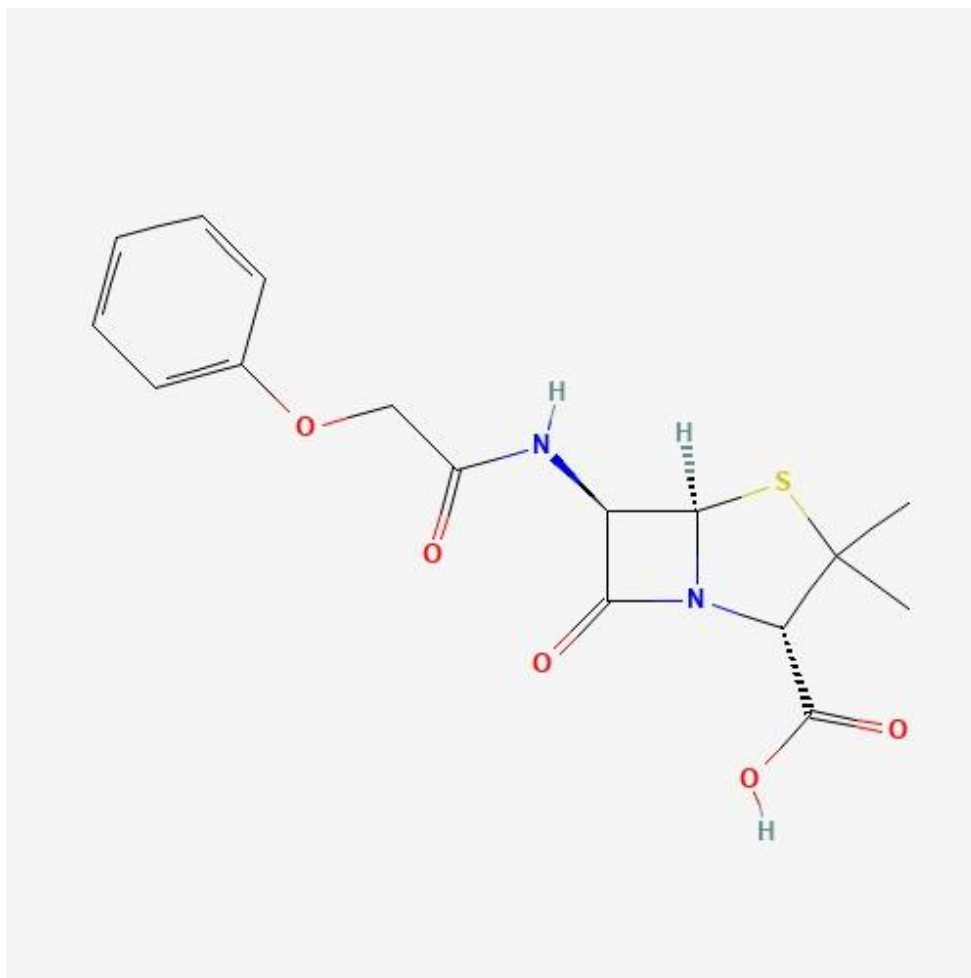
Στην ίδια κατηγορία ανήκει και η ουπερζίνη Α, η οποία είναι αναστολέας της ακετυλοχολινεστεράσης και χορηγείται σε ασθενείς με νόσο Alzheimer. Τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι το (-) εναντιομερές είναι τρεις φορές δραστικότερο απ' ότι το ρακεμικό μίγμα (Εικόνα 1-8) (Wang et al., 2009).



Εικόνα 1-8: Τα δυο ισομερή της ουπερζίνης (Ferreira et al., 2016)

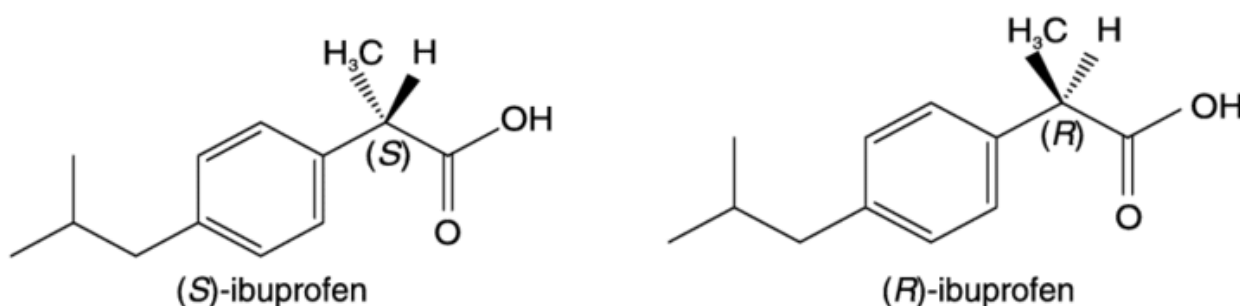


Τα φάρμακα που λαμβάνονται από φυτά ή άλλους οργανισμούς που απαντώνται στη φύση, ανεξάρτητα από το αν υποβάλλονται σε επεξεργασία ή όχι, είναι συνήθως χειρόμορφα και απομονώνονται είτε με τη μορφή του ενός εναντιομερούς, είτε ως ρακεμικό μίγμα. Παράδειγμα αποτελεί η πενικιλίνη V, μια ουσία που απομονώνεται από το μύκητα *Penicillium*. Το εναντιομερές της, το οποίο παρασκευάζεται αποκλειστικά στο εργαστήριο, δεν παρουσιάζει κάποια βιολογική δράση (Εικόνα 1-9).



Εικόνα 1-9: Δομή της πενικιλίνης V (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Penicillin-V>)

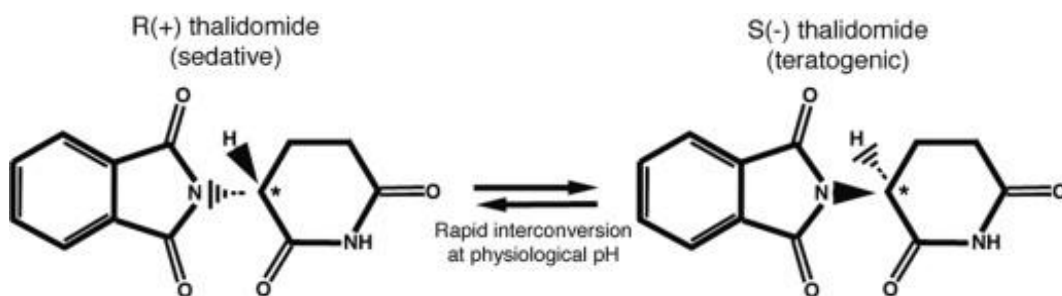
Από την άλλη πλευρά, αν ένα χειρόμορφο φάρμακο συντίθεται αποκλειστικά στο εργαστήριο, τότε το αποτέλεσμα της σύνθεσης είναι ένα ρακεμικό μίγμα και έτσι κυκλοφορεί και στην αγορά. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση της ιβουπροφένης, όπου το S εναντιομερές (Εικόνα 1-10) είναι αυτό με τη βιολογική δράση ως αναλγητικό, ιδιαίτερα κατά των ρευματισμών. Ωστόσο, στην αγορά διατίθεται ως ρακεμικό μίγμα των δυο μορφών της, R και S (McMurry, 2009).



Εικόνα 1-10: S- και R- ιβουπροφένη

Καθοριστική για τα χειρόμορφα φάρμακα ήταν η περίπτωση της θαλιδομίδης. Η θαλιδομίδη, ουσία που παρασκευαζόταν στο εργαστήριο ως ρακεμικό μίγμα, συνταγογραφούταν ως κατασταλτικό κατά της ναυτίας στις εγκύους τη δεκαετία του '60. Όμως, αποδείχθηκε ότι η χορήγησή της προκαλούσε τερατογενέσεις.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μια μελέτη σε ποντίκια και κουνέλια, η οποία κατέληξε στο συμπέρασμα πως και τα δύο εναντιομερή της θαλιδομίδης δρούσαν τόσο τερατογονικά όσο και κατά της ναυτίας (Fabro et al., 1967). Περαιτέρω διερεύνηση έδειξε ότι το ένα εναντιομερές, το S-εναντιομερές είναι υπεύθυνο για τερατογένεση, ενώ το R- εναντιομερές δρα κατά της ναυτίας. Επιπλέον, υπήρχε η λανθασμένη εντύπωση πως, αντί για ρακεμικό μίγμα, το φαρμακευτικό σκεύασμα περιείχε μόνο το R- εναντιομερές (Smith, 1989). Ωστόσο, αργότερα ανακαλύφθηκε ότι ακόμη και αν χορηγηθεί το καθαρό R- εναντιομερές, λόγω ρακέμωσης που λαμβάνει χώρα στον ανθρώπινο οργανισμό, μέσω αυθόρμητης υδρόλυσης και γρήγορης χειρόμορφης αναστροφής σε φυσιολογικές τιμές pH, παράγεται ούτως ή άλλως το S-εναντιομερές (Εικόνα 1-11) (Eriksson et al., 2001; Eriksson et al., 1995)



Εικόνα 1-11: Η ρακέμωση των εναντιομερών της θαλιδομίδης

[https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-thalidomide-enantiomers-and-packaging-A-Thalidomide-is-a-stereo-isomer-and\\_fig2\\_279804516](https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-thalidomide-enantiomers-and-packaging-A-Thalidomide-is-a-stereo-isomer-and_fig2_279804516)

Πλέον, δε χορηγείται ως κατασταλτικό, αλλά η θαλιδομίδα και κάποια παράγωγα της χρησιμοποιούνται κυρίως για τη θεραπεία ορισμένων τύπων καρκίνου, όπως το πολλαπλό μυέλωμα και μιας επιπλοκής της λέπρας (Wnendt et al., 1996).

Το γεγονός αυτό πυροδότησε τη μελέτη της στερεοεκλεκτικότητας στα φαρμακευτικά σκευάσματα. Τελικώς, αποδείχθηκε ότι τα εναντιομερή μιας ένωσης μπορούν να δράσουν με 4 διαφορετικούς τρόπους:

- το ένα μόνο εναντιομερές να παρουσιάζει φαρμακολογική δράση και το άλλο είτε να είναι πρόσμιξη, είτε να μην έχει φαρμακολογική δράση, είτε να είναι τοξικό (βλ. ντοπαμίνη)
- τα δυο εναντιομερή να έχουν σχεδόν την ίδια φαρμακολογική δράση και περίπου στον ίδιο βαθμό (βλ. προμεθαζίνη)
- τα δυο εναντιομερή να έχουν παρόμοια φαρμακολογική δράση, αλλά να διαφέρουν στην δραστικότητά τους (βλ. βαρφαρίνη και ουπερζίνη)
- να έχουν εντελώς διαφορετικές φαρμακολογικές δράσεις (βλ. προξυφαίνη)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται μια σειρά εναντιομερών φαρμακευτικών ουσιών και η φαρμακολογική δραστηριότητά τους:

**Πίνακας 1-1: Εναντιομερή φάρμακα και η φαρμακολογική δράση κάθε εναντιομερούς (Gumustas et al., 2018)**

Chiral Drug	Effects of Each Form
Albuterol	(R) Enantiomer shows bronchodilator activity; (S) enantiomer may have proinflammatory effects.
Amlodipine	(S) Isomer shows ca. 1000-fold higher activity than (R) isomer.
Bupivacaine	(S) Enantiomer has less cardiotoxic effect than (R) enantiomer.
Carvedilol	(S) Enantiomer is mainly responsible for nonselective $\beta$ -blocking activity while both (R) and (S) enantiomers are responsible for $\alpha$ -blocking effect.
Cetirizine	(R) Levocetirizine shows ca. 30-fold higher affinity than (S) dexocetirizine.
Citalopram	(S) Enantiomer is active while (R) enantiomer is inactive.
Dobutamine	(-) Isomer exhibits agonistic activities while (+) isomer exhibits antagonist activity.
Dropropizine	(R) Enantiomer may contribute to side effects.
Ethambutol	(S,S) Enantiomer possesses antituberculous effect while (R,R) enantiomer causes blindness.
Ethomidate	(R) Form is ca. 15-fold more effective than (S) form while (S) form shows hypnotic effect.
Ibuprofen	(S) Enantiomer exhibits ca. 160 times higher activity than (R) form.
Ketamine	(S) Form binds strongly to the NMDA receptor and is 2-4-fold more effective than (R) form. The (R) form causes anxiety and hallucinations.
Labetalol	(S,R)-Form blocks $\alpha$ -adrenergic receptors, (R,R)-form blocks $\beta$ -adrenoreceptors while (S,S) and (R,S) isomers are inactive.
Methadone	(R) Enantiomer has higher unbound fraction to the plasma proteins and total renal clearance than the (S) enantiomer.
Methyldopa	(S) Enantiomer is active while the (R) enantiomer is inactive.
Methorphan	L Form act as a pain reliever, D form act as cough suppressor.
Omeprazole	(S) Enantiomer exhibits stronger pharmacological activity than (R) enantiomer.
Penicillamine	D Isomer shows antiarthritic effect while L isomer is toxic.
Prilocaine	(R) Enantiomer metabolizes faster than (S) enantiomer.
Propranolol	L form is active while, D form is inactive.
Thalidomide	(S) Enantiomer is teratogenic while (R) enantiomer shows sedative effect.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι φαρμακευτικά σκευάσματα που περιέχουν μόνο το δραστικό εναντιομερές προσφέρουν τα εξής πλεονεκτήματα:

- μόνο μια μορφή ως ενεργό συστατικό, αντί μίγματος δυο διακριτών μορφών
- με μια μόνο ενεργή μορφή είναι πιο εύκολο να χαρακτηριστούν οι θεραπευτικές τους ιδιότητες, η φαρμακολογία και η τοξικολογία τους.

Ακόμη, η ύπαρξη μόνο ενός εναντιομερούς οδηγεί στην μείωση της τοξικότητας των φαρμάκων, τη μείωση της απαιτούμενης δόσης και αποφυγή πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκων.

Συμπερασματικά, από όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως, φαίνεται ότι η παρασκευή αποκλειστικά ενός εναντιομερούς ή ο διαχωρισμός τους είναι κάποιες φορές πολύ σημαντικός, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για φαρμακευτικές ουσίες. Έτσι στο επόμενο κεφάλαιο θα αναφερθούν τεχνικές διαχωρισμού εναντιομερών (Gumustas et al. 2018).

## 2. Τεχνικές διαχωρισμού εναντιομερών

### 2.1. Χρωματογραφία

Ο όρος χρωματογραφία περικλείει μια ομάδα εργαστηριακών μεθόδων, οι οποίες χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό ουσιών με παρόμοιες ιδιότητες σε μίγματα. Είναι χρήσιμο να σημειωθεί, πως πολλές φορές είναι η μόνη τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ορισμένους διαχωρισμούς.

Αν και υπάρχουν πολλά είδη χρωματογραφίας, η βασική αρχή της έχει ως εξής: το δείγμα προς ανάλυση εισάγεται στην εργαστηριακή διάταξη και άγεται από μια κινητή φάση, δηλαδή ένα κατάλληλα επιλεγμένο διαλύτη, η οποία μπορεί να είναι υγρή, αέρια ή ένα υπερκρίσιμο ρευστό. Με αυτόν τον τρόπο περνά από τη λεγόμενη στατική φάση, η οποία μπορεί να έχει τη μορφή στήλης ή μιας στερεής επιφάνειας. Οι ερευνητές επιλέγουν τις δυο φάσεις, με γνώμονα τα χαρακτηριστικά των ουσιών προς ανάλυση (π.χ. πολικότητα, έτσι ώστε κάποιες ουσίες να κατακρατούνται από τη στήλη και κάποιες να διέρχονται γρήγορα από αυτή. Με αυτό τον τρόπο, κάθε ουσία εκλούεται ξεχωριστά, δημιουργώντας μια διακριτή ζώνη και μέσω αυτών των ζωνών γίνεται ποιοτικός ή/και ποσοτικός προσδιορισμός τους (Skoog et al, 2005) .

Οι μέθοδοι της χρωματογραφίας μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με το είδος της στατικής και κινητής φάσης που χρησιμοποιείται σε:

- χρωματογραφία στήλης, όπου η στατική φάση είναι το πληρωτικό περιεχόμενο μιας λεπτής στήλης, από την οποία διέρχεται το δείγμα
- επίπεδη χρωματογραφία, όπου η στατική φάση στηρίζεται σε μια επίπεδη πλάκα ή στους πόρους ενός χαρτιού

Μια εναλλακτική ταξινόμηση είναι ανάλογα με τον τύπο των κινητών και στατικών φάσεων και των ισορροπιών, οι οποίες δημιουργούνται κατά την εναλλαγή των ουσιών του δείγματος μεταξύ στατικής και κινητής φάσης. Έτσι, οι χρωματογραφικές μέθοδοι χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

- υγρή χρωματογραφία
- αέρια χρωματογραφία
- χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (Skoog et al, 2005)

### 2.1.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ή πίεσης (High Performance Liquid Chromatography ή High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) ονομάζεται πλέον η εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, με τη διαφορά ότι η κινητή φάση πλέον δεν ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με τη βοήθεια αντλίας. Το γεγονός αυτό προσδίδει δύο πλεονεκτήματα: επιταχύνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης. Τα μικρά σωματίδια στο υλικό πλήρωσης της στήλης, έχουν την επιθυμητή ιδιότητα να αυξάνουν το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης, κάτι που βελτιώνει το διαχωρισμό των αναλυόμενων μορίων και μειώνει σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό (Καρκαλούσος et al., 2015).

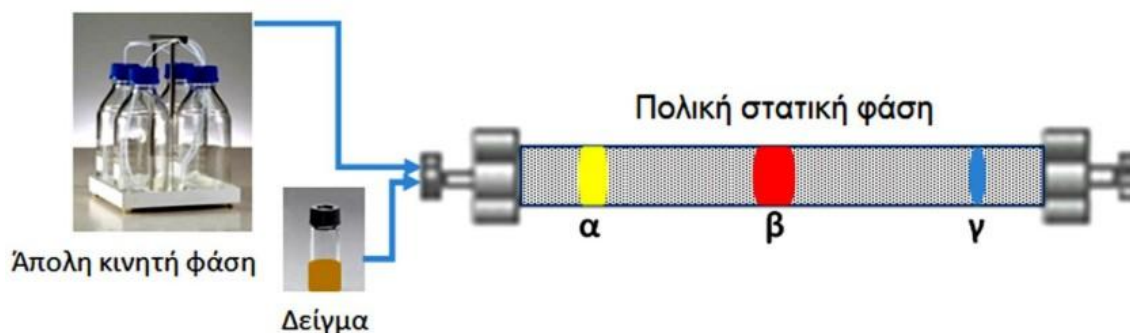
Η HPLC, ως προς τη σχέση της πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, μπορεί να ταξινομηθεί σε δυο κατηγορίες:

- HPLC κανονικής φάσης
- HPLC αντίστροφης φάσης

Όσον αφορά την HPLC κανονικής φάσης, πολικό είναι το πληρωτικό υλικό της στήλης, παραδείγματος χάριν οξείδιο του πυριτίου ( $\text{SiO}_2$ ) ή οξείδιο του αργιλίου ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), στα οποία πολικότητα προσδίδουν οι υδροξυλομάδες που περιέχουν. Από την άλλη πλευρά, η κινητή φάση, δηλαδή ο διαλύτης έχει χαμηλή πολικότητα. Συνήθεις διαλύτες της HPLC κανονικής φάσης είναι οργανικές ουσίες όπως το εξάνιο ή το χλωροφόρμιο, ενώ δεν περιέχεται στην κινητή φάση νερό.

Με αυτό τον τρόπο όσες πολικές ουσίες βρίσκονται στο υπό ανάλυση δείγμα, εκλούνται τελευταίες, καθώς προσροφώνται από την στατική φάση, δίνοντας προτεραιότητα στις άπολες ουσίες. Αργότερα, εκλούνται και οι πολικές ενώσεις με σταδιακή αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης, καθώς πλέον τα μόρια του διαλύτη ανταγωνίζονται τα μόρια των προσροφημένων πολικών ουσιών για τις θέσεις πρόσδεσης της στατικής φάσης (Καρκαλούσος et al., 2015).



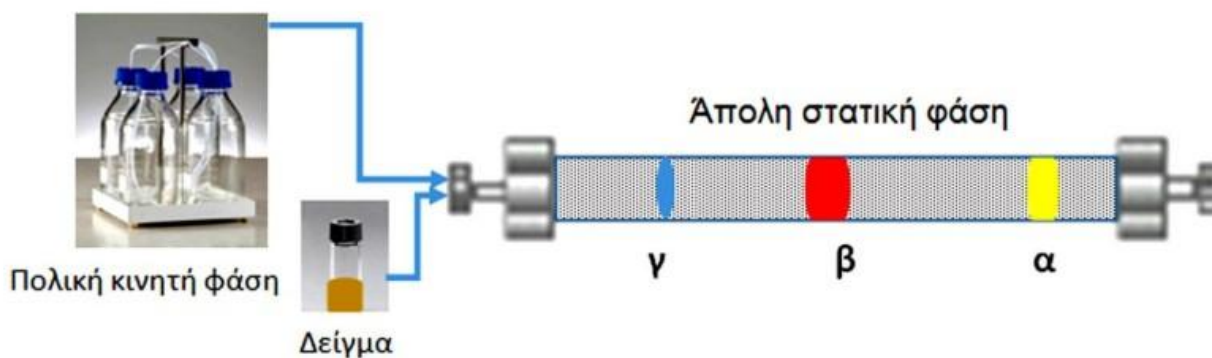


Εικόνα 2-1: Αρχή της HPLC κανονικής φάσης (Καρκαλούσος et al., 2015).

Σε γενικές γραμμές, η συγκεκριμένη μέθοδος προτιμάται όταν οι, προς μελέτη, ενώσεις δεν διαλύονται στο νερό ή υδρολύονται και επομένως το υδατικό περιβάλλον δε προσφέρει τις καλύτερες συνθήκες. Ακόμη, προτιμάται για τον διαχωρισμό ισομερών ουσιών.

Από την άλλη πλευρά, στην HPLC αντίστροφης φάσης, πολική είναι η κινητή φάση και άπολη η στατική. Έτσι, στην στήλη προσροφώνται τα άπολα μόρια και εκλούνται πρώτα τα πολικά. Τα συνηθέστερα υλικά που απαρτίζουν τη στήλη της στατικής φάσης είναι το οξείδιο του πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες, όπως αλκύλια (ακετύλιο, δεκαοκτύλιο, οκτύλιο), φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.α., έτσι ώστε η στήλη να είναι άπολη. Η κινητή φάση αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή με νερό. Η έκλουση των άπολων μορίων γίνεται με σταδιακή μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης, αυξάνοντας το ποσοστό του οργανικού διαλύτη, κάτι που λειτουργεί αντίστοιχα με την αύξηση της πολικότητας στην HPLC κανονικής φάσης (Καρκαλούσος et al., 2015) .





Εικόνα 2-2: Αρχή της HPLC αντίστροφης φάσης (Καρκαλούσος et al., 2015).

Εστιάζοντας στη χρωματογραφική στήλη, η επιφάνεια της είναι οξείδιο του πυριτίου, το οποίο τροποποιείται με οργανικές ομάδες για να έχει μικρή πολικότητα. Οι ομάδες αυτές είναι συνήθως υδρογονάνθρακες με μακριές αλυσίδες άνθρακα, συνήθως 4 ή 8 ή 18 άτομα, οι οποίες αντίστοιχα ονομάζονται C4 ή C8 ή C18. Η HPLC αντίστροφης φάσης είναι η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη μορφή της HPLC και γενικότερα, η περισσότερο χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαχωρισμού ουσιών για αναλυτικούς σκοπούς (Καρκαλούσος et al., 2015) .

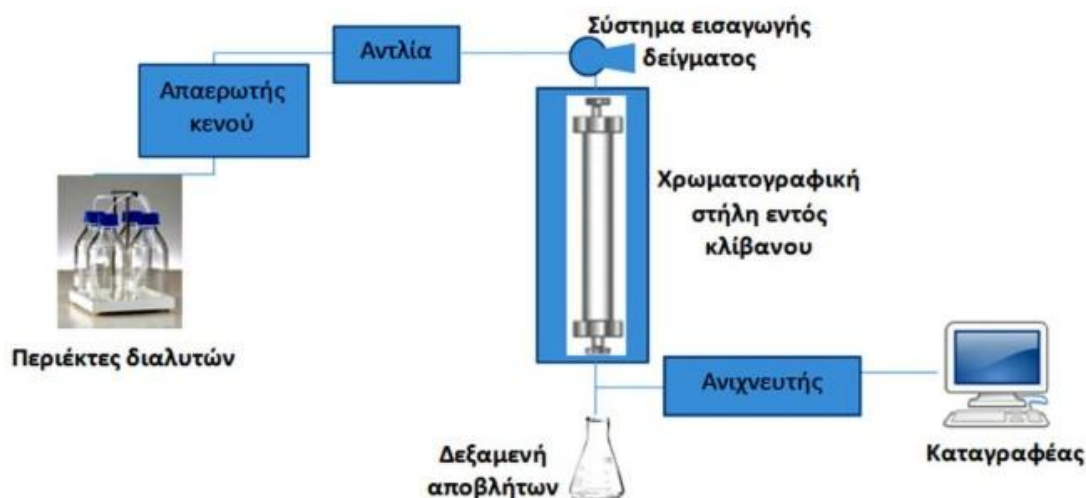
Αμφότερα τα είδη HPLC έχουν κοινή οργανολογία. Τυπικά, μια εργαστηριακή διάταξη HPLC απαρτίζεται από τα εξής μέρη:

- Περιέκτες διαλυτών, καθώς οι διαλύτες που θα χρησιμοποιηθούν ως κινητή φάση, δηλαδή θα μεταφέρει το δείγμα στη συσκευή της χρωματογραφίας, κάθε φορά αποθηκεύονται σε ειδικές φιάλες
- Απαερωτής κενού, ο οποίος μέσω της απαέρωσης της κινητής φάσης, προσφέρει έλεγχο της πίεσης στη χρωματογραφική στήλη.
- Αντλία (pump): Μέσω της αντλίας, η κινητή φάση διοχετεύεται σε όλη την εργαστηριακή διάταξη, από τους περιέκτες των διαλυτών μέχρι το δοχείο συλλογής των αποβλήτων του συστήματος, υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή.
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injection system/ injector valve), το οποίο είναι το σημείο που εισάγεται το δείγμα και περιλαμβάνει βρόγχο σταθερού όγκου ή

αυτόματο σύστημα εισαγωγής, μεταβλητού (προεπιλεγμένου) όγκου έγχυσης. Είναι τοποθετημένο πριν την χρωματογραφική στήλη, έτσι ώστε το δείγμα να εισέλθει στην κινητή φάση και να περάσει από τη στήλη.

- Χρωματογραφική στήλη (column), η οποία αποτελείται από κατάλληλο υλικό, έτσι ώστε να επιτευχθεί εκεί ο διαχωρισμός. Επειδή η θερμοκρασία επηρεάζει το διαχωρισμό, η στήλη είναι τοποθετημένη σε θερμοστατούμενο κλίβανο (column oven).
- Ανιχνευτής: Προκειμένου να προσδιορίζονται οι ουσίες που εκλύονται από τη στήλη, μετά τη στήλη συνδέεται ένας ανιχνευτής, συνήθως φασματομετρίας UV/Vis, όπου το παραγόμενο από τον ανιχνευτή φως προσπίπτει σε κυψελίδα συνεχούς ροής από χαλαζία και μετριέται η απορρόφηση του φωτός. Άλλοι ανιχνευτές που μπορεί να χρησιμοποιηθούν είναι:
  - ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD)
  - αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές (Conductivity Detector),
  - ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector)
  - φασματογράφοι μάζας MS (Mass Spectroscopy Detector, MS Detector)
  - ανιχνευτής Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Ανιχνευτής NMR, (Nuclear Magnetic Resonance Detector, NMR Detector)
  - ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές (Electrochemical Detector),
  - φθορισμομετρικοί ανιχνευτές (Fluorescence Detector).
- Καταγραφικό: Το μετρούμενο σήμα που καταγράφεται συνεχώς κατά τη διάρκεια μιας ανάλυσης μεταδίδεται στη συνέχεια σε έναν υπολογιστή που παράγει το χρωματογράφημα της ανάλυσης.
- Δεξαμενή αποβλήτων: Είναι η δεξαμενή όπου συλλέγεται η κινητή φάση μαζί με τα περιεχόμενα συστατικά του δείγματος. Όταν είναι επιθυμητή η συλλογή κλασμάτων της κινητής φάσης, (όπως στην προπαρασκευαστική HPLC), χρησιμοποιείται αυτόματος κλασματοσυλλέκτης (fraction collector).

Στην Εικόνα 2-3 φαίνεται και σχηματικώς η εργαστηριακή διάταξη της HPLC (Καρκαλούσος et al., 2015) :



Εικόνα 2-3: Εργαστηριακή διάταξη HPLC (Καρκαλούσος et al., 2015).

Σχετικά με την ανάλυση και τον διαχωρισμό εναντιομερών σε φαρμακευτικά σκευάσματα, η HPLC, είναι η μέθοδος που επιλέγεται συχνότερα για το διαχωρισμό των εναντιομερών, καθώς είναι ακριβής, επαναλήψιμη, εκλεκτική, ευαίσθητη και ταχεία. Σε αντίθεση, οι παραδοσιακές μέθοδοι όπως η μέτρηση της οπτικής περιστροφής και η ανακρυστάλλωση διαστερεοϊσομερών αλάτων είναι περίπλοκες, με μειωμένη ευαισθησία και ακρίβεια και δε μπορούν να εφαρμοστούν σε όλες τις περιπτώσεις (Chandrul & Srivastava, 2010).

Μπορούν να απαριθμηστούν 3 διαφορετικές προσεγγίσεις με τις οποίες μπορεί να επιτευχθεί διαχωρισμός εναντιομερών με χρωματογραφία. Η πρώτη προσέγγιση είναι η μετατροπή των εναντιομερών σε διαστερεομερή πριν να εισέλθουν στη στήλη, χρησιμοποιώντας ένα χειρόμορφο αντιδραστήριο παραγοντοποίησης. Τα προϊόντα της αντίδρασης περνούν από μια μη χειρόμορφη στατική φάση. Λόγω αυτής της μετατροπής, παύουν τα εναντιομερή να έχουν ίδιες φυσικές ιδιότητες και εμφανίζουν διακριτές διαφορές πχ. στην διαλυτότητα και την πολικότητα, κάτι που επιτρέπει το διαχωρισμό τους με απλή χρωματογραφία. Η πρόκληση αυτής της μεθόδου είναι η εύρεση του κατάλληλου χειρόμορφου αντιδραστήριου παραγοντοποίησης, παρά η ανάπτυξη μιας χρωματογραφικής διαδικασίας για να διαχωριστούν τα παραγόμενα διαστερεομερή, καθώς στην επιλογή του εμπλέκεται μια σειρά παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν την εφαρμοσιμότητα, την ακρίβεια και άλλους παράγοντες της χρωματογραφικής διαδικασίας (Chandrul & Srivastava, 2010).

Πιο συγκεκριμένα, το χειρόμορφο αντιδραστήριο:

- Θα πρέπει να είναι σταθερό και να παρασκευάζεται εύκολα ή να είναι εμπορικά διαθέσιμο σε υψηλή οπτική καθαρότητα. Η υψηλή οπτική καθαρότητα είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς ο βαθμός οπτικής καθαρότητας έχει άμεση επίδραση στην ακρίβεια και στη μέγιστη οπτική καθαρότητα των ανιχνευόμενων εναντιομερών.
- Η αντίδραση που πραγματοποιείται θα πρέπει να είναι ήπια, έτσι ώστε να μη λαμβάνει χώρα ρακεμοποίηση των χειρόμορφων κέντρων των εναντιομερών και των αντιδραστηρίων παραγοντοποίησης.
- Η παραγοντοποίηση θα πρέπει να είναι ποσοτική και πλήρης, καθώς σε περίπτωση που δεν είναι, ο προσδιορισμός της καθαρότητας των εναντιομερών δε θα είναι ακριβής, διότι η αντίδραση των εναντιομερών με τα χειρόμορφα υποστρώματα μπορεί να έχει διαφορετική απόδοση.
- Το αντιδραστήριο παραγοντοποίησης θα πρέπει να περιέχει μόνο μια λειτουργική ομάδα που πραγματοποιεί την αντίδραση.
- Προς βελτίωση της ανιχνευσιμότητας των παραγώγων, ο χειρόμορφος παράγοντας παραγοντοποίησης πρέπει να περιέχει μια ομάδα με φθόριο ή χλώριο (Chandrul & Srivastava, 2010).

Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι το πόσο αποτελεσματικά γίνεται ο χρωματογραφικός διαχωρισμός στα παραγόμενα διαστερομερή εξαρτάται από το πόσο διαφορετικές είναι οι ιδιότητές τους όπως η πολικότητα, οι ενέργειες προσρόφησης, η προσβασιμότητα σε διάφορους πολικούς υποκαταστάτες και η μοριακή τους δομή. Ένα αντιδραστήριο παραγοντοποίησης που μεγιστοποιεί αυτές τις διαφορές είναι το πιο επιθυμητό. Παράγοντες που κάνουν τον διαχωρισμό πιο ευδιάκριτο είναι:

- η δομική ακαμψία των ομάδων που βρίσκονται στο στερεογονικό κέντρο του αντιδραστηρίου παραγοντοποίησης
- η μικρή απόσταση από τα δυο στερεογονικά κέντρα των διαστερομερών παραγώγων
- οι ογκώδεις ομάδες στους υποκαταστάτες που συνδέονται με το στερεογονικό κέντρο του αντιδραστηρίου παραγοντοποίησης (Chandrul & Srivastava, 2010).

Η δεύτερη προσέγγιση είναι η στατική φάση να περιέχει ένα χειρόμορφο συστατικό και η στατική φάση να μην είναι χειρόμορφη. Εδώ, υπάρχει το πλεονέκτημα ότι δεν χρειάζεται να γίνει παραγοντοποίηση των εναντιομερών, η οποία είναι μια απαιτητική και δύσκολη διαδικασία, ούτε να υπάρχει ειδικά διαμορφωμένη στατική φάση. Σε αυτή την προσέγγιση, με βάση το είδος των χειρόμορφων προσθέτων και το μηχανισμό με τον οποίο επιτυγχάνεται η εκλεκτικότητα για τα εναντιομερή, υπάρχουν τρία είδη χρωματογραφίας:

- χρωματογραφία ανταλλαγής υποκαταστατών
- χρωματογραφία ζεύγους χειρόμορφων ιόντων
- χρωματογραφία με κινητές φάσεις που περιέχουν μακρομοριακά συμπλέγματα.

Αναφορικά με τη χρωματογραφία ανταλλαγής υποκαταστατών, υπάρχουν δυο προσεγγίσεις. Η πρώτη, η οποία πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Davankon για τον διαχωρισμό εναντιομερών αμινοξέων, περιλαμβάνει στατικές φάσεις με υποκαταστάτες εναντιομερών αμινοξέων προσδεδεμένους σε πολυμερικές ρητίνες στις οποίες περιέχονται ιόντα χαλκού III. Όμως, οι στατικές αυτές φάσεις, παρόλο που παρουσίασαν εξαιρετική εκλεκτικότητα για τα εναντιομερή, δεν ήταν σταθερές υπό πίεση, καθιστώντας τις ανίκανες να χρησιμοποιηθούν στην HPLC. Επομένως, δημιουργήθηκαν στατικές φάσεις με μια σειρά από χειρόμορφους υποκαταστάτες, οι οποίοι συνδέθηκαν με γέλες (gel) πυριτίου για HPLC κανονικής αλλά και αντίστροφης φάσης. Οι στήλες αυτές πραγματοποίησαν πολύ αποτελεσματικό διαχωρισμό αμινοξέων και παραγώγων τους. Η συνηθέστερη εφαρμογή τους είναι η ανάλυση εναντιομερών για αμινοξέα, ενώ δεν έχει καταγραφεί ανάλυση φαρμακευτικών σκευασμάτων (Chandrul & Srivastava, 2010).

**Πίνακας 2-1: Χρωματογραφικοί διαχωρισμοί με χρωματογραφία ανταλλαγής υποκαταστατών με την προσέγγιση Davankon (Chandrul & Srivastava, 2010).**

Chiral Selector	Metal Ion	Stationary Phase	Solute Enantiomers
L- proline	Cu <sup>+2</sup>	Silica gel	Thyroid hormone, α-Methyl DOPA,
L- proline	Cu <sup>+2</sup>	C <sub>18</sub>	α-Hydroxy acids
(R,R)-+-tartaric acid mono-n-octylamine	Cu <sup>+2</sup>	C <sub>18</sub>	Ethanol amine

Η δεύτερη προσέγγιση ονομάστηκε δυναμική χρωματογραφία ανταλλαγής υποκαταστατών και πραγματοποιήθηκε πρώτη φορά από τους Karger et al. για το διαχωρισμό εναντιομερών αμινοξέων. Οι ερευνητές έδειξαν πως προσθέτοντας χειρόμορφους μεταλλικούς παράγοντες συμπλοκοποίησης στις κινητές φάσεις, επιτυγχάνεται πολύ αποτελεσματικός

διαχωρισμός των αμινοξέων και των παραγώγων τους, απ' ό,τι χρησιμοποιώντας μη χειρόμορφες στατικές φάσεις, όπως με πληρωτικά υλικά που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης ή στη χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων. Ο μηχανισμός του διαχωρισμού βασίζεται στη διαφορά της σταθερότητας τους και επομένως στις συγκεντρώσεις ισορροπίας, καθώς και στη διαφορά στις συμπεριφορές κατανομής ή προσρόφησης των δύο διαστερομερών τριμερών συμπλεγμάτων που σχηματίζονται από τα εναντιομερή της διαλυμένης ουσίας και τον χειρόμορφο μεταλλικό παράγοντα συμπλοκοποίησης. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, ο παράγοντας συμπλοκοποίησης αποτελείται από ένα οπτικά καθαρό Z – αμινοξύ ή παράγωγό του και χαλκό III, ο οποίος είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο μέταλλο λόγω της ικανότητάς του να σχηματίζει χηλικά σύμπλοκα (Chandrul & Srivastava, 2010) .

Η χρωματογραφία ζεύγους ιόντων είναι μια τεχνική στην οποία η ανάκτηση των ιονισμένων ουσιών ρυθμίζεται από την προσθήκη ενός ανταγωνιστικού ιόντος στην κινητή φάση. Αν το ανταγωνιστικό ιόν είναι χειρόμορφο, μπορεί να επιτευχθεί στερεοεκλεκτικός διαχωρισμός. Ο μηχανισμός του χειρόμορφου διαχωρισμού βασίζεται στη διαφορά που υπάρχει στις συμπεριφορές κατανομής ή προσρόφησης των διαστερομερών ζευγών ιόντων που σχηματίζονται από τις εναντιομερείς διαλυμένες ουσίες και το ανταγωνιστικό ιόν. Οι δεσμοί που συνδέουν τα διαστερομερή είναι κυρίως ηλεκτροστατικές επιδράσεις και δεσμοί υδρογόνου και οι στατικές φάσεις μικρής πολικότητας χρησιμοποιούνται για να δημιουργηθούν τα ζεύγη ιόντων. Η στερεοεκλεκτικότητα εξαρτάται από τη δομή του ανταγωνιστικού ιόντος και είναι υψηλή όταν το ανταγωνιστικό ιόν περιέχει ομάδες με άκαμπτα συστήματα δακτυλίων με ογκώδεις ομάδες κοντά στο στερεογονικό κέντρο (Chandrul & Srivastava, 2010) .

Chiral selector	Enantiomer solute	Mobile phase	Stationary phase
Quinine	Tropic acid, Atropic acid, Naproxane	Dichloro methane: Pentanol	Diol
Camphorsulfonate	$\beta$ -Blocker	Dichloro methane: Pentanol	Diol
Tartaric acid ester	Ephedrine	(Dichloromethane: Pentanol)+Phosphate buffer	Phenyl

Πίνακας 3-2: Χρωματογραφικοί διαχωρισμοί με δυναμική χρωματογραφία ανταλλαγής υποκαταστατών (Chandrul & Srivastava, 2010).

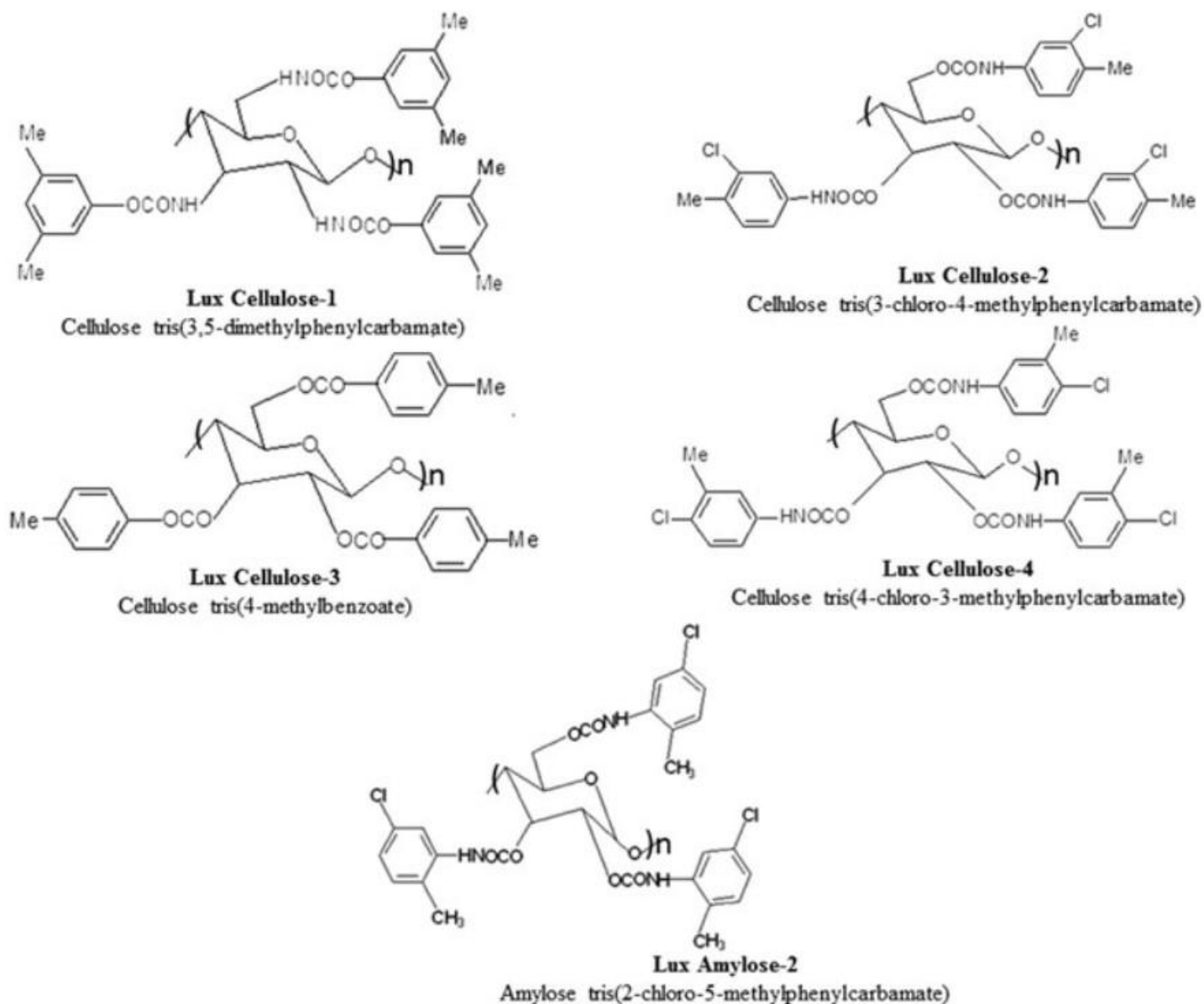
Η τρίτη προσέγγιση, δηλαδή ο απευθείας διαχωρισμός των εναντιομερών με εκλεκτικές χειρόμορφες στατικές φάσεις έχει απασχολήσει περισσότερο τους ερευνητές. Πιο συγκεκριμένα, έχει αναπτυχθεί ένα μεγάλο εύρος στατικών φάσεων που χρησιμοποιούνται



και οι οποίοι μπορούν να χωριστούν σε δυο τύπους. Στον πρώτο τύπο η κινητή φάση αποτελείται από μικρά δραστικά μόρια, τα οποία είναι ακινητοποιημένα σε γέλη (gel) πυριτίου ή πολυμερική γέλη, τα οποία δρουν υποστηρικτικά. Ενδεικτικά αναφέρονται οι στατικές φάσεις ανταλλαγής υποκαταστατών, οι στατικές φάσεις με βάση κυκλοδεξτρίνη, οι στατικές φάσεις δότη – δέκτη, οι στατικές φάσεις με βάση γλυκοπεπτίδια και οι ιονανταλλακτικές στατικές φάσεις (Okamoto & Ikaï, 2008).

Ο δεύτερος τύπος στατικής φάσης αποτελείται από οπτικά ενεργά πολυμερή, τα οποία με τη σειρά τους διακρίνονται σε φυσικά και συνθετικά. Αυτές οι στατικές φάσεις συντίθενται επιστρώνοντας το πολυμερές σε γέλη πυριτίου, ώστε να βελτιωθεί η απόδοση διαχωρισμού και η μηχανική αντοχή. Στις στατικές φάσεις από φυσικά πολυμερή μπορούν να αναφερθούν οι στατικές φάσεις με βάση πρωτεΐνες και οι στατικές φάσεις με βάση πολυσακχαρίτες ενώ, στις στατικές φάσεις από συνθετικά πολυμερή μπορούν να αναφερθούν οι στατικές φάσεις με βάση (πολύ)μεθακρυλαμίδιο, οι στατικές φάσεις με βάση (πολύ)μεθακρυλικούς εστέρες και οι στατικές φάσεις με βάση (πολύ)αμίδια (Okamoto & Ikaï, 2008).

Οι στατικές φάσεις από πολυσακχαρίτες είναι οι πιο διαδεδομένες χρωματογραφικές στήλες. Ενδιαφέρουσα είναι η δουλειά των Jibuti et al., οι οποίοι επιχείρησαν διαχωρισμό εναντιομερών παραγώγων της διωδρο-πυριδίνης με στήλες από πολυσακχαρίτες, δίνοντας σημασία στη σειρά έκλουσής τους.



Εικόνα 2-4: Η δομή των 5 εναντιομερών που μελέτησαν οι Jibuti et al. (Jibuti et al., 2012).

Τα χειρόμορφα παράγωγα της διυδρο – πυριδίνης αντιπροσωπεύουν μια αρκετά μεγάλη ομάδα ενώσεων, οι οποίες χορηγούνται ως αποκλειστές διαύλων ιόντων ασβεστίου σε ασθενείς. Η χρήση των συγκεκριμένων χειρόμορφων ενώσεων σε μηχανιστικές μελέτες διαχωρισμού εναντιομερών, έχει το πλεονέκτημα ότι οι λεπτές διαφορές μεταξύ τους τα καθιστούν κατάλληλα για μελέτη της αλληλεπίδρασής τους με διάφορες στατικές φάσεις σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Οι ερευνητές μελέτησαν το διαχωρισμό 5



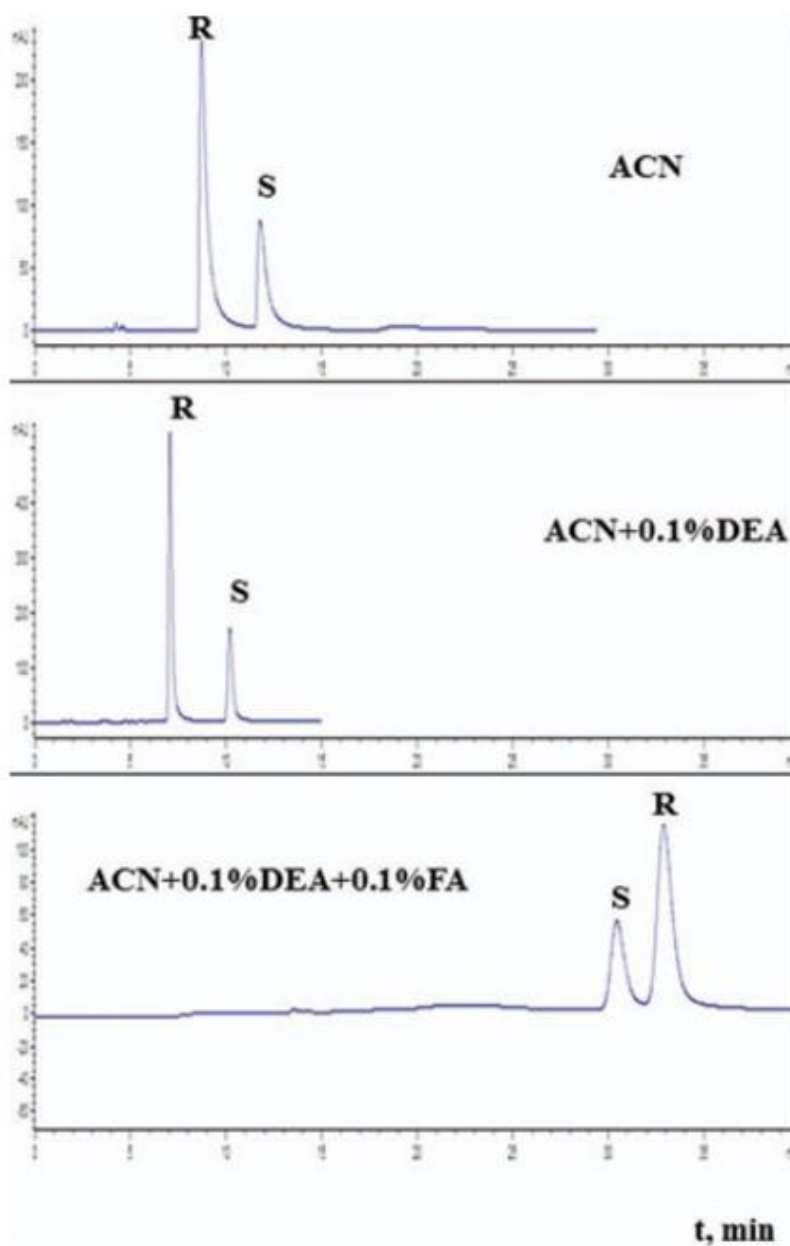
διαφορετικών παραγώγων διυδρο-πυριδίνης, χρησιμοποιώντας 5 διαφορετικές στήλες, με βάση πολυσακχαρίδια σε συνθήκες κανονικής φάσης (μη πολικές), πολικές οργανικές και συνθήκες αντίστροφης φάσης. Ακόμη, μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης μικρών ποσοτήτων φορμικού οξέος για τον διαχωρισμό τους, για τις διάφορες στατικές φάσεις και υπό διάφορες συνθήκες κινητής φάσης (Jibuti et al., 2012).

Από τα πειραματικά δεδομένα, οι ερευνητές κατέληξαν ότι τα εναντιομερή χειρόμορφων παραγώγων διυδρο-πυριδίνης μπορούν να διαχωριστούν με HPLC, χρησιμοποιώντας ως στατικές φάσεις στήλες με βάση πολυσακχαρίδια, κυτταρίνη ή αμυλόζη, σε διάφορες συνθήκες (Πίνακας 2-3) και μάλιστα σε συνθήκες αντίστροφης φάσης θα πρέπει το ποσοστό νερού στην κινητή φάση να μη ξεπερνά το 10% για να είναι επιτυχής ο διαχωρισμός. Η σειρά έκλουσης των εναντιομερών ήταν η ίδια και στους τρεις τύπους κινητής φάσης. Πρέπει να αναφερθεί επίσης ότι έγινε αντιστροφή των χρόνων έκλουσης για την αμλοδιπίνη, η οποία εξαρτάται από το ποσοστό του φορμικού οξέος που προστέθηκε σε κινητή φάση ακετονιτριλίου και επιβεβαιώθηκε με συνθήκες κανονικής και αντίστροφης φάσης με αποτέλεσμα να είναι το μόνο εναντιομερές στο οποίο παρατηρήθηκε αυτό (Jibuti et al., 2012).

**Πίνακας 2-3: Τα αποτελέσματα του διαχωρισμού των εναντιομερών για κάθε στήλη (Jibuti et al., 2012).**

Analyte	Cellulose-1			Cellulose-2			Cellulose-3			Cellulose-4			Amylose-2		
	EtOH		ACN	EtOH		ACN	EtOH		ACN	EtOH		ACN	EtOH		ACN
	k <sub>1</sub> '	α	Rs	k <sub>1</sub> '	α	Rs	k <sub>1</sub> '	α	Rs	k <sub>1</sub> '	α	Rs	k <sub>1</sub> '	α	Rs
Amlodipine	0.63	1.03	1.35	—	ns	—	0.34	1.05	1.17	1.82	1.54	2.8	—	ns	—
Nicardipine	—	ns <sup>a)</sup>	—	—	ns	—	—	ns	—	—	ns	—	—	ns	—
Nimodipine	—	ns	—	—	ns	—	—	ns	—	0.17	1.03	1.17	0.09	1.04	1.05
Nisoldipine	—	ns	—	—	ns	—	—	ns	—	0.88	1.10	3.19	—	ns	—
Nitrendipine	—	ns	—	—	ns	—	—	ns	—	0.43	1.11	2.10	—	ns	—

a) The abbreviation "ns" means no separation.



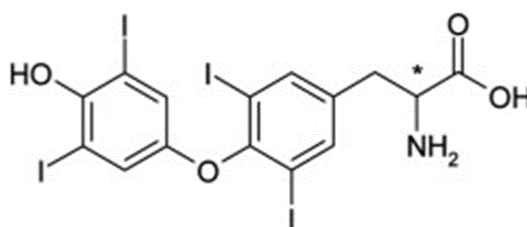
**Διάγραμμα 2-1:** Αντιστροφή σειράς έκλουσης εναντιομερών για την αμλοδιπίνη με προσθήκη φορμικού οξέος (Jibuti et al., 2012).

Πιο πρόσφατη είναι η μελέτη των Xie et al., οι οποίοι χρησιμοποίησαν ένα νέο είδος στατικής φάσης από μεταλλο-οργανικά πλαίσια (metal-organic frameworks, MOFs) για το διαχωρισμό ρακεμικών δειγμάτων με HPLC. Τα μεταλλο-οργανικά πλαίσια έχουν χρησιμοποιηθεί για ένα πλήθος ρακεμικών δειγμάτων, όπως αλκοόλες, οργανικά οξέα, κετόνες και φαινόλες με μεγάλη εκλεκτικότητα για τα εναντιομερή.

Στη συγκεκριμένη μελέτη ο διαχωρισμός έγινε με μεταλλο-οργανικό πλαίσιο με συντακτικό τύπο  $[Cu(S-mal)(bpe)]_n$ , όπου S-mal είναι το S-μαλικό οξύ και bpe το trans-1,2-δι(4-πυριδyl)αιθυλένιο. Οι ερευνητές συνέκριναν την ικανότητα αναγνώρισης των χειρόμορφων μορίων της στήλης με αυτήν μιας άλλης μεταλλο-οργανικής στήλης που είχαν μελετήσει σε προηγούμενα πειράματα, της  $[Cu(S-mal)(bpy)]_n$  και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δυο παράγοντες που παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο είναι το χειρόμορφο μικροπεριβάλλον και το μέγεθος των πόρων της στήλης.

Επίσης, ερευνήθηκε η επαναληψιμότητα της στήλης  $[Cu(S-mal)(bpe)]_n$ . Από τα αποτελέσματα καταγράφηκε σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD), για το χρόνο κατακράτησης της DNB-λευκίνης, μικρότερη του 1.1% (n=5), υποδεικνύοντας καλή σταθερότητα και επαναληψιμότητα της στήλης για διαχωρισμό εναντιομερών. Θεωρείται λοιπόν πως η μεταλλο-οργανική στήλη  $[Cu(S-mal)(bpe)]_n$  είναι υποσχόμενη (Xie et al., 2018).

Σχετικά με το διαχωρισμό φαρμακευτικών ενώσεων με HPLC, οι Gondova et al. επιχείρησαν να αναπτύξουν και να επικυρώσουν ένα πρωτόκολλο, για το διαχωρισμό των εναντιομερών της θυροξίνης, σε φαρμακευτικά σκευάσματα με χρωματογραφία. Η θυροξίνη ( $T_4$ ) (Εικόνα 2-5) είναι αμινοξύ και ορμόνη που εκκρίνεται από το θυρεοειδή αδένα. Είναι σημαντική για την φυσική ανάπτυξη και εξέλιξη του οργανισμού και τη ρύθμιση του μεταβολισμού του ανθρώπινου σώματος. Η μειωμένη παραγωγή θυροξίνης προκαλεί υποθυρεοειδισμό και αν δε ληφθεί θεραπεία, μπορεί να έχει σοβαρές συνέπειες στην πνευματική και σωματική εξέλιξη. Ως θεραπεία, χορηγούνται σκευάσματα θυρεοειδικής ορμόνης.

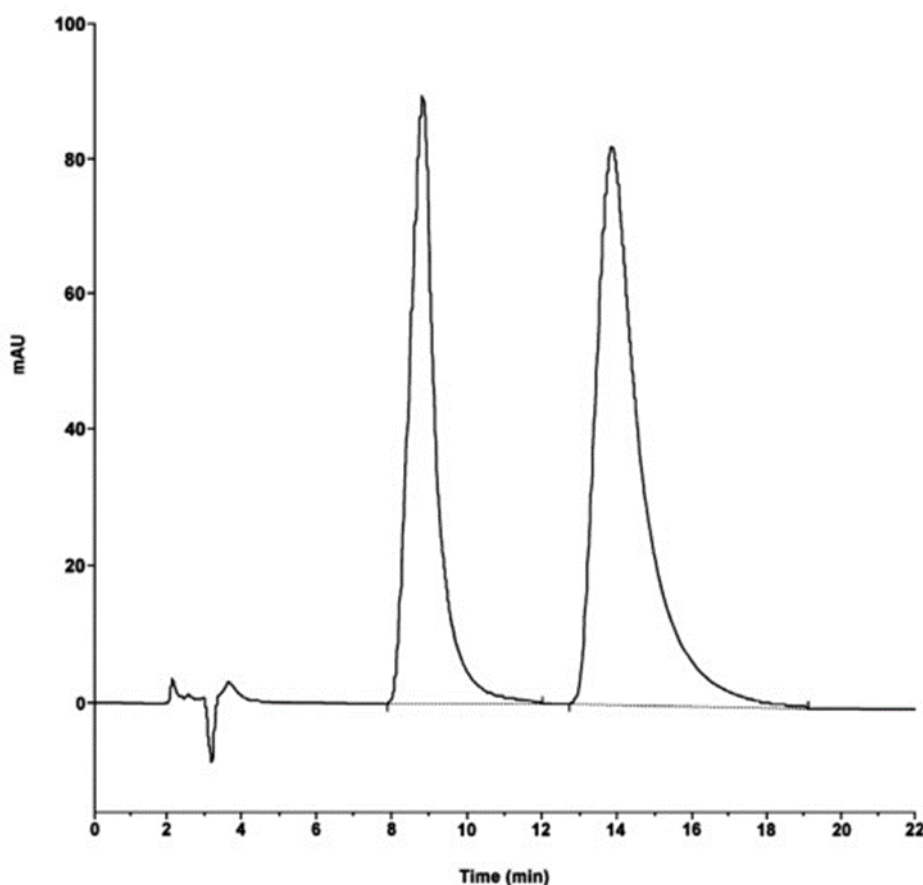


Εικόνα 2-5: Η δομή της θυροξίνης (Gondova et al., 2011)

Η θυροξίνη απαντάται σε δυο εναντιομερή (D και L), τα οποία έχουν διαφορετικές βιολογικές και φαρμακολογικές επιδράσεις. Η L-T4 είναι 4 φορές πιο δραστική από το ρακεμικό μίγμα. Η D-T4 έχει πολύ μικρή δραστηριότητα και χρησιμοποιείται ως παράγοντας μετατροπής λιπιδίων. Έτσι λοιπόν, η ιατρική χρήση της L-T4 απαιτεί να υπάρχει έλεγχος στην οπτική καθαρότητα του εναντιομερούς σε φαρμακευτικά σκευάσματα (Gondova et al., 2011).

Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν στατική φάση τεϊκοπλανίνης, η οποία είναι ένα γλυκοπεπτίδιο και η κινητή φάση ήταν ένα μίγμα μεθανόλης και ρυθμιστικού διαλύματος οξικού τριαιθυλαμμωνίου με pH 4.0. Η θερμοκρασία της στήλης ήταν σταθερή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C) και η ανίχνευση των εναντιομερών έγινε με ανιχνευτής φασματομετρίας UV σε μήκος κύματος 215 nm. Χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα L-T4 και D-T4 σε υδροξείδιο του νατρίου και μεθανόλη, τα οποία μετά την προετοιμασία τους αποθηκεύτηκαν στους 4°C και μακριά από το φως και ήταν υπό παρακολούθηση για 4 βδομάδες, ώστε να διαπιστωθεί ότι είναι σταθερά και με αυτά πραγματοποιήθηκε καμπύλη βαθμονόμησης. Δείγματα της μελέτης αποτέλεσαν 20 δισκία από κάθε φαρμακευτικό προϊόν, τα οποία κονιορτοποιήθηκαν, ζυγίστηκε ποσότητα που αντιστοιχεί σε 1 mg νατριούχου λεβοθυροξίνης, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη, εναιωρήθηκε σε μίγμα μεθανόλης και υδροξειδίου του νατρίου και τοποθετήθηκε σε υπερήχους για 20 λεπτά. Μετά από διήθηση του μίγματος, πραγματοποιήθηκε η HPLC (Διάγραμμα 2-2).

Από τα αποτελέσματα της επικύρωσης της μεθόδου, αλλά και των διαχωρισμών, φαίνεται ότι η μέθοδος υπό δοκιμή είναι ακριβής και ειδική. Ακόμη, σε σύγκριση με τη μέθοδο αναφοράς, είναι απλή, σχετικά ταχεία και οικονομική. Έτσι λοιπόν, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αναλύσεις ρουτίνας για τον έλεγχο και την ανίχνευση της εναντιομερικής καθαρότητας της θυροξίνης σε φαρμακευτικά σκευάσματα (Gondova et al., 2011).



**Διάγραμμα 2-2:** Χρωματογράφημα που δείχνει το διαχωρισμό των δυο εναντιομερών της θυροξίνης (Gondova et al., 2011).

Ανάλογη είναι και η έρευνα των Saleh et al., οι οποίοι ανέπτυξαν και επικύρωσαν μια μέθοδο HPLC για τον προσδιορισμό και το διαχωρισμό των εναντιομερών της προμεθαζίνης σε φαρμακευτικές ουσίες. Όπως προαναφέρθηκε, τα δυο εναντιομερή έχουν ίδια φαρμακολογική δράση και το ρακεμικό τους μίγμα χορηγείται ως αντισταμινικό για τα συμπτώματα της αλλεργίας, αλλά και για τη ναυτία, τον εμετό και ως ηρεμιστικό. Σκοπός τους ήταν η συγκεκριμένη μέθοδος να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση των εναντιομερών της προμεθαζίνης σε φαρμακευτικά σκευάσματα με μορφή σιροπιού. Εξετάστηκαν όλες οι παράμετροι της επικύρωσης συμπεριλαμβανομένης της ακρίβειας της μεθόδου όσον αφορά την απόκλιση από την πραγματική τιμή (accuracy), αλλά και την ακρίβεια όσον αφορά τις αποκλίσεις μεταξύ των μετρήσεων του ίδιου δείγματος (Πίνακας 2-5), της στιβαρότητας της μεθόδου, της γραμμικότητας, του ορίου ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ) και το ορίου ανίχνευσης (limit of detection, LOD) χρησιμοποιώντας HPLC σε στήλη

Vancomycin Chirobiotic V<sup>®</sup>. Η κινητή φάση ήταν μίγμα μεθανόλης, οξικού οξέος και τριαιθυλαμίνης (Saleh et al, 2008)..

**Πίνακας 2-5: Αποτελέσματα της ακρίβειας της μεθόδου όσον αφορά την απόκλιση από την πραγματική τιμή (accuracy), αλλά και την ακρίβεια όσον αφορά τις αποκλίσεις μεταξύ των μετρήσεων του ίδιου δείγματος (Saleh et al., 2008)**

TABLE I  
Intra-Day and Inter-Day Accuracy and Precision Data of HPLC Method for Promethazine

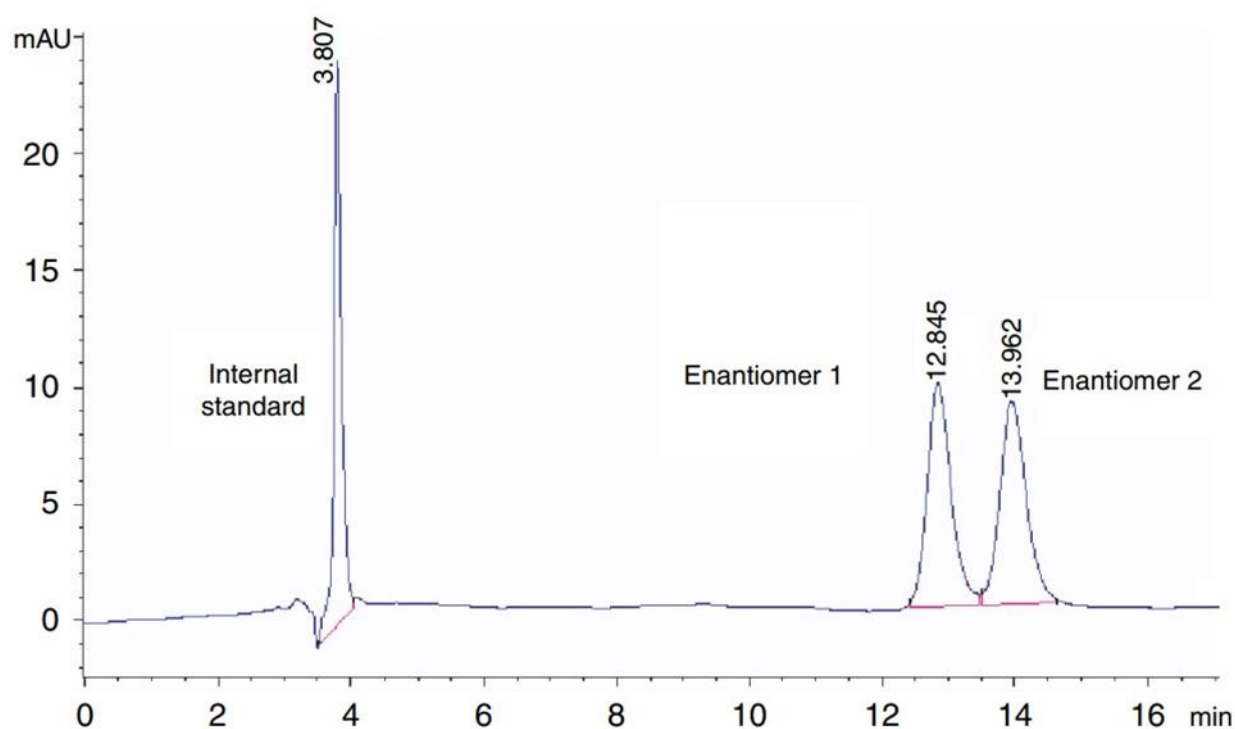
Theoretical Concentration (μg/mL)	Intra-Day <sup>a</sup>		Inter-Day <sup>a</sup>	
	Accuracy (%)	Precision (RSD %)	Accuracy (%)	Precision (RSD %)
<b>Enantiomer 1</b>				
0.8	99.64	0.45	99.32	0.92
1.6	100.86	0.71	99.87	0.54
2.4	101.21	0.68	99.55	0.31
<b>Enantiomer 2</b>				
0.8	99.79	0.31	99.12	0.24
1.6	100.62	0.63	99.62	0.31
2.4	100.92	0.42	99.41	0.77

<sup>a</sup>Mean of five determinations for each concentration.

Οι χρωματογραφικές συνθήκες βελτιστοποιήθηκαν, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η αξιόπιστη απόδοση της δοκιμασίας. Η επιλογή της κινητής φάσης έγινε λαμβάνοντας υπόψη παραμέτρους όπως ο χρόνος του πειράματος, το πόσο εύκολα γίνεται ο διαχωρισμός και το κόστος. Στο Διάγραμμα 2-3 φαίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα της ανάλυσης και του διαχωρισμού των εναντιομερών της προμεθαζίνης με ακετυλο-σαλικυλικό οξύ ως εσωτερικό πρότυπο. Επιπλέον, η υπό ανάπτυξη μέθοδος συγκρίθηκε με την πρότυπη μέθοδο, μέσω στατιστικής ανάλυσης (Saleh et al, 2008)..

Η έρευνα αυτή αντιπαρατίθεται με παρόμοια έρευνα των Bosàkonà et al., η οποία προηγήθηκε και επισημάνθηκε ότι αν και οι Bosàkonà et al. ανέφεραν το διαχωρισμό των εναντιομερών της προμεθαζίνης με εναντιομερή στήλη βανκομυκίνης, η έρευνά τους εστίασε στη μελέτη σταθερότητας και δεν πραγματεύεται την επικύρωση της μεθόδου για την ποσοτικοποίηση των εναντιομερών σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Αντιθέτως, η μέθοδος που περιγράφουν οι Saleh et al. είναι πλήρως επικυρωμένη.

Από τα αποτελέσματα των δοκιμών για την επικύρωση της μεθόδου, φαίνεται ότι είναι κατάλληλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό των εναντιομερών της προμεθαζίνης σε μεγάλες ποσότητες φαρμάκου και σε μορφή σιροπιού. Ακόμη, είναι ταχεία, ακριβής και αποτελεσματική και είναι κατάλληλη για αναλύσεις ρουτίνας σε εργαστήρια ελέγχου ποιότητας (Saleh et al, 2008).



**Διάγραμμα 2-3:** Χρωματογράφημα της ανάλυσης και του διαχωρισμού των εναντιομερών της προμεθαζίνης με ακετυλο-σαλικυλικό οξύ ως εσωτερικό πρότυπο (Saleh et al, 2008).

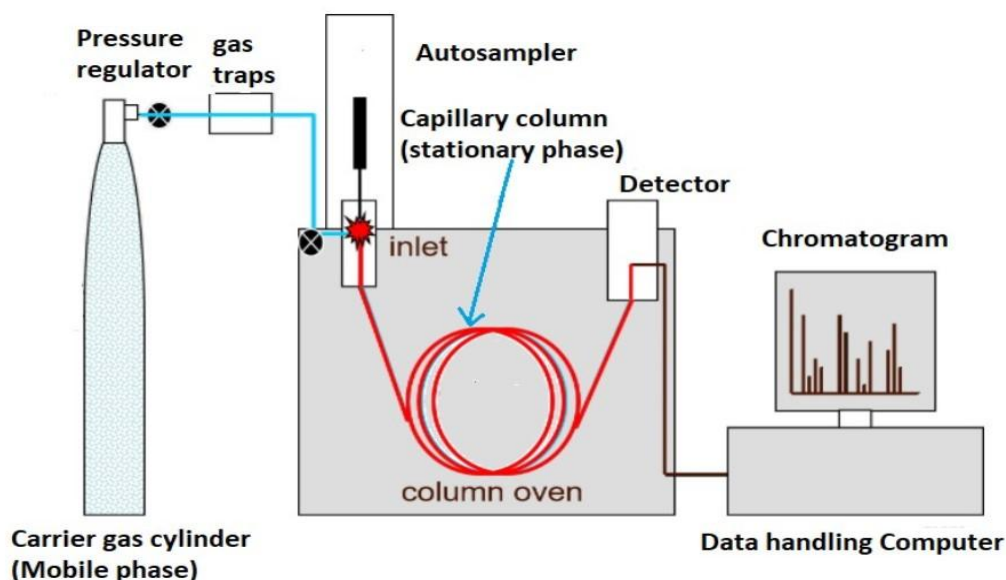


## 2.1.2 Αέρια χρωματογραφία

Η αέρια χρωματογραφία αποτελεί μια από τις πιο συνηθισμένες μεθόδους διαχωρισμού περίπλοκων μειγμάτων. Πρόκειται για μια ταχεία και αποτελεσματική μέθοδο, απλή και με μετρήσεις που απαιτούν μικρή ποσότητα δείγματος, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση όλων των ειδών οργανικών ενώσεων. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να πραγματοποιηθούν ποιοτικοί αλλά και ποσοτικοί προσδιορισμοί.

Τα μέρη μιας εργαστηριακής διάταξης αέριας χρωματογραφίας είναι :

- η θύρα έγχυσης δείγματος,
- μια συσκευή θέρμανσης,
- το φέρον αέριο,
- η στήλη,
- ο ανιχνευτής,
- ένα ροόμετρο
- ο καταγραφέας (Εικόνα 2-8)



Εικόνα 2-8: Εργαστηριακή διάταξη αέριας χρωματογραφίας

(<https://eclass.hua.gr/modules/document/file.php/DIET162/%CE%91%CE%95%CE%A1%CE%99%CE%91%20%CE%A7%CE%A1%CE%A9%CE%9C%CE%91%CE%A4%CE%9F%CE%93%CE%A1%CE%91%CE%A6%CE%99%CE%91/GC%20LAB%20Greek.pdf>)



Αρχικά γίνεται η εισαγωγή του δείγματος με τη χρήση μικροσύριγγας, το οποίο βρίσκεται σε υγρή μορφή. Μέσα στην εργαστηριακή διάταξη επικρατούν πολύ υψηλές θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα την μετατροπή του δείγματος σε αέριο. Στη συνέχεια παρασύρεται από το φέρον αέριο, το οποίο λειτουργεί ως κινητή φάση, φτάνοντας στη στήλη (στατική φάση). Εκεί, οι ενώσεις που υπάρχουν στο δείγμα κατανέμονται ανάμεσα στο φέρον αέριο και την στατική φάση και ισορροπούν (McNair et al, 2019).

Αφού το δείγμα περάσει από τη στήλη, φτάνει στον ανιχνευτή και καταγράφεται ο χρόνος κατακράτησης, δηλαδή ο χρόνος από την έγχυση του δείγματος έως την εμφάνιση της χρωματογραφικής κορυφής. Μάλιστα, αν συγκριθεί με τους πρότυπους χρόνους κατακράτησης, είναι δυνατόν να βρεθεί για ποια ουσία πρόκειται και το μέτρο του εμβαδού κάτω από την κορυφή είναι η συγκέντρωσή της (Poole, 2012).

Πρέπει να αναφερθεί πως υπάρχουν τρία σαφή πλεονεκτήματα όταν χρησιμοποιείται ένα αέριο ως κινητή φάση σε μια χρωματογραφική διάταξη:

- τα αέρια παρουσιάζουν μικρό ιξώδες, κάτι που κάνει δυνατή τη χρήση στηλών μεγάλου μήκους, με αποτέλεσμα την αύξηση της αποτελεσματικότητάς τους
- τα αέρια δεν αλληλεπιδρούν ιδιαίτερα με τις υπό προσδιορισμό ουσίες, κάτι που ανεξαρτητοποιεί την ισορροπία κατανομής μεταξύ των δύο φάσεων από το φέρον αέριο
- υπάρχουν πολλοί απλοί, ευαίσθητοι και ταχείας αποκρίσεως ανιχνευτές, ικανοί να παρακολουθούν τις συγκεντρώσεις των ουσιών στην αέρια φάση.

Για την ανίχνευση των επιθυμητών ουσιών σε πολύπλοκα μίγματα, εκτός από το διαχωρισμό τους γίνεται και ανίχνευσή τους. Γι' αυτό το λόγο δοκιμάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν δεκάδες είδη ανιχνευτών όπως ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID), ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD), ανιχνευτές φασματογραφίας μαζών (MS) κ.α. Οι πιο συνήθεις ανιχνευτές που συνοδεύουν μία αέρια χρωματογραφία είναι οι ανιχνευτές φασματογραφίας μαζών (GC-MS), όπου και παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία. Η σύζευξη συνήθως γίνεται με απ' ευθείας σύνδεση του αερίου χρωματογράφου με το όργανο της βοηθητικής αναλυτικής τεχνικής.

Η βάση του χρωματογραφικού διαχωρισμού είναι η στήλη. Για την αέρια χρωματογραφία υπάρχουν δυο είδη στηλών: οι στήλες πληρώσεως και οι τριχοειδείς στήλες. Πιο συχνά χρησιμοποιούνται οι τριχοειδείς στήλες, οι οποίες έχουν μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα από τις στήλες πληρώσεως. Από την άλλη πλευρά, οι στήλες πληρώσεως είναι ιδιαίτερα χρήσιμες όταν τα δείγματα είναι μεγάλου μεγέθους. Όσον αφορά την κατασκευή τους, αποτελούνται από συντηγμένο οξείδιο του πυριτίου, το οποίο επικαλύπτεται εξωτερικά από μια στρώση ενός πολυαμιδικού πολυμερούς για προστασία, ενώ όσο πιο στενές είναι τόσο αυξάνεται η διακριτική τους ικανότητα.



Εικόνα 2-9: Τριχοειδής στήλη (<https://quadrexcorp.com>)

Κρίσιμης σημασίας είναι και οι ανιχνευτές. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιείται περισσότερο είναι ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας, ο οποίος έχει και υψηλή ευαισθησία. Αν αντιπαρατεθεί με τον ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας, ο ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας είναι οικονομικός και παρουσιάζει καλή απόκριση, αλλά δεν έχει μεγάλη ευαισθησία (Christian et al, 2013).

Ο πρώτος διαχωρισμός εναντιομερών με αέρια χρωματογραφία έγινε το 1966 από τους Gil-Av et al.. Από τότε, η χειρόμορφη αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται ευρέως, ιδιαίτερα για εναντιομερή που είναι πτητικά και θερμικά σταθερά. Οι διαχωρισμοί εναντιομερών με αυτό το είδος χρωματογραφίας μπορούν να γίνουν είτε με άμεσο, είτε με έμμεσο τρόπο.

Ο έμμεσος τρόπος περιλαμβάνει παραγωγοποίηση της χειρόμορφης ένωσης με κατάλληλο αντιδραστήριο. Στη συνέχεια, τα διαστερομερή προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζονται σε στήλη, η οποία δεν είναι χειρόμορφη. Σημαντικά προαπαιτούμενα για το αντιδραστήριο είναι εκτός άλλων:

- να μη γίνεται ρακεμοποίηση κατά την παραγωγοποίηση
- να μην αποικοδομούνται τα διαστερομερή κατά τη διαχείριση και την εισαγωγή του δείγματος στην εργαστηριακή διάταξη
- το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης να είναι οπτικά καθαρό

Ο άμεσος τρόπος περιλαμβάνει μια μη ρακεμική χειρόμορφη στατική φάση, η οποία σχηματίζει παροδικά διαστερομερή ενδιάμεσα με την ουσία προς ανάλυση, με αλληλεπίδραση που συμβαίνει αστραπιαία, μέσω γρήγορης κινητικής, όσο και αναστρέψιμα, μέσω διακριτής θερμοδυναμικής.

Οι μη ρακεμικές χειρόμορφες στήλες είναι τριών ειδών:

- στήλες με παράγωγα χειρόμορφων αμινοξέων που συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου με τις ουσίες προς ανάλυση
- στήλες με μεταλλοοργανικά αντιδραστήρια, τα οποία σχηματίζουν σύμπλοκα με τις ουσίες προς ανάλυση
- στήλες από παράγωγα κυκλοδεξτρίνης,

Στήλες από παράγωγα κυκλοδεξτρίνης χρησιμοποίησαν οι Petrović et al., οι οποίοι δούλεψαν πάνω στη βελτιστοποίηση μιας μεθόδου αέριας χρωματογραφίας για το διαχωρισμό των εναντιομερών, μη στεροειδών αντιφλεγμονοειδών φαρμάκων. Τα φάρμακα

αυτά χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του πόνου και της φλεγμονής σε διάφορες ρευματικές και μυοσκελετικές παθήσεις.

Μια από τις σημαντικότερες ομάδες μη στεροειδών αντιφλεγμονοειδών φαρμάκων είναι παράγωγα του 2-αρυλο-προπιονικού οξέος ή “προυφένες”. Από αυτές, η ιβουπροφένη, η φαινοπρουφένη και η κετοπρουφένη είναι ιδιαίτερα δημοφιλείς. Στην αγορά κυκλοφορούν ως ρακεμικά μίγματα των ενεργών ουσιών, παρόλο που τα S- εναντιομερή είναι πιο δραστικά από τα R- εναντιομερή. Η χορήγηση αποκλειστικά του S- εναντιομερούς θα έχει ως αποτέλεσμα να χρειάζεται μικρότερη δόση του φαρμάκου και να εμφανίζονται σπανιότερα παρενέργειες (Petrović et al., 2005).

Τονίζεται ότι στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές ότι κατά το μεταβολισμό της ιβουπροφένης και της φαινοπρουφαίνης συμβαίνει χειρόμορφος μετασχηματισμός των σχετικά αδρανών R- εναντιομερών σε δραστικά S- εναντιομερή, ενώ κάτι τέτοιο δε φαίνεται να έχει παρατηρηθεί για την κετοπρουφαίνη. Απόρροια αυτού του γεγονότος θα μπορούσε να είναι η κυκλοφορία φαρμάκων με S-κετοπρουφαίνη ως δραστική ουσία, αλλά και η κινητικότητα της επιστημονικής κοινότητας γύρω από τη διαθεσιμότητα της S- ιβουπροφένης .

Από τα δεδομένα φαίνεται ότι η S-ιβουπροφένη χαρακτηρίζεται από μικρότερη γαστρεντερική τοξικότητα απ’ότι το ρακεμικό μίγμα. Επιπλέον, μελέτες δείχνουν ότι η χορήγηση προφαρμάκων προυφενών θα μπορούσε να μειώσει τον κίνδυνο γαστρεντερικών τραυματισμών. Έτσι, ως προφάρμακα έχουν εισαχθεί εστέρες αρυλοπροπιονικών οξέων.

Τα ενεργά εναντιομερή των προυφενών μπορούν να παρασκευαστούν με στερεοεκλεκτική εστεροποίηση του ρακεμικού καρβοξυλικού οξέος χρησιμοποιώντας ένζυμο, το οποίο μπορεί να αντιδράσει μόνο με το ένα εναντιομερές, δίνοντας τον αντίστοιχο εστέρα του καρβοξυλικού οξέος. Η απόδοση των εστέρων αναλύεται με αέρια χρωματογραφία (Petrović et al., 2005).

Ο διαχωρισμός των εναντιομερών των εστέρων των προυφενών (profen ester enantiomers, PEE) είναι πολύ σημαντικός για τη βελτιστοποίηση της βιοσύνθεσης των εναντιομερών και για τον έλεγχο της διαδικασίας. Επιπλέον, γνωρίζοντας ότι οι εστέρες των προυφενών είναι πιθανά προφάρμακα, η ανάλυσή τους σε σκευάσματα ή σε βιολογικά υγρά έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Με αυτό το σκοπό, είναι αναγκαία η ανάπτυξη μιας κατάλληλης αναλυτικής

μεθόδου. Εξετάζοντας τις ουσίες αυτές, λόγω της πτητικότητάς τους και για λόγους χαμηλού κόστους και ταχύτητας ανάπτυξης της μεθόδου, η αέρια χρωματογραφία φαίνεται να είναι πιο κατάλληλη επιλογή από άλλες μεθόδους διαχωρισμού.

Αρχικά, παρασκευάστηκαν μεθυλεστέρες της ιβουπροφαίνης, της φαινοπρουφαίνης και της κετοπρουφαίνης μέσω εστεροποίησης, ξεχωριστά για κάθε ουσία. Κατόπιν αυτού, 400  $\mu\text{L}$  από κάθε ουσία μεταφέρθηκαν σε φιάλη 2 mL και εισήχθησαν μέσω ένεσης στη χρωματογραφική διάταξη (Petrović et al., 2005).

Στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης της μεθόδου καθορίστηκε μια σειρά από κρίσιμες παραμέτρους:

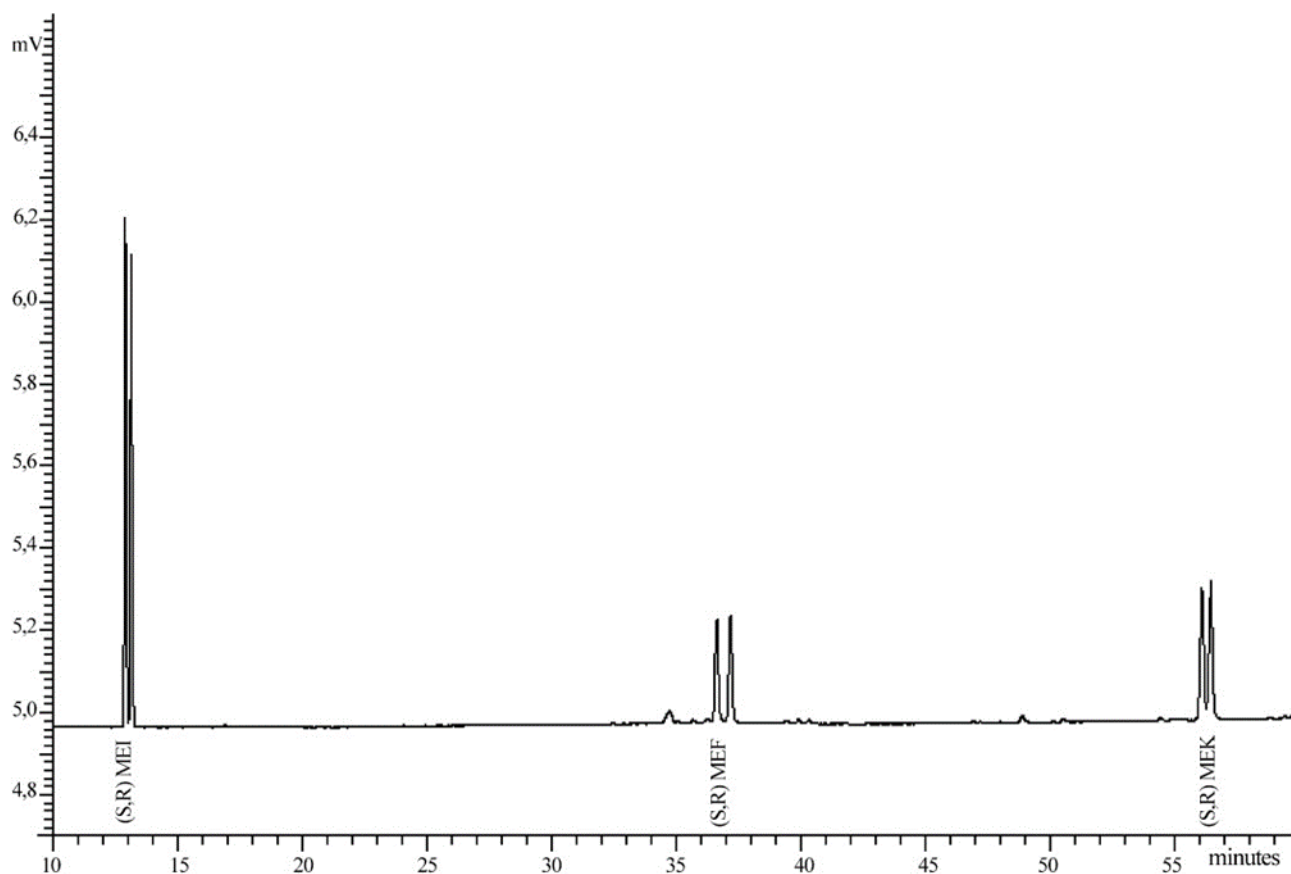
- ο τύπος του φέροντος αερίου
- ο τύπος της στατικής φάσης
- η ποσότητα του δείγματος
- το αρχικό σημείο του προγράμματος της θερμοκρασίας
- η πίεση του φέροντος αερίου
- η μεταβολή της θερμοκρασίας

Οι παράμετροι εξετάστηκαν ενδελεχώς. Τα πειράματα ξεκίνησαν με την επιλογή του φέροντος αερίου. Το πρώτο αέριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ήλιο, αλλά διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρξε διαχωρισμός ή δεν ήταν ξεκάθαρος, οπότε οι διαχωρισμοί έγιναν με υδρογόνο ως φέρον αέριο (Petrović et al., 2005).

Όσον αφορά τη θερμοκρασία, οι αρχικές θερμοκρασίες που εξετάστηκαν ξεκινούσαν από τους 130°C μέχρι τους 160°C και η θερμοκρασία ανέβαινε 1°C/min μέχρι την τελική θερμοκρασία των 220 °C. Παρατηρήθηκε ότι όσο αυξανόταν η αρχική θερμοκρασία, τόσο ασαφής ήταν ο διαχωρισμός των εναντιομερών. Ο διαχωρισμός των εναντιομερών του μεθυλεστέρα της κετοπρουφαίνης ήταν ο λιγότερο ευαίσθητος στην θερμοκρασία, καθώς ακόμα και στην υψηλότερη αρχική θερμοκρασία υπήρξε αποδεκτός διαχωρισμός τους. Αντιθέτως, τα ισομερή του μεθυλεστέρα της ιβουπροφαίνης, λόγω των μικρότερων χρόνων

κατακράτησης, επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από την αρχική θερμοκρασία. Τα εναντιομερή των μεθυλεστέρων της φαινοπρουφένης έδωσαν ξεκάθαρο διαχωρισμό για όλες τις αρχικές θερμοκρασίες (Petrović et al., 2005) .

Η επιρροή της σταδιακής ανόδου της θερμοκρασίας εξετάστηκε για διαστήματα μεταξύ του 1–1.8°C/min. Ως αρχική θερμοκρασία επιλέχθηκαν οι 145°C και πίεση 83 kPa. Ο διαχωρισμός των εναντιομερών των μεθυλεστέρων της κετοπρουφένης εξαρτάται ισχυρά και από αυτό, ενώ ο διαχωρισμός των εναντιομερών μεθυλεστέρων της ιβουπροφένης όχι. Το φαινόμενο αυτό συνδέεται με τους διαφορετικούς χρόνους κατακράτησής τους. Παρακάτω φαίνεται το χρωματογράφημα που λήφθηκε με αρχική θερμοκρασία τους 145°C και σταδιακή άνοδο με ρυθμό 1.2 °C/min μέχρι τους 215°C και πίεση 83 kPa.



**Διάγραμμα 2-4:** Χρωματογράφημα που λήφθηκε με αρχική θερμοκρασία τους 145°C και σταδιακή άνοδο με ρυθμό 1.2 °C/min μέχρι τους 215°C και πίεση 83 kPa. (Petrović et al., 2005).

Συνοψίζοντας, αναπτύχθηκε εναντιοεκλεκτική μέθοδος αέριας χρωματογραφίας, κατάλληλη για τον διαχωρισμό των εναντιομερών των μεθυλεστέρων της ιβουπροφένης, της κετοπρουφένης και της φαινοπρουφαίνης. Εκτός αυτού, μελετήθηκε η επίδραση κρίσιμων παραμέτρων στον διαχωρισμό και δόθηκαν συνθήκες όσο το δυνατόν πιο κοντά στις βέλτιστες. Από τα πειραματικά δεδομένα διαπιστώθηκε ότι ως φέρον αέριο πρέπει να χρησιμοποιείται υδρογόνο για να είναι επιτυχής ο διαχωρισμός και πως η θερμοκρασία είναι ακόμη ένας παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά τον διαχωρισμό. Προτείνεται επίσης για την επίσπευση του διαχωρισμού μείωση της αρχικής θερμοκρασίας και αύξηση της πίεσης (Petrović et al., 2005).

### **2.1.3 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας**

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin layer chromatography, TLC) είναι μια τεχνική που κατατάσσεται στην υγρή χρωματογραφία και αποτελεί τεχνική για το διαχωρισμό ενώσεων σε μίγματα, αλλά και την ταυτοποίησή τους. Ως κινητή φάση λειτουργεί ένας διαλύτης, ο οποίος λόγω τριχοειδών δυνάμεων, ρέει στη στατική φάση, η οποία είναι επιστρωμένη σε πλάκα. Η στατική φάση είναι συνήθως κάποιο προσροφητικό υλικό, στην πλειονότητα των περιπτώσεων silica gel ή alumina (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023).

Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται ως εξής: η ουσία προς προσδιορισμό μετακινείται στην στατική φάση υποβοηθούμενη από τον διαλύτη, διανύοντας μια απόσταση, η οποία σχετίζεται με την συγγένειά της με τις δυο φάσεις. Όταν υπάρχει ένα μίγμα ενώσεων, τα συστατικά του διανύουν διαφορετικές αποστάσεις πάνω στη στατική φάση, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους. Ο βαθμός προσρόφησης μιας ένωσης εξαρτάται κυρίως από τρεις παράγοντες: την πολικότητα της ένωσης, την πολικότητα του διαλύτη, αλλά και την ικανότητα του διαλύτη να τη μετακινεί πάνω στην στατική φάση.

Κατέχει σημαντική θέση στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, καθώς έχει τα εξής πλεονεκτήματα: είναι ταχεία, ευαίσθητη, ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται είναι απλός και οικονομικός και μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση ευρέως φάσματος ενώσεων. Ιδιαίτερη εφαρμογή βρίσκει στο να απαριθμηστούν οι ενώσεις που απαρτίζουν ένα μίγμα και η ταυτοποίηση ενώσεων (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023).



Εμβαθύνοντας στην αρχή της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, ο διαχωρισμός έγκειται στο ότι οι ουσίες του μίγματος προς ανάλυση προσροφώνται από τη στατική φάση. Όπως αναφέρθηκε, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες στατικές φάσεις είναι πολικά προσροφητικά υλικά, κυρίως οξείδιο του πυριτίου (silica gel,  $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) και οξείδιο του αργιλίου (alumina gel,  $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ), τα οποία έχουν μεγάλη προσροφητική επιφάνεια. Η κατασκευή των στατικών φάσεων γίνεται με επίστρωση εναιωρήματος στο νερό των προσροφητικών υλικών σε επίπεδες επιφάνειες και με την απομάκρυνση του νερού ξηραίνονται και σχηματίζουν λεπτές στερεές στιβάδες πάνω στην επίπεδη επιφάνεια. Για την καλύτερη προσκόλληση του προσροφητικού υλικού στην επίπεδη επιφάνεια προστίθεται γύψος ( $\text{CaSO}_4$ ) σε ποσοστό 10-13%. Προς διάκρισή τους, προσροφητικά που περιέχουν γύψο αναφέρονται με το γράμμα G, π.χ. silica gel G ή alumina gel G. Ως επίπεδη επιφάνεια χρησιμοποιούνται γυάλινα πλακίδια, πλαστικά πλακίδια ή πλακίδια από αλουμίνιο (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023).

Οι ουσίες προς διαχωρισμό προσροφώνται στη silica gel ή alumina gel μέσω ηλεκτροστατικών έλξεων μεταξύ των ομάδων στην επιφάνεια της silica gel ή alumina και αυτών, κάτι που αποτελεί επιφανειακό φαινόμενο. Μεταξύ του προσροφητικού υλικού και των ουσιών αναπτύσσονται κυρίως διαμοριακές δυνάμεις, διπόλου-διπόλου, ιόντος-διπόλου και δεσμοί υδρογόνου. Εφόσον οι δυο αυτές γέλες αποτελούνται από οξείδια, στην επιφάνειά τους βρίσκονται υδροξυλικές ομάδες ( $-\text{OH}$ ), μέσω των οποίων σχηματίζονται αυτοί οι δεσμοί. Πέραν αυτού, οι υδροξυλομάδες τους προσδίδουν και ισχυρή πολικότητα, κάτι που τους επιτρέπει να προσροφούν ισχυρά πολικά μόρια, αλλά και μη πολικά μόρια μέσω σχηματισμού ασθενών διαμοριακών δυνάμεων Wan der Waals. Ως προσροφητικά υλικά μπορεί να απαντηθούν και το Kieselguhr (γη διατόμων), η μαγνησία ( $\text{MgO}$ ), το πυριτικό μαγνήσιο, τα οποία όμως είναι σπανιότερα. Ακόμη, χρησιμοποιείται και κυτταρίνη, καθώς διαθέτει  $\text{OH}$  και αναπτύσσει πολικές αλληλεπιδράσεις. Όμως η κυτταρίνη προσροφά νερό σε ποσοστό 20% που δρα ως υγρή στατική φάση, με αποτέλεσμα ο μηχανισμός διαχωρισμού των ενώσεων να είναι η κατανομή τους μεταξύ των δύο υγρών της κινητής και της στατικής φάσης (νερό) (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023) .

Παράγοντες που επιδρούν στην χρωματογραφία λεπτής στιβάδας είναι:

- η πολικότητα του προσροφητικού υλικού,



- η πολικότητα της ένωσης
- η πολικότητα του διαλύτη της κινητής φάσης

Η πολικότητα του προσροφητικού υλικού είναι πολύ σημαντική, καθώς είναι το κριτήριο με το οποίο επιλέγεται το προσροφητικό υλικό που θα πραγματοποιήσει ένα συγκεκριμένο διαχωρισμό. Όπως προαναφέρθηκε στους διαχωρισμούς χρησιμοποιούνται κυρίως silica gel ή alumina gel. Η alumina gel χρησιμοποιείται όταν οι ενώσεις που πρόκειται να διαχωριστούν είναι μικρής πολικότητας (υδρογονάνθρακες, αλκυλαλογονίδια, αιθέρες, αλδεΐδες και κετόνες), καθώς έχει μεγαλύτερη πολικότητα από τη silica gel. Με αυτή τη λογική, η silica gel επιλέγεται, όταν διαχωρίζονται ισχυρά πολικά μόρια (αλκοόλες, αμίνες, καρβοξυλικά οξέα). Η alumina διατίθεται σε τρεις μορφές: όξινη (pH 4), βασική (pH 9) και ουδέτερη (pH 7,5) ανάλογα με τον διαχωρισμό που πρόκειται να πραγματοποιηθεί. Ωστόσο, ανάλογα με τις ανάγκες του διαχωρισμού, μπορεί να επιλεγεί άλλο προσροφητικό υλικό με διαφορετική πολικότητα από αυτά τα δύο υλικά. Τα προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται στην TLC με σειρά αυξανόμενης πολικότητας είναι:

φωσφορικό ασβέστιο < Kieselguhr < μαγνησία < alumina

Όπως είναι γνωστό η προσρόφηση μιας ένωσης στηρίζεται στις πολικές αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται μεταξύ αυτής και της στατικής φάσης. Επομένως, οι πολικές ενώσεις συγκρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση, διανύοντας μικρότερη απόσταση σε αυτήν, ενώ άπολες ενώσεις αλληλεπιδρούν ασθενώς με την στατική φάση και διανύουν μεγαλύτερη απόσταση σε αυτήν. Στον παρακάτω πίνακα έχουν καταταχθεί οι ομάδες οργανικών ενώσεων με αυξανόμενη σειρά πολικότητας:

**Πίνακας 2-6: Ταξινόμηση των οργανικών ουσιών με βάση την πολικότητά τους (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023)**

Κατηγορίας οργανικής ένωσης	Πολικότητα
Αλκάνια	μικρή
Αλκένια	
Αρωματικοί υδρογονάνθρακες	
Αλκυλαλογονίδια	
Αιθέρες	
Αλδεΐδες-κετόνες	
Εστέρες	
Αμίνες	
Αλκοόλες	
Φαινόλες	
Καρβοξυλικά οξέα	
Σουλφονικά οξέα	μεγάλη

Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η πολικότητα του διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί στην χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, ο οποίος ονομάζεται διαλύτης ανάπτυξης. Μάλιστα, λέγεται ότι είναι ο πιο καθοριστικός παράγοντας για το διαχωρισμό, καθώς είναι αυτός που τροποποιείται πιο εύκολα, έτσι ώστε ο διαχωρισμός να είναι επιτυχής (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023).

Για να μπορέσει ο διαλύτης ανάπτυξης να άγει μια ένωση, προϋπόθεση είναι να διασπάσει τις δυνάμεις μεταξύ της ένωσης και της στατικής φάσης και παράλληλα η ένωση να διαλύεται σε αυτόν. Μία ένωση κινείται πάνω στην στατική φάση, όταν δεν αλληλεπιδρά μαζί της. Παράλληλα, ο διαλύτης ανάπτυξης ανταγωνίζεται με την ένωση για τις θέσεις δέσμευσης πάνω στην στατική φάση. Αν ο διαλύτης δεσμεύεται ισχυρότερα στην στατική φάση, η ένωση θα παραμένει λιγότερο χρόνο δεσμευμένη σε αυτή και θα κινείται πιο γρήγορα. Η πολικότητά του είναι ένα μέτρο που καθορίζει την ικανότητά του να διασπά τις δυνάμεις που ασκούνται μεταξύ της στατικής φάσης και της ένωσης. Όσο πιο πολική είναι η ένωση, τόσο πιο ισχυρά προσροφάται από την στατική φάση και τόσο μεγαλύτερη πρέπει να είναι η πολικότητα του διαλύτη ανάπτυξης, ώστε να διασπάσει τις δυνάμεις που τη συγκρατούν σε αυτήν. Συνεπώς, οι πολικές ενώσεις λόγω της ισχυρότερης προσρόφησής τους απαιτούν πολικό διαλύτη, για να μετακινηθούν και οι άπολες ή ασθενώς πολικές ενώσεις, λόγω ασθενέστερης προσρόφησης, μπορούν να μετακινηθούν από διαλύτες μικρής πολικότητας (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023).

Οι σταθερές που καθορίζουν την πολικότητα ενός διαλύτη είναι η διηλεκτρική σταθερά ( $\epsilon$ ) και η διπολική ροπή ( $\mu$ ). Όσο μεγαλύτερες οι τιμές τους, τόσο πιο πολικός ο διαλύτης. Στον Πίνακα 2-7 παρουσιάζονται οι συνηθέστεροι διαλύτες ανάπτυξης με σειρά αυξανόμενης πολικότητας:

**Πίνακας 2-7: Κατάταξη των συχνά χρησιμοποιούμενων διαλυτών ανάπτυξης με αύξουσα πολικότητα (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023)**

Διαλύτες ανάπτυξης	Πολικότητα
Εξάνιο	μικρή
Πετρελαϊκός αιθέρας	
Τετραχλωράνθρακας	
Τολουόλιο	
Αιθέρας	
Χλωροφόρμιο	
Διχλωρομεθάνιο	
Οξικός αιθυλεστέρας	
Ακετόνη	
Αιθανόλη	
Μεθανόλη	
Νερό	μεγάλη

Άλλος παράγοντας που επηρεάζει την κίνηση της ένωσης προς ανάλυση στην στατική φάση είναι η διαλυτότητά της στον διαλύτη ανάπτυξης. Εδώ υπεισέρχεται πάλι η πολικότητα, παραπέμποντας στον γνωστό απλοποιημένο κανόνα: “τα όμοια διαλύουν όμοια”, εννοώντας ότι ένας πολικός διαλύτης διαλύει πολικές ενώσεις και ένας άπολος διαλύτης διαλύει άπολες ενώσεις (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023).

Προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός των επιθυμητών ουσιών, πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένας διαλύτης με την ανάλογη πολικότητα, συνήθως ενδιάμεση, για να είναι δυνατό να μετακινήσει κάθε ένωση σε διαφορετική απόσταση, εξασφαλίζοντας τον ξεκάθαρο διαχωρισμό τους. Σημειώνεται ότι, ένας πολικός διαλύτης μπορεί να μετακινήσει όλες τις ενώσεις μαζί, ενώ ένας άπολος διαλύτης ενδέχεται να μη μετακινήσει καμία ένωση από την αρχική της θέση.

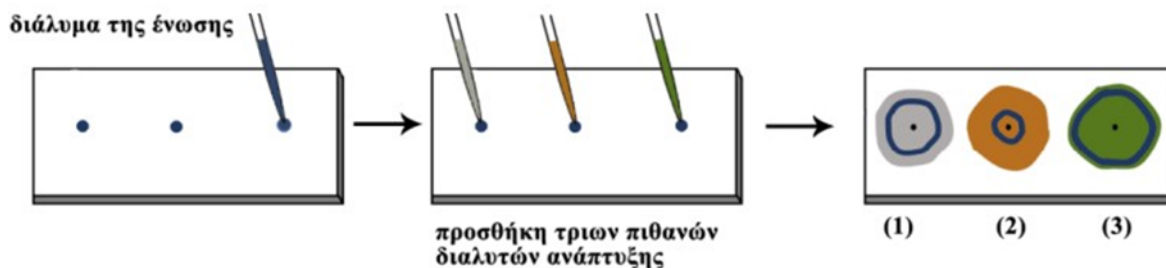
Πολλές φορές, είναι δυνατό κανείς από τους διαθέσιμους διαλύτες να έχει την επιθυμητή πολικότητα για τον διαχωρισμό που πρέπει να πραγματοποιηθεί. Αν συμβαίνει αυτό,

χρησιμοποιείται μείγμα διαλυτών σε διάφορες αναλογίες, κάτι που αποτελεί συχνό γεγονός στους διαχωρισμούς με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Η πολικότητα της τελικής κινητής φάσης εξαρτάται από την αναλογία των διαλυτών που θα χρησιμοποιηθούν. Δηλαδή, όσο μεγαλύτερο το ποσοστό του πολικότερου διαλύτη, τόσο πιο πολικό το μίγμα των διαλυτών, όσο μεγαλύτερο το ποσοστό του άπολου διαλύτη, τόσο μικρότερη η πολικότητα του μίγματος. Τελικώς, πρέπει να γίνει μια σειρά δοκιμών για την εύρεση του κατάλληλου διαλύτη ανάπτυξης, καθώς δεν είναι δυνατό κάτι τέτοιο να προβλεφθεί θεωρητικά (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023).

Η διαδικασία της χρωματογραφίας TLC περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- επιλογή του διαλύτη
- προετοιμασία του πλακιδίου,
- τοποθέτηση των δειγμάτων,
- προετοιμασία του θαλάμου ανάπτυξης,
- ανάπτυξη χρωματογραφήματος
- εμφάνιση κηλίδων

Για την επιλογή του διαλύτη ανάπτυξης, μια τυπική δοκιμασία είναι να τοποθετηθούν σε 3-4 σημεία ενός πλακιδίου μικρές ποσότητες από διάλυμα της ένωσης πάνω σε κάθε θέση και στη συνέχεια να προστεθεί, μέσω τριχοειδούς σωλήνα, μικρή ποσότητα από ένα διαφορετικό διαλύτη ανάπτυξης. Με αυτό τον τρόπο, θα σχηματιστούν κηλίδες της ένωσης σε κάθε θέση, καθώς θα κινούνται με μορφή δακτυλίου (Εικόνα 2-10). Η έκταση των δακτυλίων βοηθά στο να εκτιμηθεί ποιος διαλύτης θα χρησιμοποιηθεί και η καταλληλότητά του θα διαπιστωθεί όταν γίνει η ανάπτυξη του γραφήματος TLC (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023).



Εικόνα 2-10: Διαδικασία δοκιμής διαλυτών ανάπτυξης (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023)

Πειραματικώς, ως στατικές φάσεις χρησιμοποιούνται τα πλακίδια χρωματογραφίας, τα οποία έχουν συνήθως διαστάσεις 20×20 cm και για να τοποθετηθούν στο θάλαμο ανάπτυξης χρειάζεται να κοπούν. Σε πλακίδια που παραμένουν σε συσκευασία που έχει ανοιχθεί αρκετό καιρό, πρέπει να γίνει ενεργοποίησή τους με θέρμανση 15-30 λεπτά σε θερμοκρασία 105 °C ή σε θερμοκρασία που προσδιορίζει ο κατασκευαστής, ώστε να αποβάλλουν το νερό που έχουν απορροφήσει (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023).

Το μέγεθος του πλακιδίου που θα χρησιμοποιηθεί καθορίζεται από τον αριθμό των δειγμάτων που θα αναλυθούν ταυτόχρονα. Το πλάτος του πλακιδίου πρέπει να είναι τέτοιο, ώστε τα δείγματα να απέχουν μεταξύ τους 1 cm και περίπου 8-10 mm από τα άκρα του πλακιδίου. Συνήθως, ένα πλακίδιο διαστάσεων 8x3,5 cm επαρκεί για ανάλυση 3 δειγμάτων. Τα πλακίδια από αλουμίνιο κόβονται εύκολα στις επιθυμητές διαστάσεις με ψαλίδι, ωστόσο συνίσταται προσοχή να μην καταστραφεί η στατική φάση κατά την κοπή. Όταν κοπεί το πλακίδιο στο κατάλληλο μέγεθος, σχεδιάζεται με μολύβι (ποτέ στυλό) και χάρακα ευθεία γραμμή σε απόσταση 1-2 cm από το κάτω μέρος του, με προσοχή, ώστε να μην καταστραφεί η στατική φάση. Πάνω στη γραμμή σημειώνονται οι θέσεις που θα τοποθετηθούν τα δείγματα, οι οποίες πρέπει να απέχουν μεταξύ τους 1 cm και 8-10 mm από τα άκρα του πλακιδίου (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023).

Τα δείγματα τοποθετούνται στο πλακίδιο στις προεπιλεγμένες θέσεις με μορφή διαλύματος. Μικρή ποσότητα του δείγματος (περίπου 1 mg) διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη, ώστε να σχηματιστεί πολύ αραιό διάλυμα, ο οποίος δεν είναι απαραίτητο να είναι ο διαλύτης ανάπτυξης, ωστόσο πρέπει να διαλύει εύκολα το δείγμα και να εξατμίζεται εύκολα. Με τριχοειδή πιπέτα μικρής διαμέτρου λαμβάνεται μικρή ποσότητα από το διάλυμα. Όγκος διαλύματος 1-5  $\mu\text{L}$  είναι αρκετός για την ανάλυση του δείγματος με TLC. Στη συνέχεια, με

την τριχοειδή πιπέτα σε κάθετη θέση, αποτίθεται ποσότητα διαλύματος ελαφρά στο πλακίδιο, στην προσημειωμένη θέση του δείγματος. Το διάλυμα ρέει στην επιφάνεια του πλακιδίου και διαβρέχει την στατική φάση, σχηματίζοντας ένα δακτύλιο. Η ποσότητα του διαλύματος που θα αποτεθεί πρέπει να είναι τέτοια, ώστε να σχηματίσει δακτύλιο διαμέτρου 2 mm. Πρέπει να αποφεύγεται ο σχηματισμός μεγάλων κηλίδων, καθώς μειώνουν τη διαχωριστική ικανότητα της τεχνικής. Σύντομα ο διαλύτης εξατμίζεται, οπότε στο πλακίδιο παραμένει μόνο το δείγμα. Αν χρειάζεται να προστεθεί επιπλέον ποσότητα δείγματος, μπορεί να επαναληφθεί η διαδικασία αγγίζοντας την τριχοειδή πιπέτα ακριβώς στο ίδιο σημείο με την προηγούμενη φορά (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023).

Σε θάλαμο ανάπτυξης μπορεί να μετατραπεί και ένα ποτήρι ζέσεως, το οποίο θα σκεπαστεί με ύαλο ωρολογίου ή με φύλλο αλουμινόχαρτου, προς αποφυγή της εξάτμισης του διαλύτη εμφάνισης. Περιμετρικά στο εσωτερικό του θαλάμου ανάπτυξης τοποθετείται διηθητικό χαρτί που διαβρέχεται από τον διαλύτη ανάπτυξης και βοηθά στον ομοιόμορφο κορεσμό του δοχείου με ατμούς του διαλύτη ανάπτυξης. Στον θάλαμο ανάπτυξης προστίθεται διαλύτης ανάπτυξης μέχρι ύψους 0,5-1 cm. Η στάθμη του διαλύτη ανάπτυξης θα πρέπει να είναι χαμηλότερη από τη θέση του δείγματος στο πλακίδιο, ώστε αυτή να μην εμβαπτιστεί στον διαλύτη ανάπτυξης, όταν το πλακίδιο τοποθετηθεί στον θάλαμο ανάπτυξης. Ο θάλαμος ανάπτυξης αφήνεται να κορεστεί με ατμούς του διαλύτη ανάπτυξης, πριν τοποθετηθεί το πλακίδιο. Αυτό θα έχει συμβεί, όταν το διηθητικό χαρτί έχει εμποτιστεί πλήρως με τον διαλύτη ανάπτυξης (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023).

Η ανάπτυξη του χρωματογραφήματος είναι η κίνηση του διαλύτη πάνω στην στατική φάση, η οποία καταλήγει στην μετακίνηση και τελικά στο διαχωρισμό των ενώσεων. Στον θάλαμο ανάπτυξης τοποθετείται το πλακίδιο σε σχεδόν κατακόρυφη θέση. Το σύστημα αφήνεται σε ηρεμία και ο διαλύτης ανέρχεται την στατική φάση παρασύροντας τις ενώσεις. Σε αυτό το διάστημα ο θάλαμος ανάπτυξης δεν πρέπει να μετακινείται, ώστε να αποφεύγεται η ανατάραξη του διαλύτη που οδηγεί σε ανομοιόμορφη κίνησή του πάνω στην στατική φάση. Το πλακίδιο αποσύρεται από τον θάλαμο ανάπτυξης, όταν το μέτωπο του διαλύτη φθάσει περίπου 2cm από την κορυφή του. Σημειώνεται γρήγορα με μολύβι το ύψος που έφθασε το μέτωπο του διαλύτη πάνω στο πλακίδιο, πριν προλάβει ο διαλύτης να εξατμιστεί. Κατόπιν το πλακίδιο αφήνεται, ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης που έχει διαβρέξει την στατική φάση (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023).

Οι θέσεις των ενώσεων πάνω στο πλακίδιο της στατικής φάσης είναι ορατές μόνο αν οι ενώσεις είναι έγχρωμες. Έτσι, στην πλειονότητα των περιπτώσεων πρέπει το πλακίδιο να υποστεί επεξεργασία με κατάλληλα μέσα εμφάνισης, οπότε η θέση κάθε ένωσης εμφανίζεται με τη μορφή κηλίδας επάνω του. Τα μέσα εμφάνισης μπορούν να χωριστούν σε γενικής χρήσης, που εφαρμόζονται για την εμφάνιση όλων των ενώσεων και στα ειδικά αντιδραστήρια εμφάνισης, που χρησιμοποιούνται, όταν πρέπει να εμφανιστούν συγκεκριμένες κατηγορίες ενώσεων. Τα συνηθέστερα μέσα εμφάνισης είναι:

- Διάλυμα θεικού οξέος 50%. Το πλακίδιο ψεκάζεται με διάλυμα 50% θεικού οξέος και τοποθετείται σε θερμαντική πλάκα, με αποτέλεσμα να απανθρακώνονται οι χημικές ενώσεις, σχηματίζοντας μια σκουρόχρωμη κηλίδα στο σημείο του πλακιδίου που έχει μετακινηθεί η χημική ένωση.
- Ιώδιο. Το πλακίδιο τοποθετείται σε κλειστό δοχείο που περιέχει στερεό ιώδιο. Οι ατμοί του ιωδίου προσκολλώνται στο σημείο που έχει μετακινηθεί η χημική ένωση, με αποτέλεσμα σε αυτό το σημείο να σχηματίζεται σκουρόχρωμη κηλίδα. Εδώ τονίζεται ότι εμφάνιση της κηλίδας δεν είναι μόνιμη. Όταν το πλακίδιο αποσυρθεί από το δοχείο με το στερεό ιώδιο, το ιώδιο εξαχνώνεται και απομακρύνεται από το πλακίδιο, εξασθενώντας το χρώμα της κηλίδας. Για αυτό, όταν το πλακίδιο αποσυρθεί από το δοχείο με το ιώδιο, σημειώνεται με μολύβι η περίμετρος της κηλίδας.
- Υπεριώδης ακτινοβολία (UV). Αποτελεί το πιο κοινό και εύχρηστο μέσο εμφάνισης. Για να εφαρμοστεί η UV ακτινοβολία πρέπει να χρησιμοποιηθούν πλακίδια εμποτισμένα με φθορίζον υλικό (ZnS). Τα πλακίδια αυτά είναι διαθέσιμα στην αγορά με την ένδειξη F254. Για να εμφανιστούν οι θέσεις των ενώσεων, το πλακίδιο τοποθετείται κάτω από λαμπτήρα UV που εκπέμπει ακτινοβολία μήκους κύματος 254 nm. Με την υπεριώδη ακτινοβολία το φθορίζον υλικό του πλακιδίου εκπέμπει πράσινο χρώμα, ενώ στο σημείο που βρίσκεται η χημική ένωση εμφανίζεται σκουρόχρωμη κηλίδα. Η εμφάνιση της κηλίδας δεν είναι μόνιμη. Όταν απομακρυνθεί το πλακίδιο από τον λαμπτήρα UV, η κηλίδα δεν είναι πλέον ορατή. Για αυτό, όσο το πλακίδιο βρίσκεται κάτω από τον λαμπτήρα UV, σημειώνεται το περίγραμμα της κηλίδας με μολύβι.



Τα ειδικά αντιδραστήρια εμφάνισης είναι αντιδραστήρια που αντιδρούν εκλεκτικά με την ένωση που πρόκειται να εμφανιστεί. Το πλακίδιο ψεκάζεται με το κατάλληλο αντιδραστήριο εμφάνισης που αντιδρά με την ένωση και έτσι δημιουργείται έγχρωμη κηλίδα στο σημείο του πλακιδίου που έχει μετακινηθεί η ένωση. Παραδείγματος χάριν, ειδικό αντιδραστήριο εμφάνισης είναι η νυνιδρίνη, με την οποία εμφανίζονται αμινοξέα και αμίνες. Το πλακίδιο ψεκάζεται με διάλυμα 0,3% νυνιδρίνης σε βουτανόλη που περιέχει 3% οξικό και κατόπιν θερμαίνεται σε φούρνο στους 120 °C. Με υδατικό διάλυμα 1%  $\text{FeCl}_3$  εμφανίζονται οι φαινόλες, ενώ διάλυμα 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνης 0,5% σε 2M  $\text{HCl}$  χρησιμοποιείται στην ανάλυση αλδεϋδων ή κετόνων (Σπηλιόπουλος & Βάκρος, 2023).

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας χρησιμοποίησαν οι Vashistha & Bhushan για τον διαχωρισμό της ατενολόλης και της προπρανολόλης με τη χρήση n-ναπροξένης ως πρόσθετο, χρησιμοποιώντας μια άμεση και μια έμμεση προσέγγιση. Η ατενολόλη και η προπρανολόλη είναι εκλεκτικοί ανταγωνιστές του  $\beta_1$  υποδοχέα και συγκαταλέγονται στους πιο αποτελεσματικούς  $\beta$ -αναστολείς.

Οι  $\beta$ -αναστολείς είναι μια ομάδα συνθετικών χειρόμορφων ουσιών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της υπέρτασης, των στεφανιαίων καρδιακών ασθενειών, των καρδιακών αρρυθμιών και της στηθάγχης και δρουν εκλεκτικά στους  $\beta$ -αδρενεργικούς υποδοχείς της καρδιάς. Η ατενολόλη αναπτύχθηκε για να αντικαταστήσει την προπρανολόλη, η οποία είναι ο πρώτος  $\beta$ -αναστολέας κλινικής σημασίας και έδωσε το βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής στον εφευρέτη της, τον James Black (Vashistha & Bhushan, 2020).

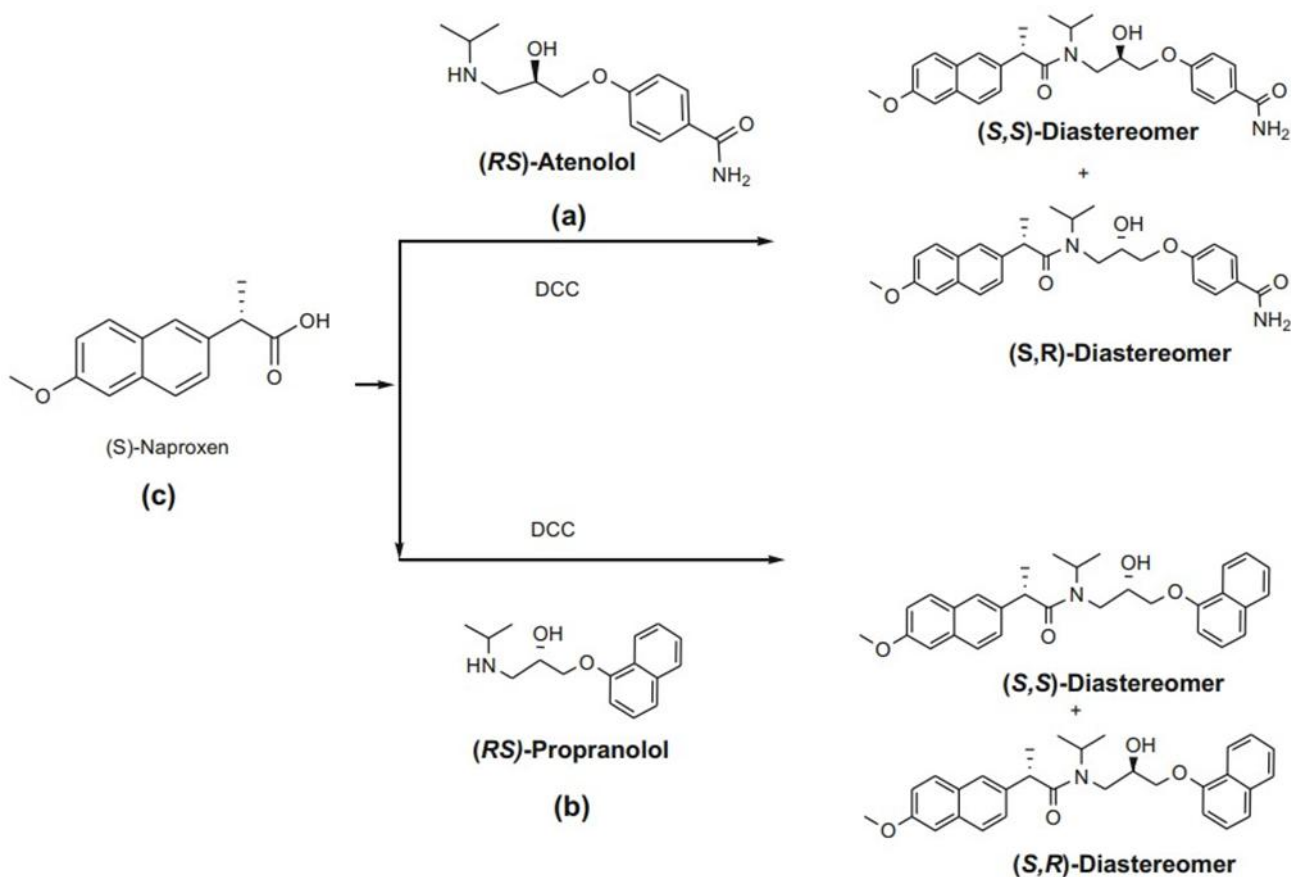
Γενικά, στους  $\beta$ -αναστολείς φαρμακολογικά αποτελεσματικό είναι το S- ισομερές, με 50 ως 500 φορές μεγαλύτερη δραστικότητα. Οι ερευνητές θέτουν το θέμα της στερεοεκλεκτικότητας στην κλινική φαρμακολογία και ιδιαίτερα στην φαρμακοκινητική. Υπενθυμίζουν πως στον οργανισμό τα εναντιομερή φάρμακα συνήθως αντιδρούν στερεοεκλεκτικά με τον στόχο τους, είτε είναι υποδοχέας, είτε ένζυμο ή αντίσωμα, τονίζοντας για μια ακόμη φορά τη σημασία της εναντιομερικής καθαρότητας και την ανάγκη για μεθόδους διαχωρισμού των εναντιομερών.

Προχωρώντας στην άμεση και στην έμμεση προσέγγιση των διαχωρισμών με υγρή χρωματογραφία, στην οποία συγκαταλέγεται και η TLC, τονίζεται πως υπάρχουν



πλεονεκτήματα για τη χρήση και των δυο μεθόδων, αλλά και περιορισμοί ανάλογα με την περίπτωση, οι οποίοι αφορούν την πηγή και την ποσότητα του διαθέσιμου δείγματος, τη χημική δομή του αναλύτη και τη διαθεσιμότητα των εργαστηριακών δομών. Η TLC είναι απλή και με χαμηλό κόστος και υπάρχει η δυνατότητα λήψης φωτογραφιών του χρωματογραφήματος, ως απόδειξη του διαχωρισμού (Vashistha & Bhushan, 2020).

Η ναπροξένη είναι ένα α-αρυλο προπιονικό οξύ και επίσης ένα μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο και είναι εύκολα διαθέσιμη ως καθαρό (S)-(+)- εναντιομερές. Έχει χρησιμοποιηθεί στο χρωματογραφικό διαχωρισμό πλήθους ρακεμικών δειγμάτων, είτε με άμεση, είτε με έμμεση προσέγγιση. Από τη μελέτη της βιβλιογραφίας, οι ερευνητές αποφάσισαν να τη χρησιμοποιήσουν ως ευέλικτο αντιδραστήριο για τον διαχωρισμό των δυο β-αναστολέων. Η καινοτομία του διαχωρισμού έγκειται στην χρήση της ναπροξένης ως πρόσθετο σε μη χειρόμορφη στατική φάση και ως αντιδραστήριο παραγωγοποίησης (Εικόνα 2-11) για την παρασκευή διαστερεομερών παραγώγων της κάθε ουσίας σε μη χειρόμορφη TLC κανονικής φάσης (Vashistha & Bhushan, 2020).



Εικόνα 2-11: Αντίδραση παραγωγοποίησης της της ατενολόλης και της προπρανολόλης με S-ναπροξέν (Vashistha & Bhushan, 2020)

Δείγματα για ανάλυση αποτέλεσαν δισκία διαθέσιμα στην αγορά με δραστική ουσία ατενολόλη και προπρανολόλη. Ο χειρισμός των δειγμάτων έχει περιγραφεί σε προηγούμενη δουλειά τους και έχει ως εξής: τα δισκία κονιορτοποιήθηκαν σε γουδί και στη συνέχεια προστέθηκε σε μεθανόλη οπότε και πήρε τη μορφή εναιωρήματος. Το μίγμα υποβλήθηκε σε υπέρηχους για 15 λεπτά προς εξαγωγή της δραστικής ουσίας. Μετά υπέστη φυγοκέντρωση στις 3000 rpm για 10 λεπτά και στο υπερκείμενο έγινε εκχύλιση με μεθανόλη και εκ νέου φυγοκέντρωση. Το συνδυασμένο υπερκείμενο υγρό συμπυκνώθηκε υπό κενό και αφέθηκε να ψυχθεί μέχρι να εμφανιστούν κρύσταλλοι. Το υγρό που παρέμεινε μεταγγίστηκε σε άλλο δοχείο και οι κρύσταλλοι ξηράθηκαν. Ακολούθησε περαιτέρω καθαρισμός με ανακρυστάλλωση με μεθανόλη. Στη συνέχεια τα δείγματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Vashistha & Bhushan, 2015).

Η άμεση προσέγγιση περιελάμβανε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, όπου η (S)-ναπροξένη λειτουργούσε ως χειρόμορφο πρόσθετο σε στατική φάση silica gel, χωρίς να δημιουργεί ομοιοπολικούς δεσμούς. Παρασκευάστηκαν πηκτές silica gel σε διαλύματα (S)-ναπροξένης με διαφορετικές συγκεντρώσεις και επιστρώθηκαν σε γυάλινες πλάκες. Οι πλάκες ενεργοποιήθηκαν με θέρμανση όλη τη νύκτα στους  $60 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Στις πλάκες τοποθετήθηκαν 10  $\mu\text{L}$  αναλύτη και δίπλα εναντιομερικά καθαρή (R)-ατενολόλη. Για την εμφάνιση των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκαν καθαρισμένοι, ξηροί και επικαλυμμένοι ορθογώνιοι γυάλινοι θάλαμοι. Τα χρωματογραφήματα ξηράθηκαν στους  $40^\circ\text{C}$  σε φούρνο και αφέθηκαν να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Δοκιμάστηκε ένας αριθμός κινητών φάσεων που μπορεί να περιλάμβαναν και δυο, τρεις ή τέσσερις διαλύτες, όπως ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, διχλωρομεθάνιο, χλωροφόρμιο και νερό σε διαφορετικές αναλογίες. Το pH του συστήματος των διαλυτών ρυθμίστηκε με την προσθήκη οξικού οξέος ή τριαιθυλαμίνης (Vashistha & Bhushan, 2020).

Τα υπολείμματα του silica gel με ατενολόλη από τα πλακίδια εκχυλίστηκαν πρώτα με χλωροφόρμιο για να απομακρυνθεί η ναπροξένη (η ατενολόλη είναι αδιάλυτη στο χλωροφόρμιο). Η silica gel στέγνωσε σε θερμοκρασία δωματίου και μετά εκχυλίστηκε με μεθανόλη και μόνο το εναντιομερές πέρασε στο διάλυμα, καθώς η ατενολόλη είναι διαλυτή στη μεθανόλη. Το διάλυμα συμπυκνώθηκε σε κενό και αφέθηκε για να σχηματιστούν κρύσταλλοι.

Για την απομόνωση της προπρανολόλης ακολουθήθηκε μια παρόμοια διαδικασία. Ως πρώτο βήμα συγκεντρώθηκαν τα υπολείμματα του silica gel που αντιστοιχούσαν στην κηλίδα της προπρανολόλης και η ναπροξένη απομακρύνθηκε με εκχύλιση σε χλωροφόρμιο, στο οποίο η προπρανολόλη είναι αδιάλυτη. Ακολούθως, το silica gel στέγνωσε σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια έγινε εκχύλιση της προπρανολόλης με αιθανόλη, στην οποία είναι διαλυτή. Το διάλυμα που παράχθηκε συμπυκνώθηκε υπό κενό και αφέθηκε έτσι ώστε να δημιουργηθούν κρύσταλλοι και καθαρίστηκε με ανακρυστάλλωση σε μεθανόλη (Vashistha & Bhushan, 2020).

Προχωρώντας στην έμμεση προσέγγιση, παρασκευάστηκε διάλυμα (S)-ναπροξένης, 1, 3-δικυκλοεξυλκαρβοδιυμιδίου και  $\text{NaHCO}_3$  και υποβλήθηκε σε υπέρηχους για 5 λεπτά περίπου. Στη συνέχεια προστέθηκε ρακεμικό μίγμα ατενολόλης και εκτέθηκε σε

μικροκύματα για δυο λεπτά. Οι στατικές φάσεις για την χρωματογραφία προετοιμάστηκαν επιστρώνοντας την πηκτή της silica gel G (silica gel και γύψος) σε γυάλινα πλακίδια. 10  $\mu\text{L}$  από το μίγμα των διαστερομερών παραγώγων του κάθε αναλύτη τοποθετήθηκε σε κάθε πλακίδιο. Δοκιμάστηκε ένα εύρος κινητών φάσεων που μπορεί να περιλάμβαναν και δύο, τρεις ή τέσσερις διαλύτες, όπως ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, διχλωρομεθάνιο, χλωροφόρμιο και νερό σε διαφορετικές αναλογίες.

Δευτερεύων σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθεί και ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζει, μια σειρά παραγόντων, το διαχωρισμό. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της ναπροξένης, του pH και η θερμοκρασίας. Προς μελέτη του παράγοντα της συγκέντρωσης της ναπροξένης, κατά την εκτέλεση της άμεσης προσέγγισης, κατασκευάστηκαν πλακίδια TLC με διαφορετικές συγκεντρώσεις 30, 40, 50, 60, 70 mM. Ο πιο ξεκάθαρος διαχωρισμός παρατηρήθηκε με τα πλακίδια που περιείχαν ναπροξένη συγκέντρωσης 50 mM. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις, δεν υπήρξε ξεκάθαρος διαχωρισμός και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε εμφάνιση ουράς στις κηλίδες (Vashistha & Bhushan, 2020) .

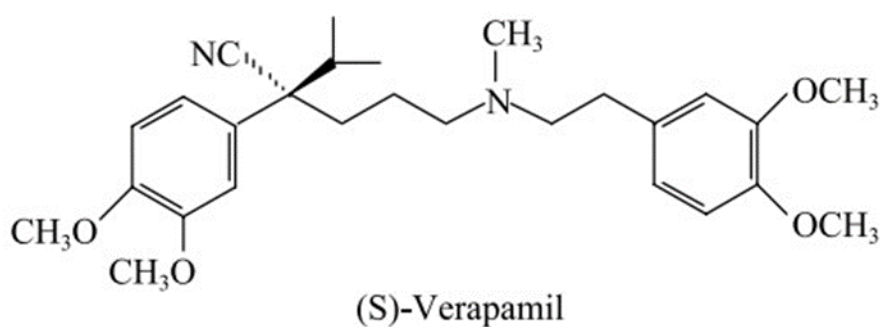
Η μελέτη της επίδρασης του pH πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας υπ'οψιν ότι το pKa της ναπροξένης είναι 4,15, κάτι που υποδεικνύει ότι η ουσία βρίσκεται σε μορφή ανιόντος. Το pH του συστήματος διαλυτών ρυθμίστηκε στο 4, 5, 6, 7 και 8 προσθέτοντας οξικό οξύ ή τριαιθυλαμίνη. Ο πιο ξεκάθαρος διαχωρισμός παρατηρήθηκε σε pH 5, αντίθετα σε pH 4 και 6 δεν υπήρξε ξεκάθαρος διαχωρισμός και σε pH 7 δεν υπήρξε καθόλου διαχωρισμός.

Για να προσδιοριστεί η επίδραση της θερμοκρασίας, λήφθηκαν χρωματογραφήματα σε ένα εύρος θερμοκρασιών και η επίδραση κρίθηκε από τα αποτελέσματα των χρωματογραφημάτων: το μέγεθος των κηλίδων, το σχήμα τους και την καθαρότητά τους. Οι υπόλοιπες συνθήκες διατηρήθηκαν και ο θάλαμος ανάπτυξης αφέθηκε να έρθει σε ισορροπία με την κινητή φάση για περίπου 20 λεπτά σε διαφορετικές θερμοκρασίες (10, 20 και 30 °C). Ξεκάθαρος διαχωρισμός παρατηρήθηκε περίπου στους 20 °C ( $\pm 2$ ), θερμοκρασία που υποβοήθησε τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις που απαιτούνται για το σχηματισμό διαστερομερών και την κατάλληλη κινητικότητά τους (Vashistha & Bhushan, 2020) .

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα των πειραμάτων δείχνουν ότι η έμμεση προσέγγιση, όπου η ναπροξένη χρησιμοποιείται ως αντιδραστήριο παραγωγοποίησης είχε  $R_s > 2.4$ , ενώ η άμεση προσέγγιση, όπου λειτουργεί ως πρόσθετο στην στατική φάση, είχε  $R_s < 1.9$ . Πλεονέκτημα της άμεσης προσέγγισης είναι ότι ο διαχωρισμός και η απομόνωση των εναντιομερών είναι ευκολότεροι. Ακόμη, ο διαχωρισμός και η απομόνωση των εναντιομερών παρατηρήθηκαν σε ένα εύρος χαμηλότερο από τα προβλεπόμενα όρια (1%) για τα φαρμακευτικά προϊόντα στη βιομηχανία. Η μέθοδος είναι απλή, βελτιστοποιείται εύκολα και μπορεί να εφαρμοστεί ως μέθοδος ρουτίνας σε εργαστηριακό περιβάλλον (Vashistha & Bhushan, 2020).

Ένα άλλο εναντιομερές φαρμακευτικό παρασκεύασμα, το οποίο διαχωρίστηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας είναι η βεραπαμίλη (Εικόνα 2-12). Η βεραπαμίλη αποτελεί παρεμποδιστή του καναλιού ασβεστίου. Χορηγείται για τη θεραπεία καρδιαγγειακών νοσημάτων όπως η υπέρταση και η στηθάγχη. Έχουν καταγραφεί ανάμεσα στις παρενέργειές της ναυτία, ζαλάδα, πονοκέφαλοι, κούραση και νευρική κατάσταση.

Η βεραπιμίλη είναι μια τεταρτοταγής αμίνη με ένα ασύμμετρο άνθρακα και δυο εναντιομερή. Συνήθως στην αγορά διατίθεται ως ισομοριακό ρακεμικό μίγμα των εναντιομερών της, αν και η S-(−)-βεραπιμίλη είναι 10-20 φορές ισχυρότερη από την R-(+)-βεραπιμίλη και διαφέρουν και στη βιοδιαθεσιμότητά τους (Bhushan & Gupta, 2005).



Εικόνα 2-12: Δομή της S-βεραπιμύλης (Bhushan & Gupta, 2005)

Το ρακεμικό μίγμα της βεραπιμίλης έχει διαχωριστεί στα δυο εναντιομερή της, άμεσα ή έμμεσα, με μια σειρά χρωματογραφικών τεχνικών, όπως παραδείγματος χάριν η HPLC. Οι Bhushan και Gupta χρησιμοποίησαν χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, με ένα μακροκυκλικό αντιβιοτικό, την βανκομυκίνη ως χειρόμορφο πρόσθετο (Bhushan & Gupta, 2005).

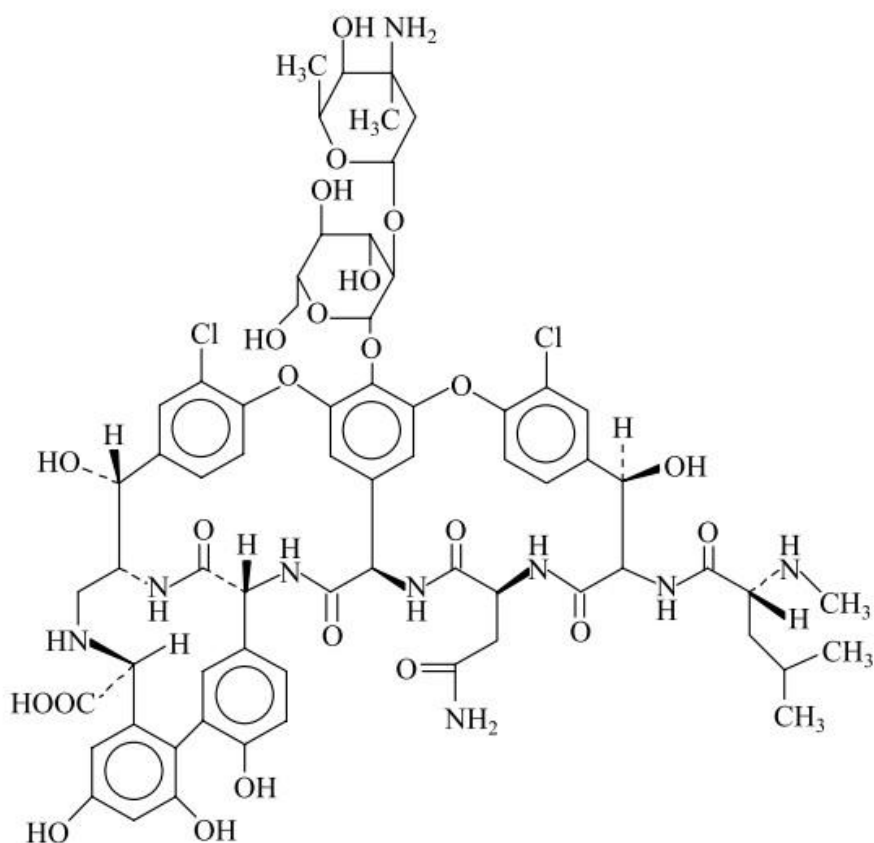
Τα γλυκοπεπτιδικά αντιβιοτικά έχουν μελετηθεί διεξοδικά ως χειρόμορφοι επιλογείς στην HPLC, TLC και στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση, διότι:

- είναι επαμφοτερίζοντα, δηλαδή περιέχουν ομάδες ιόντων τα οποία έχουν όξινες αλλά και βασικές τιμές pKa
- το καθένα έχει λειτουργικότητα που ευνοεί τις στερεοεκλεκτικές αλληλεπιδράσεις
- τα περισσότερα έχουν σχετικά μικρή απορρόφηση υποβάθρου (background absorbance) σε μήκη κύματος μεγαλύτερα των 250 nm, κάτι που επιτρέπει την ανίχνευσή τους με υπεριώδη ακτινοβολία
- περιέχουν υδρόφοβα και υδρόφιλα τμήματα, καθιστώντας τα υδατοδιαλυτά ή σε υδροοργανικούς διαλύτες
- είναι ιδιαιτέρως σταθερά σε άνυδρες συνθήκες στους 0°C, επαρκώς σταθερά σαν στερεά σε υδατικά διαλύματα και ρυθμιστικά διαλύματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης και σταθερά με τις αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν κατά την HPLC.

Η βανκομυκίνη (Εικόνα 2-13) είναι ένα τρικυκλικό γλυκοπεπτίδιο που λειτουργεί ως αντιβιοτικό και παράγεται από το μύκητα *Amiclatopsis orientalis*. Είναι ισχυρό αντιβιοτικό που δρα έναντι των Gram-θετικών βακτηρίων. Είναι διαλυτή στο νερό, μερικώς διαλυτή σε μεθανόλη και αδιάλυτη σε μεγαλύτερες αλκοόλες. Όταν διαλύεται στο νερό έχει pH περίπου 4. Ως τρικυκλικό γλυκοπεπτίδιο έχει τρία μακροκυκλικά μέρη που αποτελούνται από 5 αρωματικούς δακτυλίους. Έχει επίσης 2 πλευρικές αλυσίδες, ένα διμερές ενός υδρογονάνθρακα και ένα N-μέθυλο αμινοξύ. Στο μόριό της υπάρχουν: 18 στερεογονικά κέντρα, 9 υδροξυλομάδες, δύο αμινομάδες (η μια πρωτοταγής και η άλλη

δευτεροταγής), 7 αμιδικές ομάδες και 2 άτομα χλωρίου τα οποία είναι υποκαταστάτες σε δύο διαφορετικούς δακτυλίους (Bhushan & Gupta, 2005).

Από τις ομάδες που αναφέρθηκαν, κάποιες έχουν βασικό και κάποιες όξινο χαρακτήρα και όλες μπορούν να ιονιστούν. Ακόμη, κάποιες ομάδες είναι υδροφοβικές, μια ιδιότητα που έχει ιδιαίτερη χρησιμότητα για τις εναντιοεκλεκτικές αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ χειρόμορφων αναλυτών. Πιο συγκεκριμένα, στη βανκομυκίνη το μήκος, το σχήμα και η διάταξη αυτών των ομάδων της προσδίδουν ένα ημιάκαμπτο ανοικτό χώρο, σημαντικό για την εναντιοεκλεκτικότητα. Επιπλέον, η βανκομυκίνη έχει pI περίπου 7 (σε pI μικρότερο του 7 είναι κατιόν) και λειτουργεί σε εύρος pH 4-9 (σε μικρότερα και μεγαλύτερα pH είναι ασταθής) (Bhushan & Gupta, 2005).



Εικόνα 2-13: Δομή της βανκομυκίνης (Bhushan & Gupta, 2005).

Δείγμα αποτέλεσε ρακεμικό μίγμα υδροχλωρικής βεραπιμίλης που εξήχθη από φαρμακευτικό παρασκεύασμα με εκχύλιση, με απόλυτη αιθανόλη και στη συνέχεια υπέστη κρυσταλοποίηση υπό κενό. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε silica gel G, η οποία



παρασκευάστηκε προσθέτοντας την πηκτή της silica gel σε διάλυμα βανκομυκίνης και επιστρώνοντάς το σε γυάλινα πλακίδια. Το επιθυμητό pH επετεύχθη προσθέτοντας οξικό οξύ ή διάλυμα αμμωνίας και τα πλακίδια ξηράθηκαν κατά τη διάρκεια της νύκτας. Μίγματα ακετονιτριλίου, μεθανόλης και νερού σε διαφορετικές αναλογίες αξιολογήθηκαν ως κινητές φάσεις. Τα χρωματογραφήματα αναπτύχθηκαν στους  $18 \pm 2^\circ\text{C}$  για 15–20 λεπτά. Στη συνέχεια αφέθηκαν να στεγνώσουν, ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου και οι κηλίδες ανιχνεύθηκαν με ιώδιο (Εικόνα 2-14) (Bhushan & Gupta, 2005) .



**Εικόνα 2-14: Χρωματογράφημα TLC διαχωρισμού των εναντιομερών της βεραπιμίλης (Bhushan & Gupta, 2005)**

Πριν πραγματοποιηθεί η χρωματογραφία επιβεβαιώθηκε η καθαρότητα του ρακεμικού μίγματος μέσω της εύρεσης του σημείου τήξεώς του και της οπτικής του στροφής. Η κινητή φάση με την οποία επετεύχθη ο διαχωρισμός των εναντιομερών της βεραπιμίλης ήταν ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και νερό σε αναλογία 15:2.5:2.5 v/v σε πλακίδια με silica gel και χειρόμορφο επιλογέα βανκομυκίνη συγκέντρωσης 0,34 mM. Οι δυο κηλίδες εμφανίστηκαν με ιώδιο και οι κηλίδες που αντιστοιχούσαν στα εναντιομερή της βεραπιμίλης αφαιρέθηκαν από τα πλακίδια και εκλούστηκαν με αιθανόλη, η κάθε κηλίδα ξεχωριστά. Το ολικό διάλυμα για κάθε κηλίδα διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε σε κενό. Στη συνέχεια, τα διαλύματα



εξετάστηκαν με πολωσίμετρο και βρέθηκαν οπτικά καθαρές. Ακόμη, οι ειδικές στροφές των (+) και (-) εναντιομερών ήταν +8,8 και -8,8, κάτι που συμφωνεί με την βιβλιογραφία (Bhushan & Gupta, 2005).

Εκτός από το διαχωρισμό των εναντιομερών, μελετήθηκε και η επίδραση της συγκέντρωσης της βανκομυκίνης στο χρωματογραφικό διαχωρισμό. Με τη χρήση γνωστών ποσοτήτων βεραπιμύλης πραγματοποιήθηκε TLC και οι κηλίδες που εμφανίστηκαν αναλύθηκαν όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Η ποσότητα του κάθε εναντιομερούς βρέθηκε μέσω καμπύλης βαθμονόμησης και μετρήσεων οπτικής στροφής. Ο καλύτερος διαχωρισμός έγινε όταν η συγκέντρωση της βανκομυκίνης ήταν 0,34 mM. Όταν η συγκέντρωση μειώθηκε στα 0,27 mM, η κηλίδα παρουσίασε ουρά και δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός, ενώ στα 0,20 mM εμφανίστηκε μόνο μια κηλίδα. Το ίδιο συνέβη όταν η συγκέντρωση αυξήθηκε στα 0,50 mM, ενώ όταν αυξήθηκε στα 0,40 mM οι κηλίδες που εμφανίστηκαν είχαν σχήμα 8.

Επιπλέον, η ανάκτηση του προϊόντος, η εκλεκτικότητα και συνεπώς ο διαχωρισμός των εναντιομερών επηρεάζεται από τη σύνθεση των διαλυτών της κινητής φάσης. Για να προσδιοριστεί πώς ακριβώς συμβαίνει αυτό, οι ερευνητές μετέβαλλαν τη σύσταση των διαλυτών της κινητής φάσης, οι οποίοι ήταν ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και νερό. Όταν μεταβλήθηκε η αναλογία ακετονιτρίλιου – νερού με σταθερή την ποσότητα της μεθανόλης δεν υπήρξε διαχωρισμός. Παρομοίως και όταν μεταβαλλόταν η αναλογία ακετονιτρίλιου – μεθανόλης με σταθερή την ποσότητα του νερού δεν υπήρξε διαχωρισμός (Bhushan & Gupta, 2005).

Από τη βιβλιογραφία, φαίνεται ότι οι χειρόμορφοι διαχωρισμοί επηρεάζονται από το pH και τη θερμοκρασία. Έτσι, οι ερευνητές διεξήγαγαν TLC σε διαφορετικές θερμοκρασίες: 5, 10, 15, 20, 25 and 30°C και παρατηρήθηκε ότι ο πιο ξεκάθαρος διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε στους  $18 \pm 2^\circ\text{C}$ , καθώς στους 15°C εμφανίστηκε μια επιμηκυμένη κηλίδα και ο διαχωρισμός δεν ήταν ξεκάθαρος, στους 25°C εμφανίστηκε μια κηλίδα σε σχήμα 8 και σε θερμοκρασίες κάτω των 10°C και άνω των 30°C δεν υπήρξε διαχωρισμός.

Για τη μελέτη της επίδρασης της μεταβολής του pH, προετοιμάστηκαν υάλινες πλάκες για TLC σε pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 και 9. Ο πιο ξεκάθαρος διαχωρισμός παρατηρήθηκε σε pH 6, εντούτοις, σε pH 5 η κηλίδα παρουσίασε ουρά και δε παρατηρήθηκε διαχωρισμός. Σε pH

6, στο οποίο επιτεύχθει ο διαχωρισμός, η βανκομυκίνη είναι κατιόν και οι καταλύτες πιθανών ανιόντα, ευνοώντας τον διαχωρισμό των εναντιομερών λόγω των δυνάμεων Coulomb που αναπτύσσονται. Έτσι, εικάζεται ότι ο λόγος που δε παρατηρείται διαχωρισμός σε pH μικρότερα του 6 είναι ότι ο αναλύτης πρωτονιώνεται και τα μόριά του είναι πλέον ουδέτερα. Από την άλλη πλευρά, σε pH μεγαλύτερα του 6 η βανκομυκίνη και ο αναλύτης είναι ανιόντα. Προτείνεται λοιπόν ότι ο διαχωρισμός των εναντιομερών είναι αποτέλεσμα του σχηματισμού μιας υδροφοβικής «τσέπης» με τη βοήθεια του ημιάκαμπτου ανοικτού χώρου της βανκομυκίνης και των δυνάμεων Coulomb μεταξύ των ιόντων. Ο διαχωρισμός μπορεί να συμβαίνει μέσω σχηματισμού δεσμών π-π, δεσμών υδρογόνου, εγκλεισμό στην υδροφοβική τσέπη, επιδράσεις μεταξύ των διπόλων, στεरिकές αλληλεπιδράσεις ή συνδυασμό αυτών, όπως αναφέρεται πολλές φορές στη βιβλιογραφία (Bhushan & Gupta, 2005).

Για την εύρεση του ορίου ανίχνευσης παρασκευάστηκε διάλυμα βεραπιμίλης συγκέντρωσης  $10^{-2}$  M και τοποθετήθηκαν ποσότητες 5, 10, 15, 20 και 25  $\mu$ L. Χρησιμοποιώντας την τεχνική υπό μελέτη, οι ερευνητές το ελάχιστο που κατάφεραν να ανιχνεύσουν ήταν 0.147  $\mu$ g του ρακεμικού μίγματος, κάτι που αντιστοιχεί σε 0.074  $\mu$ g του κάθε εναντιομερούς. Οι ερευνητές κατέληξαν πως πρόκειται για μια απλή και άμεση μέθοδο, η οποία είναι πιο οικονομική σε σχέση με άλλες χρωματογραφικές τεχνικές (Bhushan & Gupta, 2005).

#### 2.1.4 Χρωματογραφία υπερκρίσιμου υγρού

Η χρωματογραφία υπερκρίσιμου υγρού ( Supercritical fluid Chromatography, SFC) είναι ένα είδος χρωματογραφίας όπου η κινητή φάση είναι ένα υπερκρίσιμο υγρό. Η χρήση υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα ως στατική φάση για χρωματογραφία και η ανάπτυξη του πρώτου εξοπλισμού έγιναν από τον Klesper τη δεκαετία του 1960, ανοίγοντας ένα νέο κεφάλαιο για τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς.

Η διαλυτική ικανότητα ενός υπερκρίσιμου υγρού συνδέεται άμεσα με την πυκνότητά του, η οποία μπορεί να ρυθμιστεί μέσω της θερμοκρασίας και της πίεσής του, αλλά και με την προσθήκη ενός οργανικού διαλύτη (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο κ.α.). Αυτό δίνει τη δυνατότητα στους ερευνητές να ρυθμίσουν τις ιδιότητες του διαλύτη. Λόγω του μικρότερου

ιζώδους και της μεγαλύτερης διάχυσης των υπερκρίσιμων υγρών σε σχέση με τους κοινούς διαλύτες, η ταχύτητα της κινητής φάσης αυξάνεται, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερη απόδοση διεργασίας, σε σύγκριση με την υγρή χρωματογραφία.

Όσον αφορά το διοξείδιο του άνθρακα ως κινητή φάση, έχει δυο σημαντικά πλεονεκτήματα:

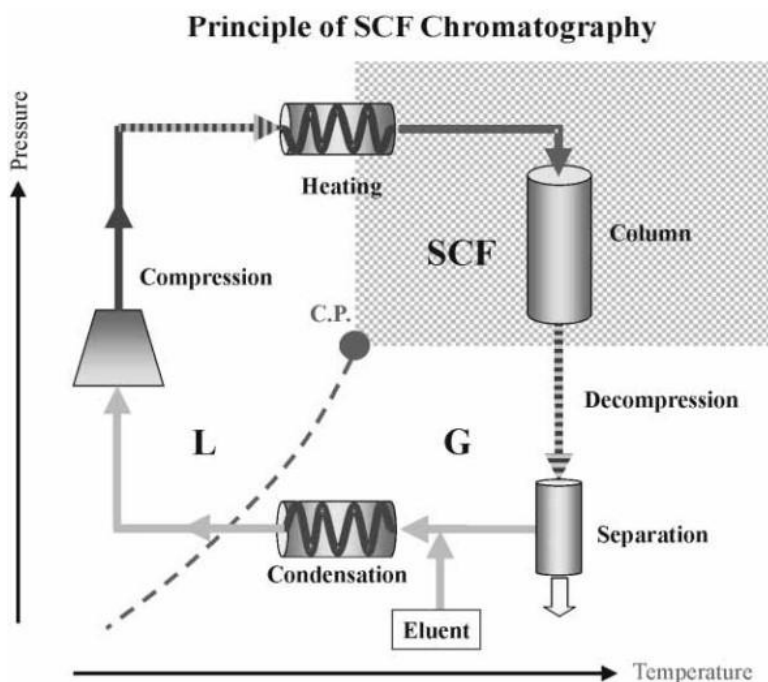
- μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα από το καθαρό προϊόν και να ανακυκλωθεί με μείωση της πίεσης των συλλεχθέντων κλασμάτων,
- μειώνει ή εξαλείφει τελείως το πρόβλημα της απομάκρυνσης και της ανάκτησης του διαλύτη, κάτι που απαντάται στην υγρή χρωματογραφία.

Πολύ σημαντικό είναι επίσης και το γεγονός ότι η χρήση του διοξειδίου του άνθρακα δεν επιβαρύνει το φαινόμενο του θερμοκηπίου. Προέρχεται κυρίως από τη χημική βιομηχανία ως παραπροϊόν φυσικών διεργασιών, όπως ζύμωση ποτών. Ακόμη, καθώς είναι μια ουσία που βρίσκεται υπό κανονικές συνθήκες στα οικοσυστήματα, είναι ένας πράσινος και βιοσυμβατός διαλύτης (Majewski et al. 2005).

Η αρχή της χρωματογραφίας υπερκρίσιμου υγρού (Εικόνα 2-15) έχει ως εξής: αρχικά το υγροποιημένο αέριο συμπυκνώνεται στην επιθυμητή πίεση και ρυθμίζεται στην απαιτούμενη διαλυτική ικανότητα και εκλεκτικότητα διαχωρισμού. Στη συνέχεια, ο συμπιεσμένος διαλύτης θερμαίνεται και περνά από μια χρωματογραφική στήλη, η οποία διατηρείται στην ίδια θερμοκρασία. Η θερμοκρασία αυτή θα πρέπει να είναι κοντά στην κρίσιμη θερμοκρασία (critical temperature  $T_c$ ), καθώς σε εκείνες τις θερμοκρασίες παρουσιάζει σημαντικές αλλαγές στις ιδιότητές του, δηλαδή αλλαγές στην πυκνότητα και στη διαλυτική του ικανότητα σε σχέση με την πίεση.

Η επιλογή της σωστής πίεσης και θερμοκρασίας πρέπει να γίνει με προσοχή, διότι οι μεταβολές στη διαλυτική ικανότητα τροποποιούν την ανάκτηση των προϊόντων και την εκλεκτικότητα. Για αυτό το λόγο συχνά ένας καθαρός υπερκρίσιμος διαλύτης αναμιγνύεται με ένα συμβατικό οργανικό διαλύτη που ονομάζεται συνδιαλύτης. Όταν η κινητή φάση αφήνει τη στήλη, αποσυμπιέζεται κάτω από το κρίσιμο σημείο της και το υπερκρίσιμο υγρό μετατρέπεται σε αέριο. Αν ο διαχωρισμός γίνεται μόνο με διοξείδιο του άνθρακα ως κινητή φάση, η διαλυτική του ικανότητα μειώνεται δραστικά, οδηγώντας την διαλυμένη ουσία να μετατραπεί σε ίζημα, διαχωρίζοντας τη από το διαλύτη. Αν υπάρχει και συνδιαλύτης, όταν απομακρύνεται το διοξείδιο του άνθρακα, η διαλυμένη ουσία ανακτάται από τον υγρό

συνδιαλύτη. Τέλος, ο διαλύτης που έχει γίνει αέριο υγροποιείται και προετοιμάζεται για συμπίεση (Majewski et al., 2005).



Εικόνα 2-15: Σχηματική αναπαράσταση της αρχής της SFC (Majewski et al. 2005).

Η χρωματογραφία υπερκρίσιμου υγρού είναι η ίδια με της HPLC, συνήθως με κάποιες μικρές τροποποιήσεις, οι οποίες δεν εμποδίζουν την διενέργεια HPLC με αυτή τη χρωματογραφική διάταξη. Μάλιστα, οι στήλες που χρησιμοποιούνται έχουν σχεδιαστεί για HPLC και μετατρέπονται από τους κατασκευαστές ή τους ερευνητές. Αν και κάθε διάταξη

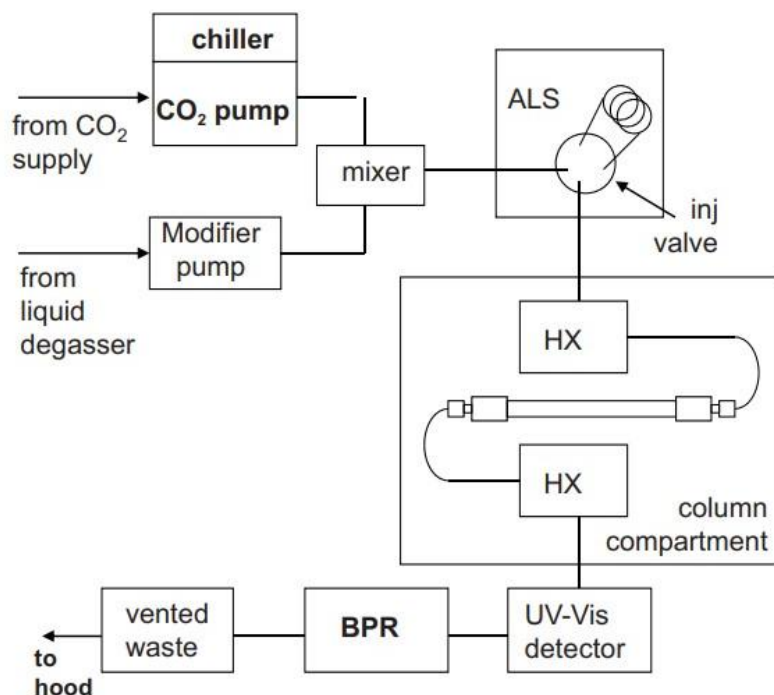
HPLC μπορεί να τροποποιηθεί για SFC, η απόδοση της SFC θα έχει μεγάλες αποκλίσεις, ανάλογα με την οργανολογική προσέγγιση που χρησιμοποιείται.

Μια τυπική διάταξη SFC (Εικόνα 2-16) περιλαμβάνει:

- απαερωτή του διαλύτη (solvent degasser)
- τροποποιητική αντλία (modifier pump)
- αυτοματο δειγματολήπτη (autosampler)
- φούρνο/στήλη (oven/column compartment)
- ανιχνευτή

Η πλειονότητα των διατάξεων SFC χρησιμοποιούν δυο αντλίες: μια αντλία για το διοξείδιο του άνθρακα και μια τροποποιητική. Ο σκοπός των αντλιών είναι να ελέγχουν τον ογκομετρικό ρυθμό της ροής και τη σύνθεσή της.

Η SFC πραγματοποιείται συνήθως ως τεχνική κανονικής φάσης, όπου οι αναλύτες διαχωρίζονται μέσω πολικών αλληλεπιδράσεων. Έτσι, οι στήλες που χρησιμοποιούνται είναι πολικές, αν και η στατική φάση θα πρέπει να επιλέγεται με βάση την ομοιότητά της με τον αναλύτη. Παραδείγματος χάριν, πολλά φυσικά προϊόντα αποτελούνται από μακρές υδρογονανθρακικές αλυσίδες και για το διαχωρισμός τους κατάλληλη θα ήταν μια στήλη C<sub>18</sub>. Η σύνθεση του τροποποιητή συχνά αυξάνεται σε σχέση με το χρόνο, έτσι ώστε να αυξηθεί η πολικότητα της κινητής φάσης και η ισχύς του διαλύτη. Τα μέρη που χρειάζονται τις πιο εκτενείς τροποποιήσεις είναι οι αντλίες και ο αυτόματος δειγματολήπτης, καθώς η εισερχόμενη κινητή φάση και η κεφαλή της αντλίας ψύχονται συνήθως στους 4–5 °C για να εξασφαλιστεί ότι η κινητή φάση, η οποία είναι τις περισσότερες φορές διοξείδιο του άνθρακα, θα παραμείνει ως υπερκρίσιμο υγρό κατά τη διαδικασία της άντλησης (Berger, 2015).



Εικόνα 2-16: Οργανολογία χρωματογραφίας υπερκρίσιμου υγρού (Majewski et al., 2005)

Η χρωματογραφία υπερκρίσιμου υγρού είναι συμβατή με ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται και στην υγρή και στην αέρια χρωματογραφία, αν και υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις, οι οποίες αφορούν τη σύνθεση της κινητής φάσης (Chester & Pinkston, 2002). Επομένως, χρησιμοποιούνται ανιχνευτές UV, ειδικοί χειρόμορφοι ανιχνευτές, φασματομετρικοί ανιχνευτές μάζας, ανιχνευτές διάθλασης φωτός και ανιχνευτές ιονισμού φλόγας (Majewski et al., 2005).

## 2.2 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση

Η συμβατική ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά για το διαχωρισμό βιομορίων και συνήθως δε προτιμάται για το διαχωρισμό μικρών μορίων. Ωστόσο, αν και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση επικεντρώνεται κυρίως στο διαχωρισμό βιοπολυμερών, είναι μια τεχνική που εξετάζεται και για μικρότερα μόρια, καθώς προσφέρει τα εξής πλεονεκτήματα:

- μεγάλη αποτελεσματικότητα διαχωρισμού
- πολύ μικρό απαιτούμενο όγκο δείγματος προς ανάλυση
- η εκλεκτικότητα του διαχωρισμού είναι παραπλήσια της HPLC
- η οργανολογία της είναι πλήρως αυτοματοποιημένη
- ο μηχανισμός του διαχωρισμού είναι απλός

Πρέπει να αναφερθεί όμως πως η ευαισθησία των ανιχνευτών είναι σχετικά χαμηλή όσο μειώνεται η ποσότητα του δείγματος, εκτός από τους ανιχνευτές φθορισμού υποβοηθούμενου από laser (laser-induced fluorescence) ή τους ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές. Όταν πρόκειται για διαχωρισμούς, οι τεχνικές της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης είναι κατάλληλες για αναλύτες που έχουν χαμηλούς λόγους διαχωρισμού, κάτι που κατά κανόνα ισχύει για τα εναντιομερή. Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση διενεργείται σε ομογενές

διάλυμα και αυτό το διάλυμα μπορεί να τροποποιηθεί ώστε να βρεθεί το βέλτιστο για τον εκάστοτε διαχωρισμό (Majewski et al., 2005)..

Έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός τεχνικών τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

- τριχοειδής ηλεκτοφόρηση ζώνης (capillary zone electrophoresis, CZE)
- ισοταχοφόρηση (isotachopheresis, ITP)
- ισοηλεκτρική εστίαση (isoelectric focusing)
- τριχοειδής ηλεκτροφόρηση πηκτής (capillary gel electrophoresis, CGE)
- ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (electrokinetic chromatography, EKC)
- ηλεκτροχρωματογραφία

Αν και πρόκειται για διακριτές τεχνικές, υπάρχουν περιπτώσεις που τα όρια μεταξύ τους δεν είναι ξεκάθαρα. Παραδείγματος χάριν, ένας διαχωρισμός φορτισμένων μορίων σε ένα τριχοειδές επικαλυμμένο με μια ουσία συνήθως κατατάσσεται στην τριχοειδή ηλεκτοφόρηση ζώνης, αλλά εάν η κατανομή των αναλυτών στο επικαλυμμένο στρώμα προκαλεί διαχωρισμό, μπορεί να είναι ηλεκτροχρωματογραφικός διαχωρισμός. Ωστόσο, αυτό ίσως και να αποτελεί τη μοναδική εξαίρεση. Για το διαχωρισμό εναντιομερών, πιο συχνά, χρησιμοποιούνται η τριχοειδής ηλεκτοφόρηση ζώνης και η ηλεκτροκινητική χρωματογραφία. Από τη βιβλιογραφία, φαίνεται ότι ο διαχωρισμός είναι άμεσος, χωρίς να παραγωγοποιούνται πρώτα τα εναντιομερή (Majewski et al., 2005)..

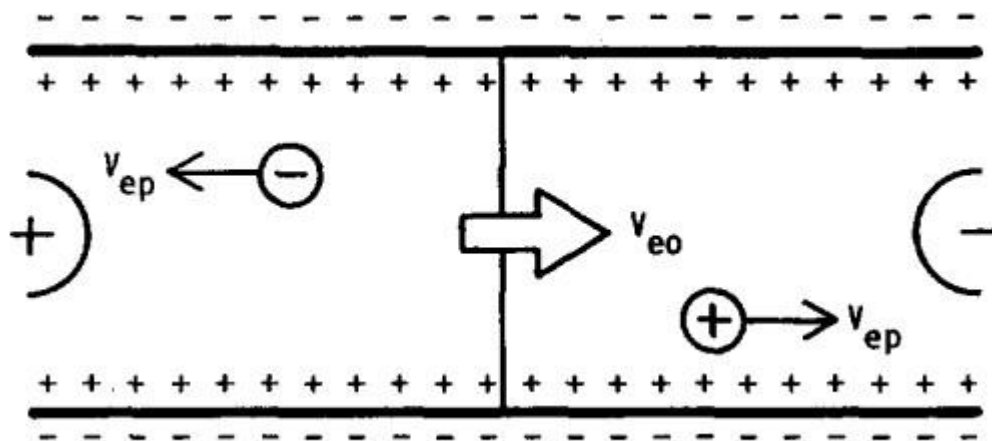
Η βάση του διαχωρισμού στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζώνης είναι η διαφορά στις ηλεκτροφορητικές κινητικότητες. Επειδή τα εναντιομερή έχουν τις ίδιες ηλεκτροφορητικές κινητικότητες, για να διαχωριστούν θα πρέπει να προστεθεί κάποιος χειρόμορφος παράγοντας συμπολοκοποίησης για να σχηματιστούν διαστερομερή. Έχει αναφερθεί ότι χρησιμοποιούνται, μεταξύ άλλων, χηλικά μεταλλικά σύμπλοκα, κυκλοδεξτρίνες και ολιγοσακχαρίτες. Ο διαχωρισμός στην ηλεκτροκινητική χρωματογραφία συμβαίνει καθώς



τα φορτία κατανέμονται μεταξύ της ψευδοστατικής φάσης και της υδατικής φάσης που την περιβάλλει. Έχει αναφερθεί και εδώ η χρήση κυκλοδεξτρίνων, χειρόμορφων επιφανειοδραστικών ουσιών και άλλων προσθέτων. Στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση πηκτής, η μήτρα πηκτής που χρησιμοποιείται δεν λειτουργεί ως κόσκινο όπως στο διαχωρισμό πολυμερών, αλλά ακινητοποιεί τους διάφορους χειρόμορφους επιλογείς όπως οι κυκλοδεξτρίνες και ο διαχωρισμός βασίζεται πάλι στη διαφορά δυναμικού. Στην ηλεκτροχρωματογραφία παράγωγα κυκλοδεξτρίνης συνδέονται στα τοιχώματα του τριχοειδούς και λειτουργούν ως στατική φάση (Majewski et al., 2005).

### 2.2.1 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2-17, η αρχή της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης, αν υποθεθεί ότι η επιφάνεια του τριχοειδούς είναι αρνητική, είναι ότι τα θετικά φορτισμένα ιόντα του αναλύτη μεταναστεύουν προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο και τα αρνητικά φορτισμένα μεταναστεύουν στην αντίθετη κατεύθυνση λόγω της επίδρασης ηλεκτρικού πεδίου. Η κατεύθυνση της μετανάστευσης της ηλεκτροοσμωτικής ροής εξαρτάται από το πρόσημο του φορτίου της επιφάνειας του ηλεκτροδίου ή το δυναμικό ζ (Terabe, 1994) .



Εικόνα 2-17: Αρχή της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης (Terabe, 1994)

Όταν το δυναμικό ζ είναι αρνητικό, η ηλεκτροοσμωτική ροή μεταναστεύει προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο. Σε ουδέτερες ή αλκαλικές συνθήκες με ένα απλό τριχοειδές τηγμένης silica, η ηλεκτροοσμωτική ροή είναι αρκετά δυνατή, ώστε να μεταφέρει ακόμα και τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα του αναλύτη στο αρνητικό ηλεκτρόδιο. Ο διαχωρισμός έγκειται

στη διαφορά κινητικότητας και η ηλεκτροοσμωτική ροή από μόνη της δεν επηρεάζει την εκλεκτικότητα του διαχωρισμού, καθώς μεταφέρει όλα τα φορτία με την ίδια ταχύτητα.

Ο διαχωρισμός εναντιομερών με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζώνης συμβαίνει με τρεις τρόπους:

- συμπλοκοποίηση με ανταλλαγή υποκαταστατών
- συμπλοκοποίηση με κυκλοδεξτρίνες
- συμπλοκοποίηση με αιθέρες-στέμματα
- συμπλοκοποίηση με ολιγοσακχαρίτες (Terabe, 1994)

Οι Mikuš et al. χρησιμοποίησαν την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζώνης για τον προσδιορισμό των εναντιομερών της αμλοπιδίνης. Όπως αναφέρθηκε και στην ανάλυση της έρευνας των Jibuti et al. είναι ένα παράγωγο διυδρο – πυριδίνης, το οποίο δρα ως αναστολέας καναλιών ασβεστίου και χορηγείται για την θεραπεία της υπέρτασης και της στεφανιαίας νόσου. Η παρεμποδιστική δραστηριότητα αποδίδεται κυρίως στην S (+) –αμλοπιδίνη. Πιθανολογείται ότι η S – (+) – αμλοπιδίνη είναι δυο φορές πιο δραστική από το ρακεμικό μίγμα, στο να ανταγωνίζεται την στένωση που δημιουργείται από το ασβέστιο. Σχετικά με την R – (-) – αμλοπιδίνη, δεν είναι φαρμακολογικά αδρανής ως αναστολέας, αλλά είναι ένας ισχυρός αναστολέας της μετανάστευσης των λειών μυϊκών κυττάρων. Γι' αυτό το λόγο, είναι προτιμότερο να χορηγείται αποκλειστικά το S- εναντιομερές και όχι ρακεμικό μίγμα (Mikuš et al., 2008) .

Σκοπός των ερευνητών ήταν η ανάπτυξη μιας εναντιοεκλεκτικής μεθόδου για αξιόπιστο προσδιορισμό των εναντιομερών της αμλοπιδίνης σε φαρμακευτικά σκευάσματα, κατάλληλη για αναλύσεις ρουτίνας. Έτσι, για την ανίχνευση των ουσιών επιλέχθηκε ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (diode array detector, DAD), ο οποίος δίνει τη δυνατότητα χαρακτηρισμού της καθαρότητας των φασμάτων των διαχωρισμένων ζωνών και την απόκλιση των αναμιγμένων ζωνών. Αυτή η μέθοδος προτάθηκε ως εναλλακτική για τον προσδιορισμό εναντιομερών σε φάρμακα σε σύγκριση με την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση με

ανίχνευση με υπεριώδη ακτινοβολία μονού μήκους κύματος (single wavelength UV detection).

Αρχικά, παρασκευάστηκαν τα διαλύματα των ηλεκτρολυτών τιτλοδοτώντας γλυκίνη παρουσία υδροξυαιθυλοκυτταρίνης και οξικού οξέος, για να υπάρχει το απαιτούμενο pH. Στη συνέχεια, κατάλληλη ποσότητα κυκλοδεξτρίνης διαλύθηκε σε αυτά τα διαλύματα για να σχηματιστεί το τελικό ρυθμιστικό διάλυμα για την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζωνών. Τα διαλύματα των ηλεκτρολυτών είχαν φιλτραριστεί πριν τη χρήση τους μέσω μεμβρανών. Στην έρευνα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής κυκλοδεξτρίνες: β-κυκλοδεξτρίνη, 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη και καρβοξυαιθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη. Ως ρακεμική πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε μονοϋδρική υδροχλωρική αμλοπιδίνη. Ως δείγματα χρησιμοποιήθηκαν φαρμακευτικά σκευάσματα που περιείχαν αμλοπιδίνη (Agen, Amilostad, Cardilopin και Norvasc) που ήταν διαθέσιμα σε φαρμακεία και σε όλα αναγραφόταν ότι περιείχαν 10 mg αμλοπιδίνη ως δραστική ουσία (Mikuš et al., 2008) .

Το διάλυμα αναφοράς της αμλοπιδίνης παρασκευάστηκε διαλύοντας 10 mg σκόνης σε 10 ml απιονισμένου οξέος. Μετά την παρασκευή αποθηκεύτηκε στους -8°C στο ψυγείο. Από αυτό παρασκευάστηκαν με αραιώση διαλύματα 5–100 mg/ml (5, 25, 50, 75, 100) για την κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης. Για τα πειράματα της ανάκτησης της αμλοπιδίνης, το πρότυπο διάλυμα μεταφέρθηκε σε μήτρα άλλου διαλύματος. Έτσι προετοιμάστηκαν δείγματα σε τρεις συγκεντρώσεις, 10, 40 και 80 mg/ml. Για να διαπιστωθεί αν οι μετρήσεις που λήφθηκαν από το ίδιο δείγμα έχουν μεγάλη απόκλιση οι παράμετροι λειτουργίας ήταν ως εξής: η συγκέντρωση του παράγοντα συμπλοκοποίησης (48–52 mg/ml) και του φέροντος κατιόντος (48–52 mmol/l) και το pH (3.1–3.3).

Για τα πειράματα προσδιορισμού της αμλοπιδίνης 6 φαρμακευτικά δισκία ζυγίστηκαν με ακρίβεια, κονιορτοποιήθηκαν σε γουδί και το ισοδύναμο μάζας μιας ταμπλέτας διαλύθηκε σε 10 ml απιονισμένου νερού. Μετά από δυο ώρες μηχανικής ανάδευσης το μίγμα υποβλήθηκε σε υπέρηχους για 10 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά (Mikuš et al., 2009).

Οι κύριες παράμετροι λειτουργίας βελτιστοποιήθηκαν. Επρόκειτο για τον τύπο και τη συγκέντρωση της κυκλοδεξτρίνης, το φέρον κατιόν και το αντισταθμίζον ανιόν και το pH του ρυθμιστικού διαλύματος. Η βελτιστοποίηση έγινε υπό τη σκοπιά της μέγιστης

αποτελεσματικότητας διαχωρισμού και παράλληλα της ελάχιστης ηλεκτρομετανάστευσης και φαινομένων θερμικής διασποράς και επαρκούς καθαρότητας του διαχωρισμού.

Παρατηρήθηκε ότι υψηλή συγκέντρωση του φέροντος κατιόντος βοήθησε στο να μη προσροφάται η αμλοπιδίνη στα τοιχώματα του τριχοειδούς. Αυξάνοντας τη συγκέντρωση της HP-b-CD ο διαχωρισμός ήταν πιο ξεκάθαρος, ωστόσο αυξήθηκε ο χρόνος ανάλυσης. Το πιο όξινο pH αύξησε την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού, ο διαχωρισμός ήταν πιο ξεκάθαρος και μείωσε το χρόνο ανάλυσης. Η ηλεκτροοσμωτική διασπορά καταστάλθηκε με το να επικαλυφθούν τα τοιχώματα του τριχοειδούς με μεθυλοϋδροξυκυτταρίνη (m-HEC). Οι βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού για την αμλοπιδίνη, με υψηλή αποτελεσματικότητα διαχωρισμού και μικρό χρόνο ανάλυσης ήταν 50 mmol/l γλυκίνης και το pH ρυθμίστηκε στο 3 με οξικό οξύ (168 mmol/l), 50 mg/ml HP-b-CD και 0.2% (w/v) m-HEC (Mikuš et al., 2009). Η βελτιστοποιημένη μέθοδος τριχειδούς ηλεκτροφόρησης ζωνών βελτιστοποιήθηκε και τα δεδομένα των αποτελεσμάτων δίνονται στον Πίνακα 2-6:

**Πίνακας 2-6: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης της μεθόδου (Mikuš et al., 2009)**

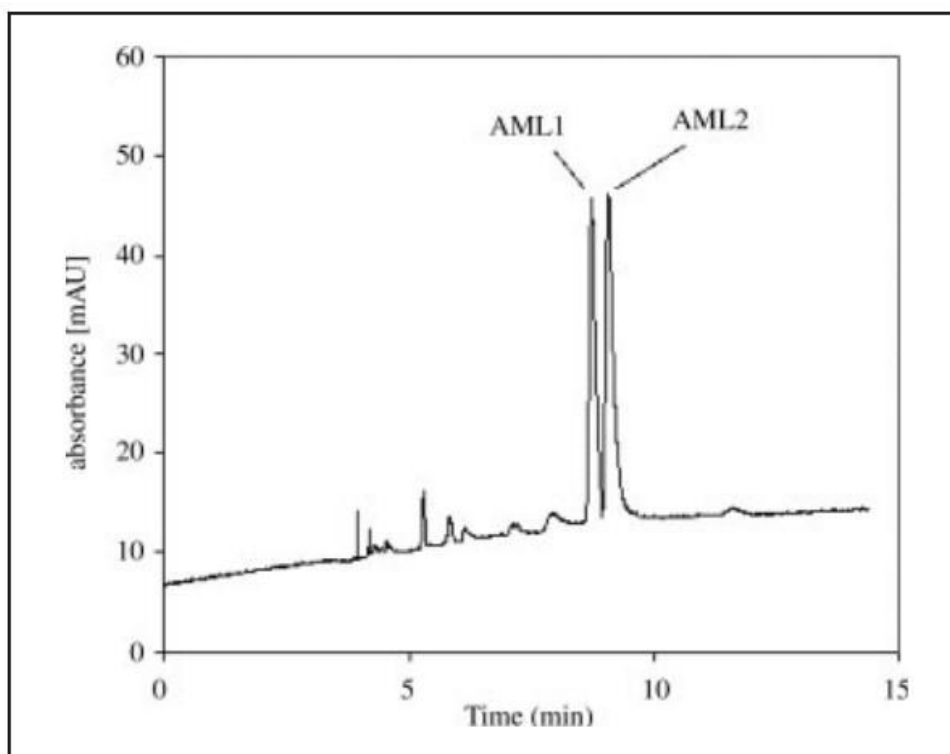
Parameter	AML1	AML2
$t_m$ (min.)	8.406	8.689
$s_{tm}$ (min.)	0.052	0.057
$a$ (mAU)	14.67502	15.70010
$s_a$ (mAU)	7.96881	8.52545
$b$ (mAU · $\mu\text{g}^{-1}$ · ml)	9.89880	10.59025
$s_b$ (mAU · $\mu\text{g}^{-1}$ · ml)	0.33929	0.36299
RSS	420.8	483.6
$r^2$	0.99708	0.99688
LOD ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	2.41	2.53
LOQ ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	8.05	8.42
N	20800	19000
H ( $\mu\text{m}$ )	7.2	7.9
Recovery (%)	97.6–99.3	97.1–98.5
Accuracy (RE) (%), mean	1.8	2.4
Robustness ( $\Delta R$ ) (%)	<6.7	
Enantioresolution, R	1.84	

AML1 = first migrating amlodipine enantiomer, AML2 = second migrating amlodipine enantiomer.

<sup>a</sup> Separating conditions as in Section 2. and other working conditions as in Experimental section. The concentration of AML in model sample was 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  unless otherwise stated.

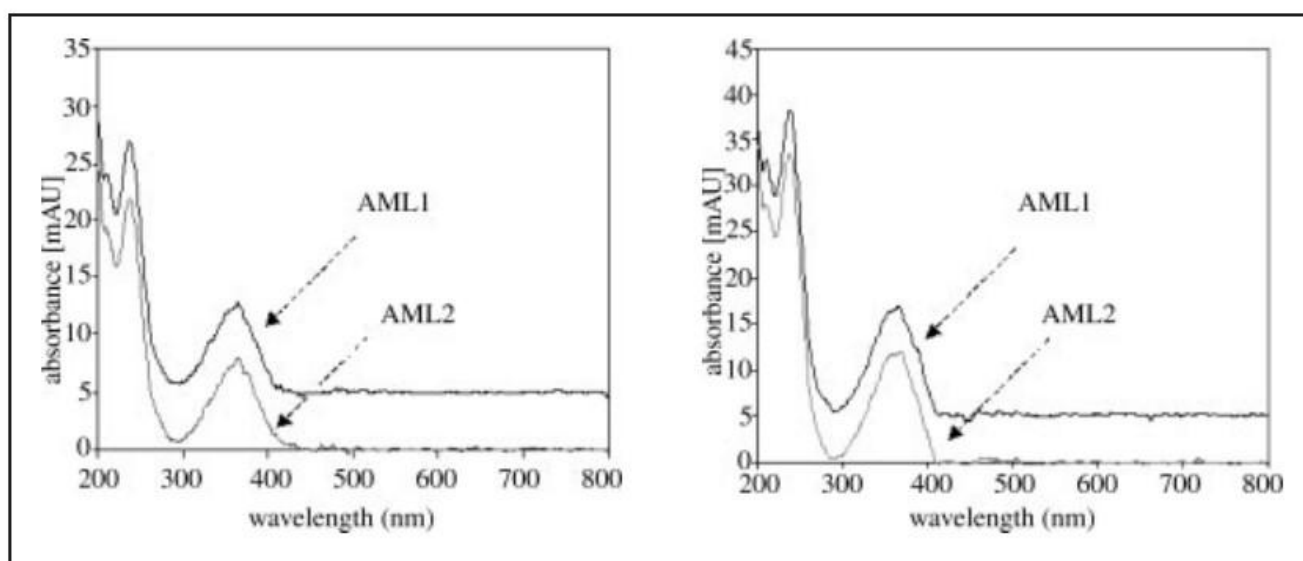
Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι παράμετροι της μεθόδου υπό επικύρωση, δηλαδή η ευαισθησία, η γραμμικότητα, η ακρίβεια/ανάκτηση και η στιβαρότητα υποδεικνύουν πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αναλύσεις ρουτίνας. Σε αυτό συνηγορούν και η υψηλή αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού. Το ότι ο διαχωρισμός ήταν ξεκάθαρος, καθώς και ο χρόνος ανάλυσης δείχνουν ότι η μέθοδος είναι αποτελεσματική για το διαχωρισμό εναντιομερών (Mikuš et al., 2009).

Η επικυρωμένη μέθοδος εφαρμόστηκε σε ανάλυση φαρμακευτικών σκευασμάτων για να προσδιοριστούν τα εναντιομερή της αμλοπιδίνης σε διάφορα φαρμακευτικά δισκία. Παρακάτω δίδεται αντιπροσωπευτικό ηλεκτροφερογράμμα (Διάγραμμα 2-5), το οποίο δείχνει τον διαχωρισμό των εναντιομερών της αμλοπιδίνης στα δισκία Agen. Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν και για τα άλλα δισκία (Mikuš et al., 2009) .



Διάγραμμα 2-5: Ηλεκτροφερόγραμμα διαχωρισμού των εναντιομερών της αμλοπιδίνης (Mikuš et al., 2009)

Η θέση που μεταναστεύουν τα εναντιομερή της αμλοπιδίνης στο ηλεκτροφερόγραμμα επιβεβαιώθηκε προσθέτοντας στα δείγματα από τα φαρμακευτικά σκευάσματα μικρή ποσότητα από το πρότυπο δείγμα και η καθαρότητα των ζωνών των εναντιομερών επιβεβαιώθηκε από την επεξεργασία των φασμάτων τους. Τα φάσματα των εναντιομερών της αμλοπιδίνης στα δείγματα ήταν ταυτόσημα με αυτά του διαλύματος αναφοράς για όλα τα φαρμακευτικά σκευάσματα (Διάγραμμα 2-6).



**Διάγραμμα 2-6: Φάσματα UV των εναντιομερών της αμλοπιδίνης σε πρότυπο διάλυμα (αριστερά) και σε φαρμακευτικό δείγμα αμλοπιδίνης (δεξιά) (Mikuš et al., 2009)**

Το γεγονός αυτό στηρίχθηκε και μαθηματικά με την εύρεση των συντελεστών συσχέτισης Pearson (Pearson's correlation coefficients, PCCs). Οι τιμές των συντελεστών ήταν μεγαλύτερες του 0.99 (Πίνακας 2-7), επιβεβαιώνοντας την ταυτότητα των εναντιομερών της αμλοπιδίνης στα φαρμακευτικά δείγματα και στο διάλυμα αναφοράς. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από το σχηματισμό των καθαρών ζωνών των εναντιομερών στα φαρμακευτικά δείγματα και την επαρκή εκλεκτικότητα διαχωρισμού της μεθόδου υπό μελέτη (Mikuš et al., 2009).



**Πίνακας 2-7: Πειραματικά δεδομένα για τα διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα αμλοπιδίνης (Mikuš et al., 2009)**

Parameter	Agen	Amilostad	Cardilopin	Norvasc
Determined content $\pm$ RSD (%) <sup>b</sup>	100.6 $\pm$ 1.2	99.4 $\pm$ 1.6	98.5 $\pm$ 1.4	99.7 $\pm$ 0.8
Enantiomeric ratio, (AML1)/(AML2)	50.5/49.5	49.2/50.8	51.1/48.9	50.7/49.3
PCC, (AML1), (AML2) <sup>c</sup>	0.99825, 0.99897	0.99934, 0.99872	0.99881, 0.99803	0.99789, 0.99818

AML1 = first migrating amlodipine enantiomer, AML2 = second migrating amlodipine enantiomer.

<sup>a</sup> Separating conditions as in Section 2., sample preparation procedures and other working conditions as in Experimental section. Concentration of AML in the injected samples was ~75 µg/ml.

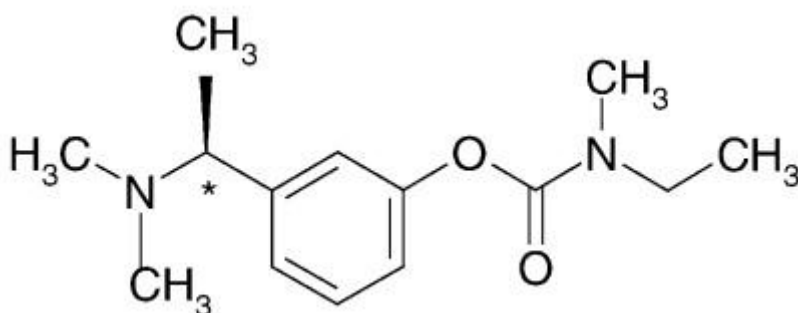
<sup>b</sup> Average content of AML in the tested pharmaceuticals was calculated as a sum of both enantiomers (using their corrected peak areas) from six consecutive CZE runs. Declared content of AML in each pharmaceutical was 10 mg per 1 tablet.

<sup>c</sup> For the spectral characterization of AML peaks see Section 3.3.

Η εγκεκριμένη λοιπόν, πλέον, μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της σύστασης των εναντιομερών της αμλοπιδίνης, σε διάφορα εμπορικά φαρμακευτικά σκευάσματα. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την σύνθεση του ρακεμικού μίγματος στα φαρμακευτικά δείγματα. Η ποσότητα της αμλοπιδίνης, η οποία υπολογίστηκε με την μέθοδο υπό μελέτη, ήταν σε συμφωνία με αυτή που δήλωναν οι κατασκευαστές (Πίνακας 2-8). Έτσι λοιπόν, φαίνεται ότι η μέθοδος υπό μελέτη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε φαρμακευτικές εφαρμογές ρουτίνας, λόγω της αποτελεσματικότητας, του χαμηλού κόστους, της απλότητας και της αναλυτικής της αξίας. Επιπλέον, η μέθοδος μπορεί να προσαρμοστεί εύκολα με περισσότερες δυνατότητες όπως καθαρισμό ουσιών κ.α. (Mikuš et al., 2009).

Οι Kavalíroná et al. χρησιμοποίησαν επίσης τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζώνης για να πραγματοποιήσουν διαχωρισμό των εναντιομερών της ριβαστιγμίνης. Η ριβαστιγμίνη είναι ένας αναστρέψιμος και μη ανταγωνιστικός αναστολέας δεύτερης γενιάς της ακετυλοχολινεστεράσης και παρεμποδίζει εκλεκτικά την δραστηριότητα της σε κάποιες περιοχές του εγκεφάλου. Παράλληλα, ενισχύει τη δράση της χολινακετυλοτρανσφεράσης, κάτι που διεγείρει τη σύνθεση της ακετυλοχολίνης. Πρόκειται για ένα παράγωγο της φυσοστιγμίνης, το οποίο έχει αποδειχθεί επιτυχές στη θεραπεία κατά του Alzheimer. Αρχικά συντέθηκε ως ρακεμικό μίγμα, αλλά αργότερα διακινήθηκε στην αγορά μόνο το S-(-) εναντιομερές που είναι το δραστικότερο, καθώς η συγκέντρωση του R-εναντιομερούς που απαιτείται για να μειώσει τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης είναι 10 φορές περισσότερη από το S-εναντιομερές (Kavalíroná et al., 2004) .





Εικόνα 2-18: Δομή της ριβαστιγμίνης ( Kavalíroná et al., 2004)

Σκοπός των ερευνητών ήταν να αναπτύξουν μια απλή, οικονομική και αξιόπιστη μέθοδο για τον διαχωρισμό των εναντιομερών της ριβαστιγμίνης σε φαρμακευτικά σκευάσματα, χρησιμοποιώντας διάφορες κυκλοδεξτρίνες, είτε ουδέτερες, είτε φορτισμένες. Ακόμη, ερευνήθηκαν οι στερεοειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της θειικής κυκλοδεξτρίνης και της ριβαστιγμίνης, την επίδραση της μοριακής δομής της ριβαστιγμίνης στην μετανάστευσή της .

Ως χηλικοί επιλογείς χρησιμοποιήθηκαν:

- θειική κυκλοδεξτρίνη,
- καρβοξυμεθυλο-κυκλοδεξτρίνη,
- διμεθυλο-κυκλοδεξτρίνη και
- υδροξυπροπυλο-κυκλοδεξτρίνη.

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης όξινη τρυγική S- και R- ριβαστιγμίνη ως δείγματα και για το ρυθμιστικό διάλυμα τριαιθυλαμίνη, υδροξείδιο του νατρίου, τρις(υδροξυμεθύλ) αμινομεθάνιο και φωσφορικό οξύ (Kavalíroná et al., 2004) .

Τα δοκιμαστικά ρακεμικά μίγματα των εναντιομερών που χρησιμοποιήθηκαν (R/S = 1) φυλαχθηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  ή υποβλήθηκαν σε δοκιμασίες αμέσως μετά την παρασκευή τους για να αποφευχθεί η αποικοδόμησή τους. Επίσης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα S- και R- ριβαστιγμίνης 1100μg /ml σε μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούνταν από ακριβή ποσότητα θειικής κυκλοδεξτρίνης σε κατάλληλο όγκο

φωσφορικού οξέος 100 mM. Το pH του ρυθμίστηκε στο 2.5 με τη χρήση τριαιθυλαμίνης, τρις(υδροξυμεθυλ) αμινομεθανίου ή υδροξεδίου του νατρίου. Χρησιμοποιήθηκε επίσης υπερκαθαρό νερό και τα διαλύματα των ηλεκτρολυτών διηθήθηκαν από μεμβράνες (Kavalíroná et al., 2004) .

Για την παρασκευή των φαρμακευτικών δειγμάτων το περιεχόμενο από 10 κάψουλες αδειάστηκε και ομογενοποιήθηκε. Στη συνέχεια λήφθηκε ποσότητα ισοδύναμη με περίπου 160 mg και μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη με 60 ml μεθανόλη. Το εναιώρημα που δημιουργήθηκε τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 10 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά. Περίπου 5 ml του υπερκείμενου υγρού αραιώθηκε στα 10 ml σε ογκομετρική φιάλη και υποβλήθηκε σε τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζώνης.

Όλα τα πειράματα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης πραγματοποιήθηκαν σε μηχανήμα ελεγχόμενο από υπολογιστή, το οποίο είχε ανιχνευτή συστοιχίας διόδων. Η θερμοκρασία της τριχοειδούς στήλης ήταν σταθερή στους  $18 \pm 0.1$  °C με σύστημα ψύξης υγρού. Οι διαχωρισμοί παρακολουθούνταν στα 200 nm. Χρησιμοποιήθηκαν δυο τύποι τριχοειδών: ένα τριχοειδές χωρίς επίστρωση και ένα τριχοειδές με επίστρωση πολυακρυλαμιδίου.

Αρχικά, ένα νέο τριχοειδές τηγμένης silica ξεπλύθηκε διαδοχικά με υδροξείδιο του νατρίου 1 M για 30 λεπτά, με υδροξείδιο του νατρίου 0.1 M για 10 λεπτά και απιονισμένο νερό για 40 λεπτά. Πριν την χρήση, ξεπλύθηκε με υδροξείδιο του νατρίου 1 M για 5 λεπτά, με υδροξείδιο του νατρίου 0.1 M για 10 λεπτά, απιονισμένο νερό για 10 λεπτά και ρυθμιστικό διάλυμα για 5 λεπτά. Ξέπλυμα γινόταν και ανάμεσα στις μετρήσεις με υδροξείδιο του νατρίου 0.1 M για 3 λεπτά, απιονισμένο νερό για 3 λεπτά και ρυθμιστικό διάλυμα για 2 λεπτά. Ακόμη, πριν κάθε ανάλυση με ένα τριχοειδές με επίστρωση πολυακρυλαμιδίου ένα τριχοειδές ξεπλενόταν διαδοχικά με υδροξείδιο του νατρίου 0.1 M για μισό λεπτό, απιονισμένο νερό για 2 λεπτά και ρυθμιστικό διάλυμα για 2 λεπτά (Kavalíroná et al., 2004).

Οι ερευνητές μελέτησαν τη μετανάστευση της ριβαστιγμίνης σε απλό τριχοειδές τηγμένης silica και σε τριχοειδές τηγμένης silica επικαλυμένο με πολυακρυλαμίδιο. Δυο από τους τρόπους να γίνει πιο ξεκάθαρος ο διαχωρισμός είναι:

- η αύξηση της εναντιοεκλεκτικότητας και
- ο έλεγχος της ηλεκτροόσμωσης.

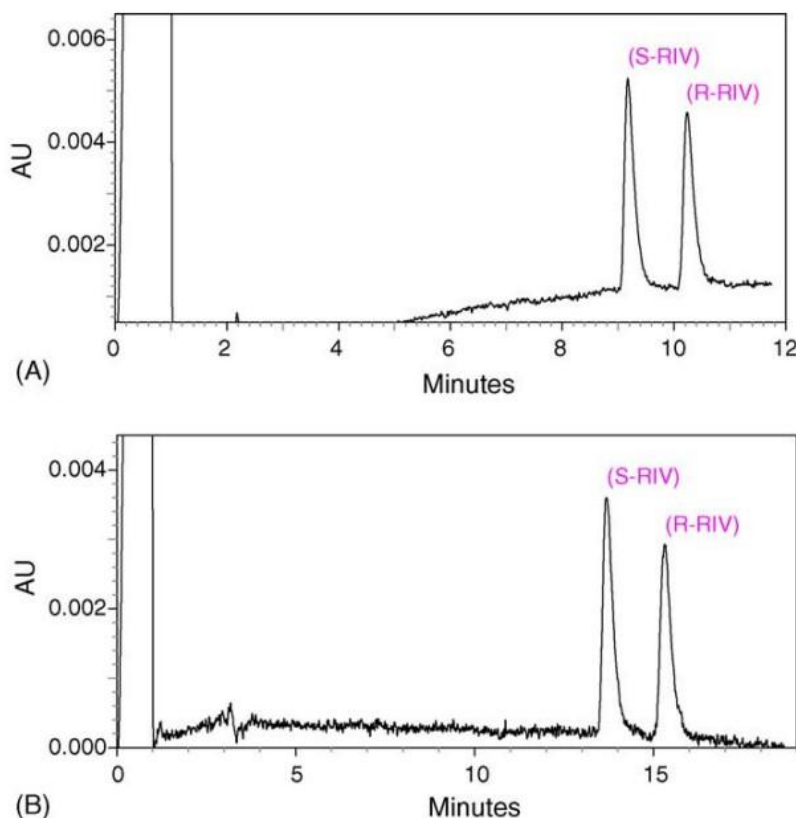
Παράλληλα επιλέχθηκε ένα ρυθμιστικό διάλυμα με όξινο pH για να αυξηθεί η διαλυτότητα με την πρωτονίωση των αμίνων του ρυθμιστικού. Η προσθήκη των αμίνων στο ρυθμιστικό είναι να καταστείλει την ηλεκτροοσμωτική ροή για να αυξηθεί η εναντιοεκλεκτικότητα και να μην υπάρχουν αλληλεπιδράσεις με το τοίχωμα του τριχοειδούς, το οποίο δεν έχει επικάλυψη (Kavalíroná et al., 2004).

Επίσης, έγιναν τα απαραίτητα βήματα για να βελτιστοποιηθεί η διαδικασία. Το πιο σημαντικό βήμα είναι η επιλογή του χειρόμορφου επιλογέα και η συγκέντρωσή του. Στη συνέχεια βελτιστοποιούνται και οι πειραματικές συνθήκες συμπεριλαμβανομένου:

- του τύπου του ρυθμιστικού διαλύματος και της συγκέντρωσής του
- του pH
- διάφορων τροποποιητών
- της θερμοκρασίας του διαχωρισμού και της τάσης.

Στην έρευνα αυτή, τα κατιόντα του νατρίου και των αμινών λειτουργούν ως αντισταθμιστικά ιόντα στα κατιόντα του φωσφορικού οξέος, κρατώντας το pH στο 2.5. Μελετώντας την επίδρασή τους στην εκλεκτικότητα του διαχωρισμού, αν και σε συνθήκες ρυθμιστικού διαλύματος η ηλεκτροοσμωτική ροή αντιστράφηκε, δεν ήταν αρκετό για να εμποδίσει τη μετανάστευση της ριβαστιγμίνης στο αρνητικό ηλεκτρόδιο (Kavalíroná et al., 2004).

Διακριτή διαφορά παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα κατιόντα των αμινών στο ρυθμιστικό διάλυμα (Διάγραμμα 2-7). Πλήρης διαχωρισμός των εναντιομερών παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM που περιείχε θειική κυκλοδεξτρίνη. Πρέπει να σημειωθεί ότι, σε σύγκριση με τα κατιόντα του τρις(υδροξυμεθύλ) αμινομεθανίου, τα κατιόντα της τριαιθυλαμίνης έχουν σημαντικά χαρακτηριστικά, όπως το ότι προσφέρουν διαφορετική εκλεκτικότητα στον διαχωρισμό των εναντιομερών και αυξάνουν την διαλυτότητα της κυκλοδεξτρίνης. Όμως, βρέθηκε ότι σε ένα βαθμό ανταγωνίζονται τον αναλύτη για τις υδροφοβικές κοιλότητες της κυκλοδεξτρίνης, κάτι που μειώνει το πόσο ξεκάθαρος είναι ο διαχωρισμός, ενώ τα κατιόντα του τρις(υδροξυμεθύλ) αμινομεθανίου είναι λιγότερο ανταγωνιστικά λόγω της μικρότερη αλκαλικής τους αλυσίδας, κάτι που τα καθιστά καταλληλότερα γι' αυτό τον διαχωρισμό (Kavalíroná et al., 2004).



**Διάγραμμα 2-7:** Ηλεκτροφερόγραμμα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/ τριαιθυλαμίνης (Α) και φωσφορικών/ τρις(υδροξυμεθύλ) αμινομεθανίου (Kavalíroná et al., 2004)

Μελετήθηκαν τα εξής προς βελτιστοποίηση της μεθόδου:

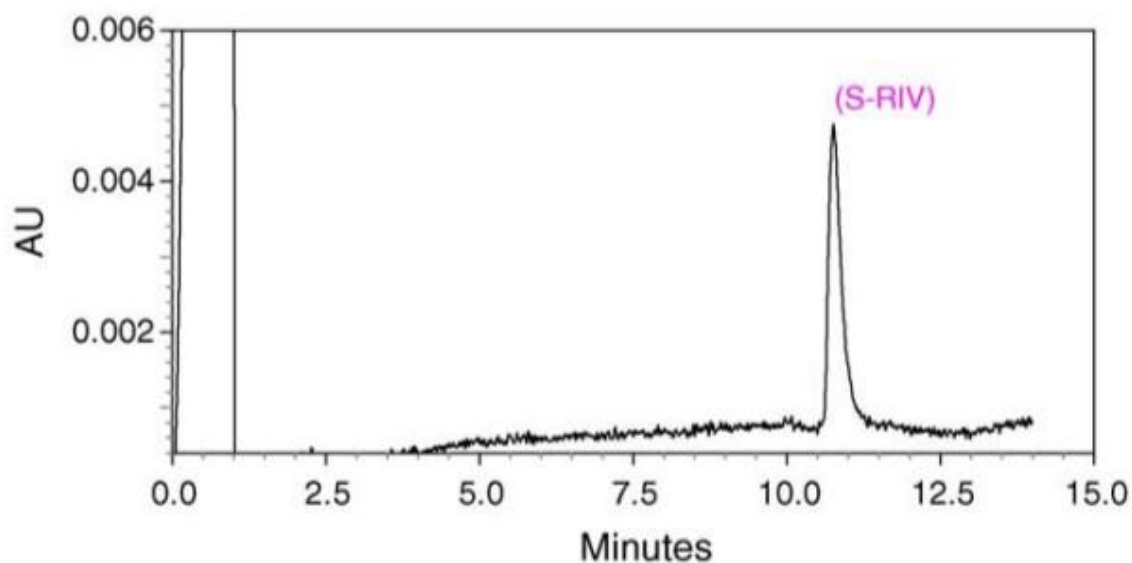
- η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος, όπου εξετάστηκε η παραγωγή ηλεκτρικού ρεύματος. Διαχωρισμός ως τη γραμμή βάσης επιτεύχθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης φωσφορικών 90–110 mM, με pH 2.5 και συγκέντρωση θεϊκής κυκλοδεξτρίνης 7 mM. Επιλέχθηκε η συγκέντρωση φωσφορικών 100 mM για την αποφυγή παραγωγής μεγάλης ποσότητας ενέργειας Joule
- η επίδραση του pH στο χρόνο μετανάστευσης του φαρμάκου, η οποία εξαρτάται από αρκετές παραμέτρους, όπως το βαθμό πρωτονίωσης του ατόμου του αζώτου του φαρμάκου, η συμβατότητα του μορίου του φαρμάκου με τη λιποφιλική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης στο χειρόμορφο επιλογέα και οι ηλεκτροστατικές

αλληλεπιδράσεις του φαρμάκου, του χειρόμορφου επιλογέα και των συστατικών του ρυθμιστικού διαλύματος σε υψηλές συγκεντρώσεις. Η ριβαστιγμίνη είναι θετικά φορτισμένη σε όξινα και ουδέτερα pH. Ο διαχωρισμός ουσιών που μετατρέπονται σε κατιόντα είναι προτιμότερο να γίνεται σε μικρές τιμές pH. Διαχωρισμός τη γραμμή βάσης επιτεύχθηκε σε pH 2.5–4.2, ενώ σε μεγαλύτερα pH δεν ήταν ξεκάθαρος και μικρότεροι χρόνοι μετανάστευσης. Αυτό σχετίζεται με την αλλαγή της ηλεκτροοσμωτικής ροής.

- Την ισχύ του ηλεκτρικού πεδίου, η οποία είναι ανάλογη των ηλεκτροφορητικών ταχυτήτων. Μελετήθηκε η επίδραση τεσσάρων τιμών τάσης (15, 20, 25 και 30 kV) στο χρόνο μετανάστευσης. Ένα περιοριστικός παράγοντας είναι η θέρμανση Joule. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο διαχωρισμός γινόταν λιγότερο ξεκάθαρος όσο ανέβαινε η τιμή του δυναμικού. Η βέλτιστη τάση ήταν 20 kV, όπου διασφαλίστηκε μικρός χρόνος μετανάστευσης, παράχθηκε αποδεκτό ρεύμα και ο διαχωρισμός ήταν ξεκάθαρος.

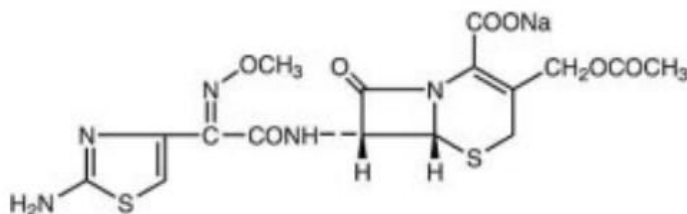
Η βελτιστοποιημένη μέθοδος τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για το διαχωρισμό της ριβαστιγμίνης, με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών όξινου pH και τριχοειδές μικρής ηλεκτροόσμωσης, με επίστρωση πολυακρυλαμιδίου. Δοκιμάστηκε ένας αριθμός χειρόμορφων επιλογέων κυκλοδεξτρίνης για να παρατηρηθεί επιτυχής διαχωρισμός. Φάνηκε ότι οι φορτισμένες κυκλοδεξτρίνες ήταν πιο αποτελεσματικές. Πλήρης διαχωρισμός επιτεύχθηκε με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων υποκατεστημένων θεικών δεξτρίνων (Kavalíroná et al., 2004).

Η αναπτυγμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της S-ριβαστιγμίνης σε φαρμακευτικές κάψουλες (Exelon). Στο Διάγραμμα 2-8 φαίνεται ένα τυπικό ηλεκτροφερόγραμμα από τη διαδικασία. Αμφότερα τα εναντιομερή διαχωρίστηκαν στη γραμμή βάσης σε 8 λεπτά χρησιμοποιώντας τις βελτιστοποιημένες συνθήκες. Οι ερευνητές υποστηρίζουν πως η ευαισθησία της μεθόδου είναι επαρκής για να αξιολογηθεί αν υπάρχουν υπολείμματα του R-εναντιομερούς ως ανεπιθύμητες προσμίξεις (Kavalíroná et al., 2004).



**Διάγραμμα 2-8:** Ηλεκτροφερόγραμμα του προσδιορισμού της S-ριβαστιγμίνης σε φαρμακευτικό σκεύασμα (Kavalíroná et al., 2004).

Οι Wang et al. χρησιμοποίησαν την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζωνών για να διαχωρίσουν και να προσδιορίσουν τα εναντιομερή της κεφοταξίμης (Εικόνα 2-19) σε ενέσιμα σκευάσματα. Το άλας της κεφοταξίμης με νάτριο είναι ένα ημισυνθετικό αντιβιοτικό β-λακτάμης, το οποίο ανήκει στην τρίτη γενιά αντιβιοτικών κεφαλοσπορίνης. Έχει ένα στερεογονικό άνθρακα, άρα συναντάται σε δυο εναντιομερή. Τα διάφορα σκευάσματά της έχουν ευρεία κλινική χρήση, επειδή έχει δράση σε αμφότερα θετικά και αρνητικά κατά Gramm βακτήρια και είναι ανθεκτικό σε οξέα και ένζυμα (Wang et al., 2009).



**Εικόνα 2-19:** Δομή της κεφοταξίμης (Wang et al., 2009).

Κλινικές φαρμακολογικές δοκιμές έδειξαν, ότι με τη χορήγηση μιας δόσης 500 mg ή 1 g κεφοταξίμης σε εθελοντές οι μέγιστες συγκεντρώσεις στον ορό του αίματος των 11.7 και 20.5 mg/mL αντίστοιχα επιτεύχθηκαν σε 30 λεπτά και μετά μειώθηκαν με χρόνο ημιζωής περίπου 1 ώρα.

Πιθανές αντενδείξεις, ανάλογα και με την ποιότητα και τα εναντιομερή, περιλαμβάνουν:

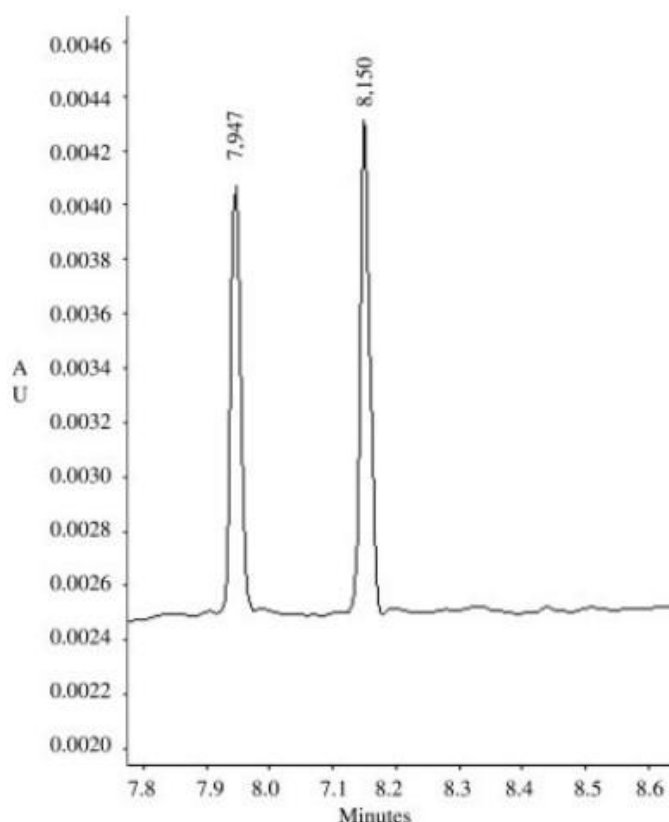
- Διάρροια
- Πόνο στο στομάχι
- Δυσπεψία
- Εμετό

Τα αντιβιοτικά προερχόμενα από κεφαλοσπορίνη έχουν ευρεία κλινική χρήση και η κεφοταξίμη συγκεκριμένα χρησιμοποιείται για την πρόληψη μολύνσεων κατά τη διάρκεια εγχειρίσεων και ως θεραπεία κατά των μολύνσεων, αλλά και τα δυο εναντιομερή έχουν διαφορετικές βιοδραστικότητες. Γι' αυτό το λόγο, είναι πολύ σημαντικό να βελτιώνεται η βιοδραστικότητά της και η ποιότητά της με την ύπαρξη μιας αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού αυτών των φαρμάκων σε φαρμακευτικά σκευάσματα αλλά και σε βιολογικά δείγματα (Wang et al., 2009).

Έτσι λοιπόν, σκοπός των ερευνητών ήταν η ανάπτυξη μιας ταχείας και αποτελεσματικής μεθόδου τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης για το διαχωρισμό των εναντιομερών της κεφοταξίμης με τη χρήση κυκλοδεξτρίνης ως χειρόμορφου επιλογέα για τον έλεγχο ποιότητάς της. Οι χρήσεις της θα περιλάμβαναν τον έλεγχο της παραγωγής της κεφοταξίμης και τον έλεγχο της ποιότητάς της στην κλινική χρήση.

Από την διαθέσιμη βιβλιογραφία μέχρι εκείνη τη στιγμή, βρέθηκε πως αν και ένα εύρος κυκλοδεξτρίνων, a-CD, b-CD, g-CD, HP-b-CD και Me-b-CD έχουν εξεταστεί ως χειρόμορφοι επιλογείς, δεν υπήρχαν δεδομένα για το πόσο ξεκάθαροι ήταν οι διαχωρισμοί. Έγιναν πειράματα με διάφορες κυκλοδεξτρίνες ως χειρόμορφα πρόσθετα, αλλά μόνο στην περίπτωση της CM-b-CD υπήρξε ικανοποιητικός διαχωρισμός (Διάγραμμα 2-9).





**Διάγραμμα 2-9:** Ηλεκτροφερόγραμμα του διαχωρισμού των εναντιομερών της κεφοταξίμης με CM-b-CD ως χειρόμορφο επιλογή (Wang et al., 2009).

Εκτός από την ανάπτυξη μεθόδου διαχωρισμού μελετήθηκε η επίδραση που έχουν κάποιοι πειραματικοί παράγοντες σε αυτόν. Ένας παράγοντας ήταν η συγκέντρωση της κυκλοδεξτρίνης (Wang et al., 2009). Δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις μεταξύ 0.03 και 1 mmol/L σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων. Ο χρόνος μετανάστευσης αυξήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης της CM-b-CD στο ρυθμιστικό διάλυμα, καθώς ο αναλύτης και η κυκλοδεξτρίνη σχηματίζουν πιο σταθερά σύμπλοκα. Τα εναντιομερή της κεφοταξίμης διαχωρίστηκαν πλήρως όταν η συγκέντρωση της CM-b-CD ήταν 0.5 mmol/L και έτσι θεωρήθηκε ως βέλτιστη συγκέντρωση με καλό χρόνο μετανάστευσης (Wang et al., 2009).

Άλλος ένας παράγοντας που εξετάστηκε ήταν η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος του δισόξινο φωσφορικού νατρίου (15, 37.5, 50, 70 και 100 mmol/L). Οι συγγραφείς

υπογραμμίζουν ότι, λόγω της παραγωγής ρεύματος πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στο πρόβλημα της παραγωγής θερμότητας. Για να αποφευχθεί η παραγωγή υπερβολικής θερμότητας, επιλέχθηκε η συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος 75 mmol/L.

Μια βελτιστοποίηση ακόμα που πραγματοποιήθηκε ήταν η τιμή του pH. Έγιναν πειράματα όπου η συγκέντρωση του ρυθμιστικού και της κυκλοδεξτρίνης έμειναν σταθερές στα 75 mmol/L phosphate buffer και 0.5 mmol/L αντίστοιχα και οι τιμές του pH διαφοροποιήθηκαν από 3 ως 9, μια μονάδα κάθε φορά. Ο χρόνος μετανάστευσης των εναντιομερών της κεφοταξίμης μειώθηκε όσο αυξανόταν το pH από 3 σε 7, ενώ με περαιτέρω αύξηση από το 7 στο 9, αυξήθηκε. Διαχωρισμός των εναντιομερών επιτεύχθηκε σε pH 7 (Wang et al., 2009).

Η εκτέλεση της μεθόδου ξεκινά με έκπλυση του τριχοειδούς στην αρχή της ημέρας με υδροξείδιο του νατρίου 0.1 mol/L για 5 λεπτά και μετά με νερό για 2 λεπτά. Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (75 mmol/L, pH 7.0) περιείχε κυκλοδεξτρίνες. Πριν από κάθε ανάλυση το τριχοειδές εκπλενόταν με ρυθμιστικό διάλυμα για 5 λεπτά. Μετά από πολλές μετρήσεις, το τριχοειδές εκπλενόταν με 0.1 mol/L NaOH για 2 λεπτά, 2 λεπτά με νερό και 3 λεπτά με ρυθμιστικό διάλυμα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε με δυναμικό 20 kV σε θερμοκρασία 25°C με ανιχνευτή υπέρυθρης ακτινοβολίας στα 280 nm, το μέσο ηλεκτρικό ρεύμα ήταν 136 mA. Ο διαχωρισμός διεξήχθη από το θετικό στο αρνητικό ηλεκτρόδιο (Wang et al., 2009).

Σε βελτιστοποιημένες συνθήκες έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των εναντιομερών της κεφοταξίμης σε φαρμακευτικά σκευάσματα (ενέσιμα). Οι συγκεντρώσεις των εναντιομερών της κεφοταξίμης σε σκευάσματα που λήφθηκαν από διάφορους παρασκευαστές ποικίλλαν με τη χρήση αυτής της μεθόδου. Έτσι, προτείνεται η μέθοδος να εδραιωθεί για τον έλεγχο ποιότητάς της (Wang et al., 2009).

## **2.2.2 Ηλεκτροκινητική χρωματογραφία**

Η ηλεκτροκινητική χρωματογραφία είναι μια τεχνική τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης, όπου η τριχοειδής στήλη γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιέχει ένα πρόσθετο που

λειτουργεί σαν ψευδοστατική φάση και αλληλεπιδρά με τον αναλύτη. Υπάρχουν δυο κύρια είδη ηλεκτροχρωματογραφίας: όταν τα πρόσθετα είναι κυκλοδεξτρίνες, η μέθοδος αυτή καλείται CD-EKC. Αντίστοιχα, αν χρησιμοποιεί μικύλλια, τότε καλείται ME-KC (Terabe, 2008).

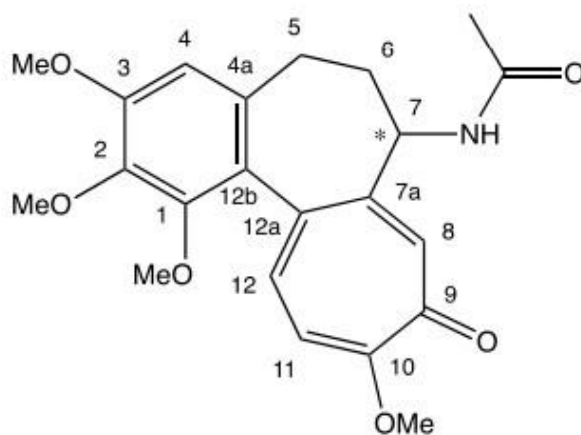
Η ME-KC ανακαλύφθηκε το 1984 από τον Terabe και τους συνεργάτες του και αποτελεί μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιημένες μεθόδους ηλεκτροφόρησης τριχοειδούς. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της είναι ότι επιτρέπει το διαχωρισμό τόσο φορτισμένων όσο και ηλεκτρικώς ουδέτερων σωματιδίων. Βασίζεται στην εισαγωγή επιφανειοδραστικής ουσίας στο ρυθμιστικό διάλυμα, σε επίπεδα συγκέντρωσης όπου σχηματίζονται μικύλλια (Terabe 2010), (Terabe, 2009).

Τα επιφανειοδραστικά είναι αμφίφιλα μόρια, τα οποία αποτελούνται από μια πολική ή ιοντική κεφαλή και μια υδρογονανθρακική ουρά. Η κεφαλή εμφανίζει υδρόφιλες ιδιότητες και είναι συμβατή με υδατικό περιβάλλον, ενώ η ουρά είναι υδρόφοβη. Τα μικύλλια είναι συσσωματώματα των επιφανειοδραστικών ουσιών, με τις υδροφοβικές ουρές των επιφανειοδραστικών μορίων να προσανατολίζονται προς το κέντρο για να αποφύγουν τις αλληλεπιδράσεις με το υδρόφιλο ηλεκτρολύτη του υποβάθρου και τα φορτισμένα άκρα να Το δωδεκυλο-θειικό νάτριο (Sodium dodecyl sulfate, SDS) είναι το πιο κοινό επιφανειοδραστικό, το οποίο χρησιμοποιείται στην MEKC. Η επιφάνεια μικυλλίου αυτού του τύπου αυτού έχει ένα μεγάλο αρνητικό φορτίο, άρα και μεγάλη ηλεκτροφορητική ευκινησία προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Ο ανιοντικός χαρακτήρας των ομάδων θειικού άλατος του SDS αναγκάζει το επιφανειοδραστικό και τα μικύλλια να έχουν ηλεκτροφορητική ευκινησία που είναι αντίθετη προς την κατεύθυνση της ηλεκτροοσμωτικής ροής. Έτσι, τα μικύλλια, μεταναστεύουν πολύ αργά προς την κάθοδο. Ως αποτέλεσμα, κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού, οι αναλύτες κατανέμονται μεταξύ του εσωτερικού υδροφοβικού μικυλλίου και του υδρόφιλου ρυθμιστικού διαλύματος (Terabe, 2008), .

Οι τέσσερις πιο συνηθισμένοι μέθοδοι ανίχνευσης είναι ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού (Ultraviolet-Visible, UV-Vis), ο ανιχνευτής φθορισμού, η ηλεκτροχημική ανίχνευση και ο ανιχνευτής MS. Λόγω της μεγάλης συμβατότητας του με το σύστημα CE, ο ανιχνευτής UV-Vis αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο ανίχνευσης στην CE (Lodén, 2008).

Στους διαχωρισμούς εναντιομερών σε φαρμακευτικά σκευάσματα αξίζει να αναφερθεί η έρευνα των Menéndez-López et al., οι οποίοι επιχείρησαν τον διαχωρισμό των εναντιομερών της κολχικίνης με ηλεκτροκινητική χρωματογραφία. Η κολχικίνη είναι ένα φάρμακο φυτικής προέλευσης. Αυτό το φυσικό αλκαλοειδές χρησιμοποιείται από αρχαιοτάτων χρόνων, γνωστό για την ικανότητά του να συνδέεται με την τουμπουλίνη και να αναστέλλει τον πολυμερισμό μικροσωληνίσκων έτσι ώστε να αντιμετωπίζει την απότομη κρίση της ουρικής αρθρίτιδας, για τη θεραπεία του μεσογειακού πυρετού, των καρδιακών παθήσεων, δερματικές παθήσεις και πιο πρόσφατα ως πειραματικός αντινεοπλασματικός παράγοντας (Menéndez-López et al., 2017).

Αμφότερα τα εναντιομερή της κολχικίνης είναι δραστικά, αλλά το S-εναντιομερές είναι πιο δραστικό. Έτσι, στην αγορά διατίθεται το καθαρό S-εναντιομερές για τη θεραπεία αυτών των ασθενειών, γεγονός που υποδεικνύει την ανάγκη να αναπτυχθούν εναντιοεκλεκτικές μέθοδοι για να διασφαλίζεται ο έλεγχος ποιότητας της εναντιομερικής της καθαρότητας. Αυτές οι μεθοδολογίες, αποτε μια πλευρά πρέπει να είναι σε θέση να διαχωρίσουν τα δυο εναντιομερή και από την άλλη πλευρά, να μπορούν να ανιχνεύουν μικρές ποσότητες του ανεπιθύμητου εναντιομερούς (Menéndez-López et al., 2017).



Εικόνα 2-20: Δομή της κολχικίνης (Menéndez-López et al., 2017)

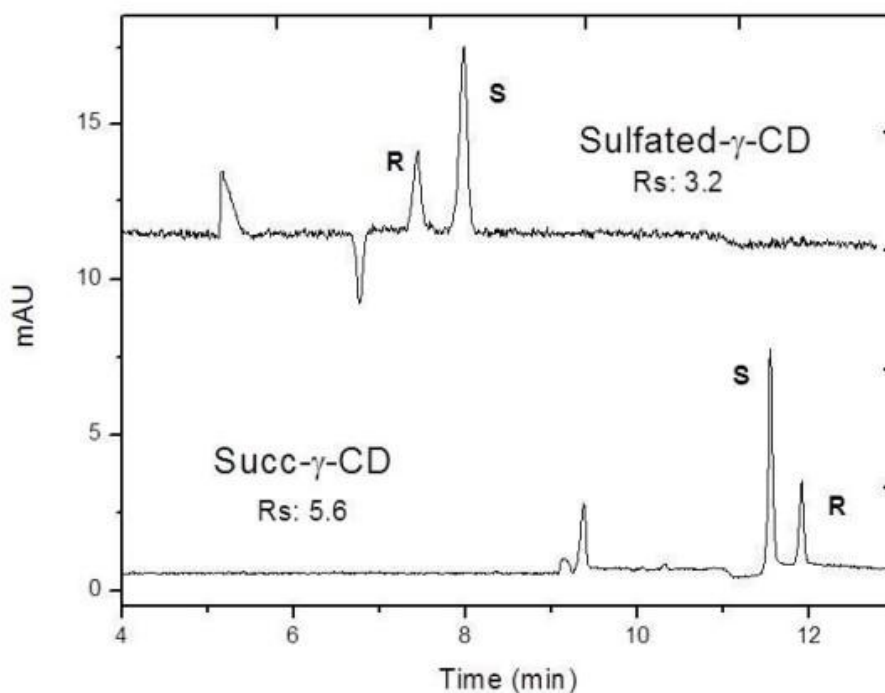
Στην αρχή κάθε ημέρα το τριχοειδές ξεπλενόταν με NaOH 0.1 M για 10 min, 5 min με νερό Milli-Q και 40 min με το ρυθμιστικό διάλυμα. Για να διασφαλιστεί η επαναληψιμότητα μεταξύ ενέσεων, το τριχοειδές εκπλενόταν με NaOH 0.1 M για 2 min, 2 min με το ρυθμιστικό και 2 min με τους ηλεκτρολύτες υποβάθρου. Το ρυθμιστικό διάλυμα

παρασκευάστηκε διαλύοντας κατάλληλη ποσότητα βορικού οξέος σε νερό Milli-Q, ρυθμίζοντας το pH στο 9.0 με NaOH 1 M και συμπληρώνοντας μέχρι τον επιθυμητό όγκο με νερό για να ληφθεί η επιθυμητή συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος. Οι ηλεκτρολύτες υποβάθρου παρασκευάστηκαν διαλύοντας ποσότητα διαφόρων κυκλοδεξτρινών στο ρυθμιστικό διάλυμα (Menéndez-López et al., 2017).

Τα πρότυπα διαλύματα κολχικίνης παρασκευάστηκαν διαλύοντας κατάλληλη ποσότητα του φαρμάκου σε διμέθυλοσουλφοξείδιο και νερό Milli-Q σε αναλογία 1:1 και φυλάχθηκαν στους 4 °C. Παρομοίως, τα διαλύματα των φαρμακευτικών σκευασμάτων παρασκευάστηκαν κονιορτοποιώντας 6 δισκία, ομογενοποιώντας την σκόνη που σχηματίστηκε, διαλύοντας την απαιτούμενη ποσότητα για την ανάλυση σε διμέθυλοσουλφοξείδιο και νερό Milli-Q και φυγοκεντρώντας για 20 min με ταχύτητα 4000 rpm στους 25 °C. Το υπερκείμενο υγρό λήφθηκε, φέρθηκε σε γνωστό όγκο και αραιώθηκε στην απαιτούμενη συγκέντρωση χρησιμοποιώντας νερό Milli-Q. Όλα τα διαλύματα (δείγματα, ρυθμιστικά διαλύματα και πρότυπα) διηθήθηκαν μέσω φίλτρων μεμβράνης πριν την είσοδό τους στην διάταξη της ηλεκτροκινητικής χρωματογραφίας (Menéndez-López et al., 2017).

Εφ' όσον η κολχικίνη είναι ουδέτερη ουσία, εκτός αν βρίσκεται σε πολύ όξινα pH, πραγματοποιήθηκε δοκιμή με 13 αντιοντικές κυκλοδεξτρίνες για να προσδιοριστεί ο καταλληλότερος χειρόμορφος επιλογέας. Οι κυκλοδεξτρίνες είχαν συγκέντρωση 10mM σε 10mM ρυθμιστικού διαλύματος βορικών με pH 9.0. Οι δοκιμές διεξάχθηκαν με δυναμικό 20 kV, θερμοκρασία 20 °C και μήκος κύματος ανίχνευσης 243 nm. Από τις κυκλοδεξτρίνες που μελετήθηκαν, τέσσερις επέτρεψαν το διαχωρισμό των εναντιομερών. Αφενώς, η καρβοξυλομεθυλο β-κυκλοδεξτρίνη και η καρβοξυλομεθυλο γ-κυκλοδεξτρίνη είχαν λιγότερο ξεκάθαρο διαχωρισμό και η σουκινική γ-κυκλοδεξτρίνη έδωσε τον πιο ξεκάθαρο διαχωρισμό όταν χρησιμοποιήθηκαν το πρώτο εναντιομερές ήταν η S-κολχικίνη. Από την άλλη πλευρά, η θειική γ-κυκλοδεξτρίνη έδωσε ένα σχετικά ξεκάθαρο διαχωρισμό, αλλά η σειρά μετανάστευσης ήταν ανεστραμμένη, δηλαδή η S-κολχικίνη ήταν δεύτερη, ενώ οι προσμίξεις πρώτες. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, τόσο η σουκινική γ-κυκλοδεξτρίνη, όσο και η θειική γ-κυκλοδεξτρίνη επιλέχθηκαν ως χειρόμορφοι επιλογείς. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών και για τις δυο κυκλοδεξτρίνες (Menéndez-López et al., 2017).

Η συγκέντρωση του ρυθμιστικού ποίκιλλε μεταξύ των 10 και 75 mM (10, 25, 50 και 75 mM). Ανάλογα με την κυκλοδεξτρίνη, επιλέχθηκε μια βέλτιστη συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος ως συμβιβασμός μεταξύ της έντασης του ρεύματος και της ανάλυσης (50 mM για τη σουκινική γ-κυκλοδεξτρίνη και 25 mM για τη θεική γ-κυκλοδεξτρίνη). Η επίδραση της συγκέντρωσης της κυκλοδεξτρίνης διερευνήθηκε στην περιοχή από 5 έως 20 mM. Η ανάλυση βελτιώθηκε σταδιακά όταν αυξήθηκε η συγκέντρωση και των δύο κυκλοδεξτρινών. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας συγκέντρωση 7 mM για τη σουκινική γ-κυκλοδεξτρίνη και 17 mM για τη θεική γ-κυκλοδεξτρίνη έδωσαν τις υψηλότερες τιμές ανάλυσης στους συντομότερους χρόνους (11 λεπτά για τη σουκινική γ-κυκλοδεξτρίνη και 10 λεπτά για τη θεική γ-κυκλοδεξτρίνη) (Menéndez-López et al., 2017).



**Διάγραμμα 2-10:** Ηλεκτροφερογράφημα του διαχωρισμού των εναντιομερών της κολχικίνης με διαφορετικές κυκλοδεξτρίνες (Menéndez-López et al., 2017).

Μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας (16, 20 και 25 °C). Για τη σουκινική γ-κυκλοδεξτρίνη επιλέχθηκε μια θερμοκρασία 16°C, αφού στην περίπτωση της μείωση της θερμοκρασίας οδήγησε σε αύξηση της ανάλυσης με ελαφρώς υψηλότερους μόνο χρόνους ανάλυσης. Για τη θεική γ-κυκλοδεξτρίνη, η ανάλυση δεν διέφερε αισθητά αν

άλογα με τη θερμοκρασία, έτσι οι 20 °C επιλέχθηκαν ως βέλτιστη τιμή. Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του χρόνου έγχυσης, δοκιμάστηκαν τιμές 5, 10, 15 και 20 s στα 50 mbar. Επιλέχθηκε χρόνος έγχυσης 5 δευτερολέπτων και για τις δύο κυκλοδεξτρίνες, αφού η ανάλυση αυξήθηκε χωρίς απώλεια ευαισθησίας (Menéndez-López et al., 2017).

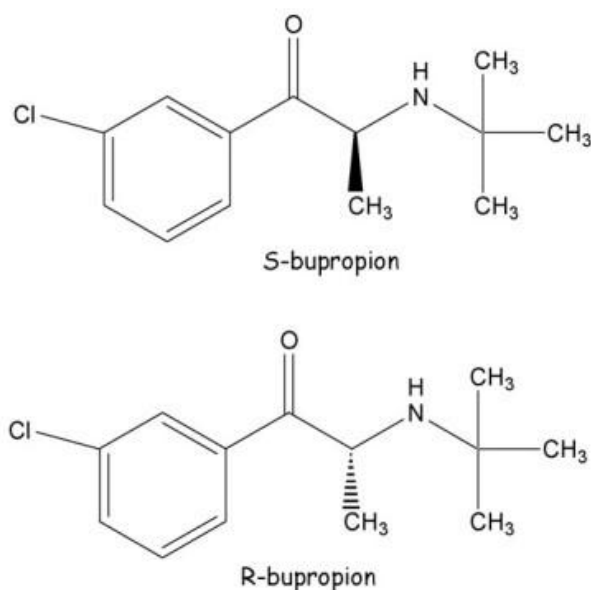
Συνοπτικά, οι δύο μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν σε αυτήν την εργασία, η μια με τη σουκινική γ-κυκλοδεξτρίνη και η άλλη με τη θειική γ-κυκλοδεξτρίνη ως χειρόμορφους επιλογείς έχουν επικυρωθεί κατάλληλα, επιδεικνύοντας και στις δύο περιπτώσεις επαρκείς τιμές για τα διαφορετικά αναλυτικά χαρακτηριστικά που αξιολογήθηκαν. Αυτό την καταλληλότητα και των δύο μεθοδολογιών για τον συνηθισμένο προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε S-κολχικίνη και της εναντιομερικής πρόσμιξής της σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Η περιεκτικότητα σε S-κολχικίνη που βρέθηκε συμφωνούσε με το αναγραφόμενο περιεχόμενο στα σκευάσματα και η περιεκτικότητα σε R-κολχικίνη ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των μεθόδων και για τα δύο δείγματα (Menéndez-López et al., 2017).

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα NMR υδρογόνου προκειμένου να μελετηθεί ο μηχανισμός διαχωρισμού και με τις δύο κυκλοδεξτρίνες. Ελήφθη στοιχειομετρία 1:1 για τα σύμπλοκα εναντιομερούς-κυκλοδεξτρίνης. Ωστόσο, η φαινομενική και η μέση σταθερά ισορροπίας για τα σύμπλοκα εναντιομερούς-κυκλοδεξτρίνης μπόρεσε να υπολογιστεί μόνο για τη σουκινική γ-κυκλοδεξτρίνη, υποδηλώνοντας ότι, μάλλον ο κυρίαρχος παράγοντας για την σειρά μετανάστευσης ήταν η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των συμπλοκών εναντιομερούς-κυκλοδεξτρίνης, αντί της σταθερότητας των συμπλοκών. Παρά το γεγονός ότι η εναντιομερική πρόσμειξη (R-κολχικίνη) ήταν το πρώτο εναντιομερές που μετανάστευσε με τη σουκινική γ-κυκλοδεξτρίνη, μόνο η μέθοδος με τη σουκινική γ-κυκλοδεξτρίνη μπόρεσε να ανιχνεύσει έως και 0,1 % R-κολχικίνης σύμφωνα με τις κατευθυντήριες. Επιπλέον, η μέθοδος της σουκινικής γ-κυκλοδεξτρίνης οδήγησε σε πιο ξεκάθαρο διαχωρισμό. Αξιολογήθηκαν τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των δύο μεθόδων που αναπτύχθηκαν, παρουσιάζοντας καλή απόδοση για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κολχικίνης με όριο ανίχνευσης  $\approx 0,3$  mg/L. Οι μέθοδοι εφαρμόστηκαν με επιτυχία στην ανάλυση των φαρμακευτικών σκευασμάτων (Menéndez-López et al., 2017).



Αξιόλογη είναι και η δουλειά των Castro-Puyana et al., οι οποίοι χρησιμοποίησαν την ηλεκτροκινητική χρωματογραφία για να διαχωρίσουν τα εναντιομερή της βουπροπιόνης και να την προσδιορίσουν ποσοτικά σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Η βουπροπιόνη είναι ένα αντικαταθλιπτικό δεύτερης γενιάς, μονοκυκλική αμινοκετόνη και ασθενής αναστολέας της επαναπρόσληψης της ντοπαμίνης ή της δραστηριότητας της μονοαμινοξειδάσης. Η βουπροπιόνη είναι ένα άτυπο αντικαταθλιπτικό που έχει επίσης χρησιμότητα ως βοήθημα διακοπής του καπνίσματος και έχει μελετηθεί για και για θεραπεία άλλων ασθενειών, όπως η διπολική διαταραχή, η διαταραχή ελλειμματικής προσοχής-υπερκινητικότητας και η απώλεια βάρους. Παρασκευάζεται και χρησιμοποιείται κλινικά ως ρακεμικό μίγμα, αλλά υπάρχει έλλειψη δεδομένων σχετικά με τις ιδιότητες των μεμονωμένων εναντιομερών. Σε ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών (pH 7,4, 25 °C) γίνεται ταχεία ρακεμοποίηση των εναντιομερών (Castro-Puyana et al, 2008).

Η βουπροπιόνη μεταβολίζεται εκτενώς και αναφέρεται ότι λιγότερο από το 0.5% ανακτάται σε αυτή την μορφή στα ούρα. Εικάζεται ότι η στερεοχημεία της είναι σημαντική για τα θεραπευτικά αποτελέσματά της. Από πειράματα in vitro παρατηρήθηκε ότι τα δυο εναντιομερή είναι το ίδιο ισχυρά με το ρακεμικό μίγμα, αλλά η ρακεμοποίηση στον οργανισμό μπορεί να εξηγεί την απουσία στερεοεκλεκτικότητας (Castro-Puyana et al, 2008).



Εικόνα 2-21: Δομή της βουπροπιόνης (Castro-Puyana et al., 2008).

Πριν από την πρώτη χρήση, ένα νέο τριχοειδές ξεπλύθηκε με 1 M NaOH για 30 λεπτά, ακολουθούμενο από 5 λεπτά με νερό, ρυθμιστικό διάλυμα για 60 λεπτά και διάλυμα ηλεκτρολυτών υποβάθρου για 15 λεπτά. Μεταξύ των εργασιών, το τριχοειδές ξεπλύθηκε με διάλυμα ηλεκτρολυτών υποβάθρου για 2 λεπτά. Οι επιλεγμένες συνθήκες οργάνου ήταν: θερμοκρασία, 30 °C; έγχυση με πίεση, 50 mbar για 4 δευτερόλεπτα. εφαρμοζόμενη τάση, 30 kV; και ανίχνευση UV στα 210 nm με εύρος ζώνης 4 nm και χρόνο απόκρισης 0,1 s (Castro-Puyana et al, 2008).

Παρασκευάστηκαν ρυθμιστικά διαλύματα διαλύοντας την κατάλληλη ποσότητα/όγκο βορικού/οξικού οξέος σε νερό Milli-Q, ρυθμίζοντας το pH στην επιθυμητή τιμή (pH 9,0 ή 5,0, αντίστοιχα) με 1 M NaOH πριν συμπληρωθεί ο όγκος με νερό για να ληφθεί η επιθυμητή τιμή συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος (50 mM). Τέλος, παρασκευάστηκαν ηλεκτρολύτες υποβάθρου διαλύοντας την κατάλληλη ποσότητα των διαφορετικών κυκλοδεξτρίνων στο ρυθμιστικό διάλυμα. Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα διαλύοντας την κατάλληλη ποσότητα βουπροπιόνης σε νερό Milli-Q μέχρι τελικής συγκέντρωσης 2000 mg L<sup>-1</sup>. Αυτό το διάλυμα αποθηκεύτηκε στους 4 °C και διαφορετικά δείγματα αραιώθηκαν σε νερό για να ληφθούν διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις ρακεμικής βουπροπιόνης που κυμαίνονταν από 20 έως 200 mg L<sup>-1</sup> για τη βαθμονόμηση με την εξωτερική τυπική μέθοδο (Castro-Puyana et al, 2008).

Για να παρασκευαστούν διαλύματα δειγμάτων των δύο φαρμακευτικών σκευασμάτων που αναλύθηκαν, το περιεχόμενο πέντε δισκίων ζυγίστηκε, κονιοποιήθηκε και αναμίχθηκε ομοιογενώς. Περίπου 0,1 g της σκόνης που ελήφθη ζυγίστηκε και διαλύθηκε σε 25 mL νερού Milli-Q για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση περίπου 2000 mg L<sup>-1</sup> σε βουπροπιόνη (λαμβάνοντας υπόψη την επισημασμένη ποσότητα βουπροπιόνης στη σύνθεση). Η διάλυση πραγματοποιήθηκε με υπερήχους για 30 λεπτά και στη συνέχεια με διήθηση. Τέλος, τα διαλύματα δειγμάτων αραιώθηκαν με νερό σε 100 mg L<sup>-1</sup>.

Για βαθμονόμηση με την τυπική μέθοδο προσθηκών τρεις αυξανόμενες συγκεντρώσεις προτύπου ρακεμικής βουπροπιόνης (20, 40 και 80 mg L<sup>-1</sup>) προστέθηκαν σε ένα διάλυμα κάθε φαρμακευτικής σύνθεσης με 100 mg L<sup>-1</sup> ρακεμικής βουπροπιόνης. Το προκύπτον διάλυμα εγχύθηκε απευθείας στο ηλεκτροφορητικό σύστημα. Όλα αυτά τα διαλύματα

(ρυθμιστικά διαλύματα, πρότυπα και δείγματα) διηθήθηκαν μέσω μεμβράνης (Castro-Puyana et al, 2008).

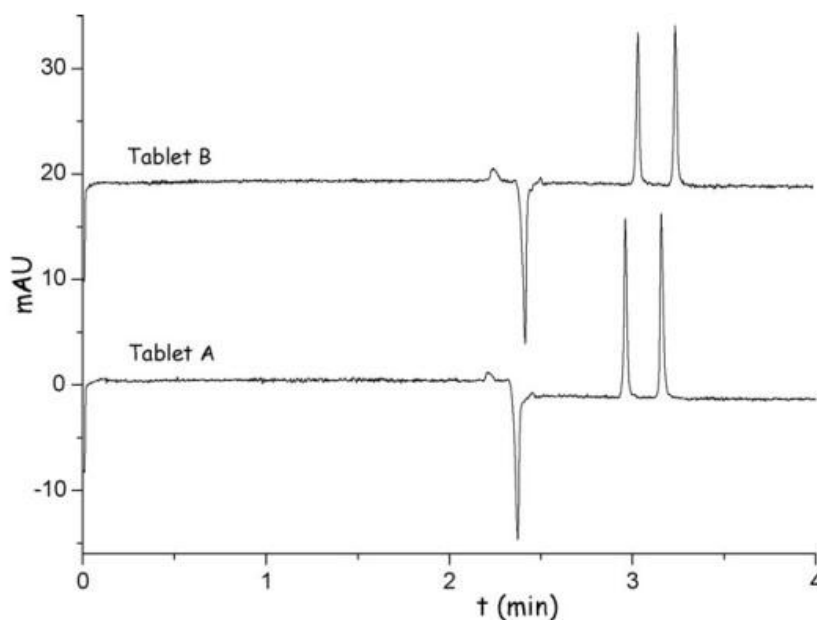
Λαμβάνοντας υπόψη την τιμή  $pK_a$  για τη βουπροπιόνη ( $pK_a = 7,4$ ), σχεδιάστηκαν τρεις κύριες στρατηγικές για την προσπάθεια του εναντιομερούς διαχωρισμού: η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος οξικού σε  $pH\ 5,0$ , όπου η υπό μελέτη αναλυόμενη ουσία ήταν κατιονική, είτε με ουδέτερη κυκλοδεξτρίνη, είτε με κυκλοδεξτρίνη φορτισμένη αρνητικά ή, η χρήση βορικού ρυθμιστικού διαλύματος σε  $pH\ 9,0$ , όπου η αναλυόμενη ουσία ήταν ουδέτερη με κυκλοδεξτρίνη φορτισμένη αρνητικά. Σε αυτά τα πειράματα, όλες οι κυκλοδεξτρίνες δοκιμάστηκαν χρησιμοποιώντας συγκέντρωση  $10\ mM$  σε  $50\ mM$  του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος, με τάση διαχωρισμού  $20\ kV$ , θερμοκρασία  $20\ ^\circ C$  και συγκέντρωση ρακεμικού μίγματος βουπροπιόνης  $200\ mg /L$ . Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, η θειική κυκλοδεξτρίνη επιλέχθηκε ως χειρόμορφος επιλογέας σε ρυθμιστικό διάλυμα βορικών ( $pH\ 9,0$ ) προκειμένου να αναπτυχθεί μια ταχεία χειρόμορφη μέθοδος για την ανάλυση της βουπροπιόνης (Castro-Puyana et al, 2008).

Χρησιμοποιώντας μια συγκέντρωση  $10\ mM$  θειικής κυκλοδεξτρίνης, μελετήθηκε επίσης η διακύμανση της εναντιομερικής ανάλυσης και ο χρόνος μετανάστευσης για τα δύο εναντιομερή βουπροπιόνης ως συνάρτηση της θερμοκρασίας με διακύμανση από τους  $15$  έως τους  $30\ ^\circ C$  ( $15, 20, 25$  και  $30\ ^\circ C$ ). Η εναντιομερική ανάλυση αυξήθηκε με τη μείωση της θερμοκρασίας, αλλά ο χρόνος μετανάστευσης αυξήθηκε λόγω της αύξησης του ιξώδους του διαλύματος ή των αλληλεπιδράσεων εναντιομερούς-κυκλοδεξτρίνης. Η θερμοκρασία  $30\ ^\circ C$  επιλέχθηκε ως θερμοκρασία εργασίας αφού επέτρεψε τον ξεκάθαρο διαχωρισμό των εναντιομερών βουπροπιόνης σε σύντομο χρόνο ανάλυσης ( $\sim 6,2$  λεπτά).

Τέλος, υπό τις παραπάνω επιλεγμένες συνθήκες (συγκέντρωση θειικής κυκλοδεξτρίνης  $10\ mM$  και θερμοκρασία  $30\ ^\circ C$ ), διερευνήθηκε η επίδραση της εφαρμοζόμενης τάσης από  $20$  έως  $30\ kV$ . Μπορεί να παρατηρηθεί ότι μια αύξηση στην τάση διαχωρισμού προκάλεσε μείωση του χρόνου μετανάστευσης και μείωσε την ανάλυση του διαχωρισμού. Ωστόσο, μια τιμή  $30\ kV$  οδήγησε στον συντομότερο χρόνο μετανάστευσης ( $\sim 3,5$  λεπτά) με ξεκάθαρο διαχωρισμό ανάλυση και αποδεκτή ένταση ρεύματος ( $\sim 100\ A$ ). Οι βελτιστοποιημένες

συνθήκες διαχωρισμού επέτρεψαν τον καλύτερο εναντιομερικό διαχωρισμό της στον συντομότερο χρόνο μετανάστευσης (Castro-Puyana et al, 2008)

Παρατηρήθηκε κατάλληλη εκλεκτικότητα διαχωρισμού για την αναπτυγμένη μέθοδο (Διάγραμμα 2-11), αφού τα εναντιομερή της βουπροπιόνης ήταν καλά διαχωρισμένα και δεν υπήρχαν ενδείξεις παρεμβολών από άλλα συστατικά που υπάρχουν στις φαρμακευτικές συνθέσεις. Επιπλέον, η σύγκριση των κλίσεων που ελήφθησαν κατά τη χρήση της εξωτερικής τυπικής μεθόδου βαθμονόμησης και της μεθόδου βαθμονόμησης τυπικών προσθηκών χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση της ύπαρξης πιθανών παρεμβολών μήτρας (Castro-Puyana et al, 2008).



**Διάγραμμα 2-11: Διαχωρισμός των εναντιομερών της βουπροπιόνης σε φαρμακευτικά σκευάσματα (Castro-Puyana et al., 2008).**

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τη δοκιμή t ( $p\text{-value} > 0,05$ ) έδειξαν ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κλίσεων που ελήφθησαν από το εξωτερικό πρότυπο και των τυπικών μεθόδων βαθμονόμησης προσθηκών και για τα δύο εναντιομερή (Πίνακας 2-8). Επομένως, η εξωτερική πρότυπη μέθοδος βαθμονόμησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επιτευχθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός των εναντιομερών της βουπροπιόνης σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Δεν υπήρχαν σημαντικές αποκλίσεις από την

ποσότητα που αναγραφόταν και εκείνη που ανιχνεύθηκε πειραματικά (Castro-Puyana et al, 2008).

Σε αυτή την εργασία αναπτύχθηκε μια μέθοδος που επιτρέπει τον γρήγορο εναντιομερικό διαχωρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό της βουπροπιόνης. Η μέθοδος βελτίωσε τα αποτελέσματα που ελήφθησαν προηγουμένως όσον αφορά την ανάλυση και τον χρόνο ανάλυσης. Επιπλέον, είναι η πρώτη μέθοδος CE που επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των εναντιομερών βουπροπιόνης και η πρώτη μέθοδος που επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των εναντιομερών της βουπροπιόνης σε φαρμακευτικές συνθέσεις. Η μέθοδος βασίστηκε στη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος βορικών 50 mM σε pH 9,0 με θειικό 10 mM - CD, θερμοκρασία 30 °C και 30 kV ως τάση διαχωρισμού και επέτρεψε τον χειρομορφικό διαχωρισμό των εναντιομερών βουπροπιόνης με υψηλή ανάλυση (> 7) και σε σύντομο χρόνο ανάλυσης (3,5 min). Επιτεύχθηκαν LOD 1,8 mg /L για κάθε εναντιομερές βουπροπιόνης και η μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία, για πρώτη φορά, στον ποσοτικό προσδιορισμό των εναντιομερών της βουπροπιόνης σε φαρμακευτικά σκευάσματα (Castro-Puyana et al, 2008).

Πίνακας 2-8: Δεδομένα της επικύρωσης της μεθόδου (Castro-Puyana et al., 2008).

	First-migrating enantiomer	Second-migrating enantiomer
Linearity		
Linear range	10–100 mg L <sup>-1</sup>	10–100 mg L <sup>-1</sup>
Linear equation	$y = -0.199 + 0.138x$	$y = -0.196 + 0.135x$
Standard errors	$s_a = 0.075, s_b = 0.001$	$s_a = 0.076, s_b = 0.001$
Correlation coefficient ( $r$ )	0.9995	0.9995
$p$ -value of ANOVA	0.938	0.742
LOD	1.8 mg L <sup>-1</sup>	1.8 mg L <sup>-1</sup>
LOQ	5.1 mg L <sup>-1</sup>	5.2 mg L <sup>-1</sup>
Precision		
Instrumental repeatability ( $n=6$ )		
Ac, R.S.D. (%)	3.2	2.7
$t$ , R.S.D. (%)	0.6	0.7
Method repeatability ( $n=9$ )		
Ac, R.S.D. (%)	2.1	2.6
$t$ , R.S.D. (%)	1.3	1.3
Intermediate precision ( $n=9$ )		
Ac, R.S.D. (%)	3.8 <sup>a</sup> , 4.5 <sup>b</sup> , 5.7 <sup>c</sup>	4.0 <sup>a</sup> , 4.8 <sup>b</sup> , 5.2 <sup>c</sup>
$t$ , R.S.D. (%)	2.0 <sup>a</sup> , 1.3 <sup>b</sup> , 3.1 <sup>c</sup>	2.0 <sup>a</sup> , 1.5 <sup>b</sup> , 3.3 <sup>c</sup>
Accuracy		
Mean recovery (%)	103 ± 3 <sup>b</sup> , 100 ± 7 <sup>c</sup>	102 ± 4 <sup>b</sup> , 101 ± 7 <sup>c</sup>
Study of matrix interferences		
$p$ -value of $t$ -test	0.059 <sup>b</sup> 0.052 <sup>c</sup>	0.065 <sup>b</sup> 0.117 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Standard.

<sup>b</sup> Tablet A.

<sup>c</sup> Tablet B.

### 3. Αποτελέσματα - Συμπεράσματα

Παρακάτω δίδεται συγκεντρωτικός πίνακας των δημοσιεύσεων που αναλύθηκαν για την κάθε τεχνική:

**Πίνακας 4.1: Πίνακας των δημοσιεύσεων που αναλύθηκαν για την κάθε τεχνική.**

Δημοσίευση	Σκεύασμα	Εναντιομερή που διαχωρίστηκαν	Τεχνική	Χρωματογραφική Στήλη /Τριχοειδές CE	Ανιχνευτής	Όρια ανίχνευσης	Σχόλια
Gondová et al., 2011	δισκίο	L και D θυροξίνη	HPLC	τεϊκοπλακίνη	UV	0.15 mg/mL L-T4 , 0.20 mg/mL D-T4	-
Saleh et al., 2009	σιρόπι	S και R προμεθαζίνη	HPLC	Vancomycin Chirobiotic V	UV	0,04 µg/mL	-
Petrović al., 2005	δισκίο	S και R προυφένες	GC	παράγωγο κυκλοδεξτρίνης	ιονισμού φλόγας	-	φέρων αέριο H <sub>2</sub>
Vashistha & Bhushan, 2020	δισκίο	S και R ατενολόλη και προπρανολόλη	TLC	υάλινο πλακίδιο με silica gel	ιώδιο	1.2 µg/mL ατενολόλη, 1.6 µg mL προπρανολόλη	S-ναπροξένη χειρόμορφο πρόσθετο και αντιδραστήριο παραγωγοποίησης
Bhushan & Gupta, 2020	δισκίο	S και R βεραπιμίλη	TLC	υάλινο πλακίδιο με silica gel	ιώδιο	0.074 µg/mL για κάθε εναντιομερές	βανκομυκίνη ως χειρόμορφο πρόσθετο
Mikuš et al., 2009	δισκίο	S και R αμλοπιδίνη	CZE	τριχοειδές silica	UV	2.41 µg/mL και 2.53 µg/mL	HP-b-CD ως χειρόμορφος επιλογέας
Kavalírová et al., 2004	Κά3,ουλες	S και R ριβοσταγμίνη	CZE	τριχοειδές silica επικαλυμένο με πολυακρυλαμίδιο	UV	5µM για κάθε εναντιομερές	οι φορτισμένες κυκλοδεξτρίνες που δοκιμάστηκαν έδωσαν πιο αποτελεσματικό διαχωρισμό
Wang et al., 2009	ενέσιμα σκευάσματα	S και R κεφοταξίμη	CZE	τριχοειδές silica	UV	μικρότερο του 0.5 mg/mL και για τα δυο εναντιομερή	-
Menéndez-López et al., 2017	δισκία	S και R κολχικίνη	EKC	τριχοειδές silica	UV	0.3 mg/L για το R-εναντιομερές και για τις δυο θετική CD	ουσιαστικά δυο μέθοδοι, η καθεμία με διαφορετική κυκλοδεξτρίνη ως χειρόμορφο επιλογή
Castro-Puyana et al., 2008	δισκία	S και R βουπροπρόνη	EKC	τριχοειδές silica	UV	1.8 mg/L για κάθε εναντιομερές	κυκλοδεξτρίνη ως χειρόμορφος επιλογέας

Αρχικά, αναφέρεται ότι τα εναντιομερή λόγω του γεγονότος ότι οι φαρμακολογικές τους δράσεις μπορεί να μη ταυτίζονται, να μην είναι το ίδιο δραστικά ή ακόμη και το ένα να είναι τοξικό, έχουν απασχολήσει τους ερευνητές ώστε να βρουν τρόπους διαχωρισμού τους ή και τρόπους να ανιχνεύονται σε φαρμακευτικά σκευάσματα για λόγους ελέγχου ποιότητας. Υπάρχουν δυο μεγάλες κατηγορίες τεχνικών διαχωρισμού, αντίχενυσης και ποσοτικοποίησης τους: οι χρωματογραφικές τεχνικές και οι τεχνικές τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης. Ενώ όλες οι χρωματογραφικές τεχνικές χρησιμοποιούνται γι' αυτό το σκοπό, από τις τεχνικές τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης έχουν επιστρατευτεί η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης και η ηλεκτροκινητική χρωματογραφία. Επισημαίνεται ότι αν και η χρωματογραφία υπερκρίσιμου υγρού χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό εναντιομερών, δε βρέθηκε κάποια δημοσίευση που να αφορά διαχωρισμό εναντιομερών σε φαρμακευτικά σκευάσματα

Από τον πίνακα φαίνεται ότι βρέθηκε ίσος αριθμός δημοσιεύσεων για τη χρωματογραφία και την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση. Η τεχνική με τις περισσότερες δημοσιεύσεις ήταν η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης. Από την βιβλιογραφία που βρέθηκε για την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζώνης και συγκεκριμένα της έρευνας του Terabe, αναφέρεται ότι αν και η HPLC είναι η πιο επιτυχής τεχνική για τους διαχωρισμούς εναντιομερών, αποτελεί, υπό προϋποθέσεις, μια ισάξια εναλλακτική, καθώς έχει μεγάλη αποτελεσματικότητα διαχωρισμού και το μέσο διαχωρισμού μπορεί να αλλάξει εύκολα, κάτι που της δίνει ένα πλεονέκτημα έναντι της HPLC (Terabe, 1994).

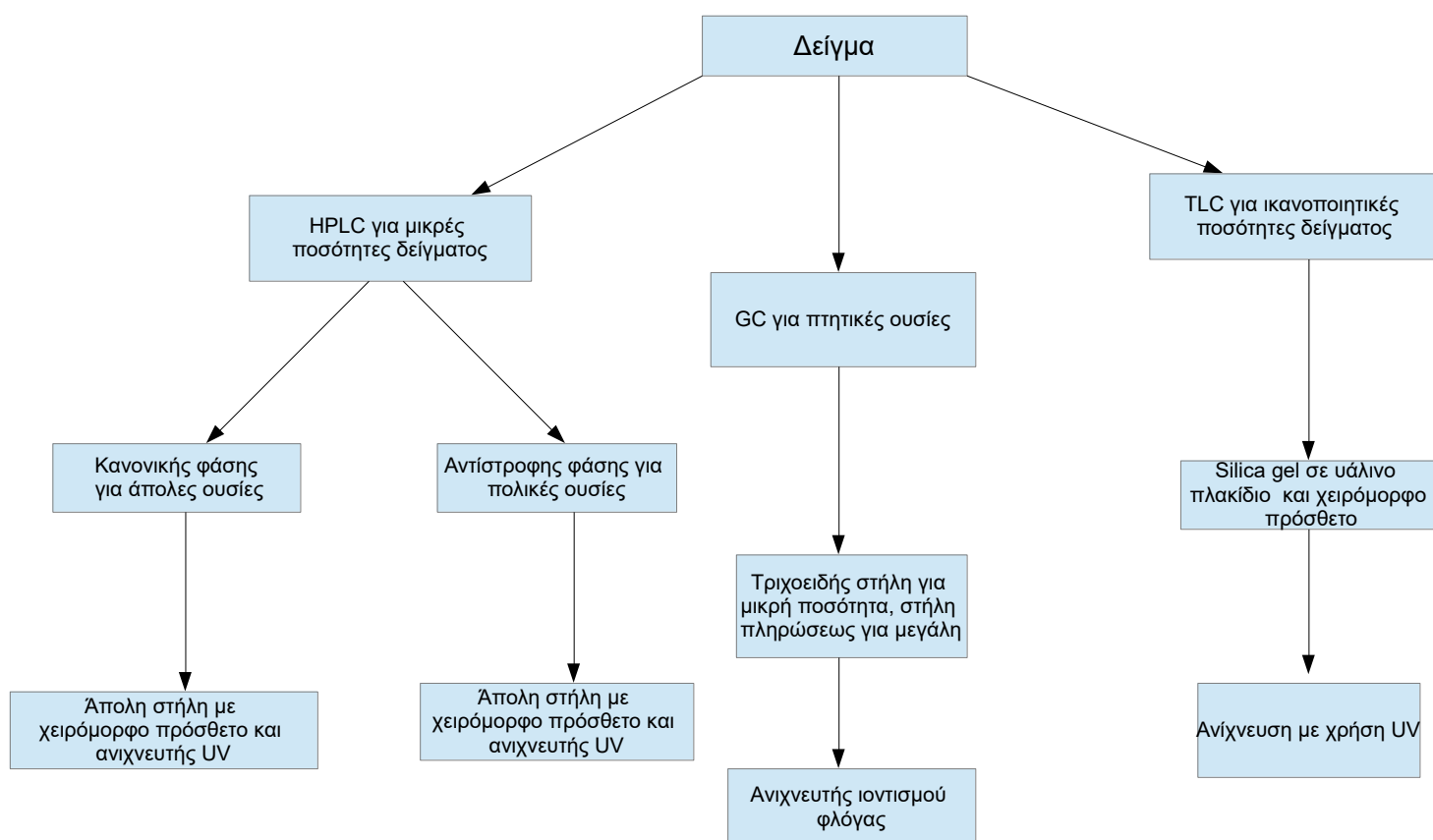
Εξετάζοντας τη φύση των δειγμάτων, φαίνεται ότι η πλειονότητα των πειραμάτων γίνεται σε δισκία. Ακόμη, συχνότερα γίνεται αντίχενυση των εναντιομερών με UV. Επίσης, στην πλειονότητα των περιπτώσεων παρατηρείται ότι χρησιμοποιούνται χειρόμορφα πρόσθετα, συνήθως κυκλοδεξτρίνες.



Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, ένας τρόπος χειρισμού και ανάλυσης του δείγματος που θα μπορούσε να συστηθεί είναι:

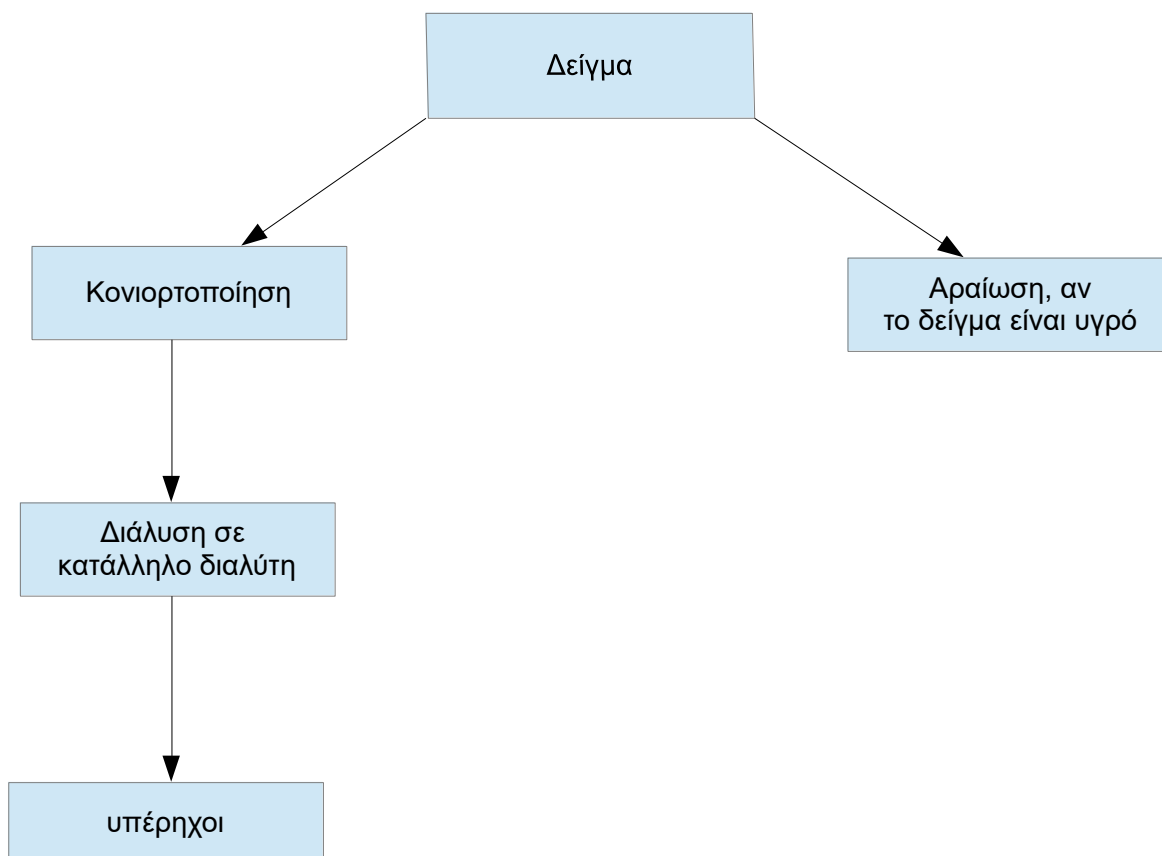
- καθώς η ανάλυση εναντιομερών σε φαρμακευτικά σκευάσματα περιλαμβάνει κυρίως δισκία, για υιοθέτηση μιας πιο φιλικής προς το περιβάλλον προσέγγισης, προτείνεται κονιορτοποίηση και διάλυση σε έναν εύτηκτο διαλύτη
- διαχωρισμός και ταυτόχρονα ποσοτικός προσδιορισμός τους με HPLC κανονικής ή αντίστροφης φάσης, ανάλογα με την πολικότητα της προσδιοριζόμενης ουσίας, σε μη χειρόμορφη στήλη, με χειρόμορφο πρόσθετο και ανιχνευτή UV.

Ωστόσο, επειδή δεν είναι δυνατόν τα δείγματα να ακολουθούν το ίδιο μοτίβο, παρακάτω δίδεται ένα διάγραμμα ροής με προτεινόμενους χειρισμούς, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του δείγματος:



**Διάγραμμα 3.1: Διάγραμμα ροής με προτεινόμενους χειρισμούς ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του δείγματος**

Επίσης, επειδή το δείγμα δεν είναι πάντα σε μορφή δισκίου, παρακάτω δίδεται ένα λογικό διάγραμμα για το χειρισμό του δείγματος:



**Διάγραμμα 3.2:** Διάγραμμα ροής με προτεινόμενους χειρισμούς για την περίπτωση που το δείγμα δεν είναι σε μορφή δισκίου.

## Βιβλιογραφία

- Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγιάς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ., & Φούντζουλα, Χ. (2015). Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα. [Εργαστηριακός Οδηγός]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. Διαθέσιμο στο: <https://hdl.handle.net/11419/5388>
- Mc Murry J (2009), Οργανική Χημεία, Τόμος Ι, Κρήτη, Εκδόσεις
- Skoog, Holler, Nieman, (2005), Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης, Αθήνα, Εκδόσεις Κωσταράκης.
- Σπηλιόπουλος, Ι., & Βάκρος, Ι. (2023). Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας Χημεία - Εργαστηριακές Ασκήσεις [Εργαστηριακός Οδηγός]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. Διαθέσιμο στο: <https://hdl.handle.net/11419/10743>
- Berger, T. A. (2015). Instrumentation for analytical scale supercritical fluid chromatography. Journal of Chromatography A, 1421, 171-183.
- Bhushan R.; Gupta D, (2005). Thin-layer chromatography separation of enantiomers of verapamil using macrocyclic antibiotic as a chiral selector. Biomed. Chromatog, 19(6), 474-478.
- Castro-Puyana, M., García, M. Á., & Marina, M. L. (2008). Enantiomeric separation of bupropion enantiomers by electrokinetic chromatography: quantitative analysis in pharmaceutical formulations. Journal of Chromatography B, 875(1), 260-265.
- Chandrul, K. K., & Srivastava, B. (2010). Enantiomeric separation in pharmaceutical analysis: a chromatographic approach. J Chem Pharm Res, 2, 923-934.
- Chester, T. L., & Pinkston, J. D. (2002). Supercritical fluid and unified chromatography. Analytical chemistry, 74(12), 2801-2811.
- Christian, G. D., Dasgupta, P. K., & Schug, K. A. (2013). Analytical chemistry. John Wiley & Sons.
- Eriksson, T., Björkman, S., & Höglund, P. (2001). Clinical pharmacology of thalidomide. European journal of clinical pharmacology, 57(5), 365-376.
- Eriksson, T., Björkman, S., Roth, B., Fyge, A., & Höglund, P. (1995). Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. Chirality, 7(1), 44-52.

- Fabro, S., Smith, R. L., & Williams, R. T. (1967). Toxicity and teratogenicity of optical isomers of thalidomide. *Nature*, 215(5098), 296-296.
- Gondová, T. Á., Petrovaj, J., Suchá, M., & Armstrong, D. W. (2011). Stereoselective HPLC determination of thyroxine enantiomers in pharmaceuticals. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 34(19), 2304-2314.
- Gumustas, M., Ozkan, S. A., & Chankvetadze, B. (2018). Analytical and preparative scale separation of enantiomers of chiral drugs by chromatography and related methods. *Current medicinal chemistry*, 25(33), 4152-4188.
- Hou, J., Zheng, J., & Shamsi, S. A. (2007). Separation and determination of warfarin enantiomers in human plasma using a novel polymeric surfactant for micellar electrokinetic chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography a*, 1159(1-2), 208-216.
- Jibuti, G., Mskhiladze, A., Takaishvili, N., Karchkhadze, M., Chankvetadze, L., Farkas, T., & Chankvetadze, B. (2012). HPLC separation of dihydropyridine derivatives enantiomers with emphasis on elution order using polysaccharide-based chiral columns. *Journal of separation science*, 35(19), 2529-2537.
- Kavalírová, A., Pospíšilová, M., & Karlíček, R. (2004). Enantiomeric analysis of rivastigmine in pharmaceuticals by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis. *Analytica chimica acta*, 525(1), 43-51.
- Lodén, H. (2008). Separation of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis using Partial Filling and Multiple-injections (Doctoral dissertation, Acta Universitatis Upsaliensis).
- Majewski, Wieslaw; Valery, Eric; Ludemann-Hombourger, Olivier. (2005). Principle and Applications of Supercritical Fluid Chromatography, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28(7), 1233–1252.
- McNair, H. M., Miller, J. M., & Snow, N. H. (2019). Basic gas chromatography. John Wiley & Sons.
- Menéndez-López, N., Valimaña-Traverso, J., Castro-Puyana, M., Salgado, A., García, M. Á., & Marina, M. L. (2017). Enantiomeric separation of the antiuremic drug colchicine by electrokinetic chromatography. Method development and quantitative analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 138, 189-196.

- Mikuš, P., Marakova, K., Valášková, I., & Havránek, E. (2009). Determination of amlodipine enantiomers in pharmaceuticals using capillary electrophoresis separation and diode array detection. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64(2), 76-79.
- Okamoto, Y., & Ikai, T. (2008). Chiral HPLC for efficient resolution of enantiomers. *Chemical Society Reviews*, 37(12), 2593-2608.
- Petrović, M., Debeljak, Ž., & Blažević, N. (2005). Optimization of gas chromatographic method for the enantioseparation of arylpropionic non-steroidal anti-inflammatory drug methyl esters. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 39(3-4), 531-534.
- Poole, C. (Ed.). (2021). *Gas chromatography*. Elsevier.
- Saleh, O. A., El-Azzouny, A. A., Aboul-Enein, H. Y., & Badawy, A. M. (2009). A validated HPLC method for separation and determination of promethazine enantiomers in pharmaceutical formulations. *Drug development and industrial pharmacy*, 35(1), 19-25.
- Smith, D. F. (1989). The stereoselectivity of drug action. *Pharmacology & toxicology*, 65(5), 321-331.
- Terabe, S. (2010). Twenty-five years of micellar electrokinetic chromatography. *Procedia Chemistry*, 2(1), 2-8.
- Terabe, S. (2009). Capillary separation: micellar electrokinetic chromatography. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2(1), 99-120.
- Terabe, S. (2008). Micellar electrokinetic chromatography for high-performance analytical separation. *The Chemical Record*, 8(5), 291-301.
- Terabe, S., Otsuka, K., & Nishi, H. (1994). Separation of enantiomers by capillary electrophoretic techniques. *Journal of Chromatography A*, 666(1-2), 295-319.
- Vashistha, V. K., & Bhushan, R. (2020). Thin-layer chromatographic enantioseparation of atenolol and propranolol using (S)-naproxen as chiral selector: direct and indirect approaches. *JPC–Journal of Planar Chromatography–Modern TLC*, 33, 101-107.
- Vashistha, V. K., & Bhushan, R. (2015). Chirality recognition for assessing the enantiomeric purity of Betaxolol. *Tetrahedron: Asymmetry*, 26(5-6), 304-311.
- Wang, R., Jia, Z. P., Fan, J. J., Jun, M., Hua, X., Zhang, Q., & Wang, J. (2009). Separation and determination of cefotaxime enantiomers in injections by capillary zone electrophoresis. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64(3), 156-160.

- Wang, B. S., Wang, H., Wei, Z. H., Song, Y. Y., Zhang, L., & Chen, H. Z. (2009). Efficacy and safety of natural acetylcholinesterase inhibitor huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease: an updated meta-analysis. *Journal of neural transmission* (Vienna, Austria : 1996), 116(4), 457–465.
- Wnendt, S., Finkam, M., Winter, W., Ossig, J., Raabe, G., & Zwingenberger, K. (1996). Enantioselective inhibition of TNF-alpha release by thalidomide and thalidomide-analogues. *Chirality*, 8(5), 390–396.
- Xie, S., Hu, C., Li, L., Zhang, J., Fu, N., Wang, B., & Yuan, L. (2018). Homochiral metal-organic framework for HPLC separation of enantiomers. *Microchemical Journal*, 139, 487-491.