

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „CAROL
DAVILA” BUCUREȘTI
FACULTATEA DE FARMACIE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**LICHIDELE IONICE CHIRALE. APLICAȚII ÎN ANALIZA
FARMACEUTICĂ PRIN ELECTROFOREZĂ CAPILARĂ.**

REZUMAT

Doctorand: Farm. sp. Lucian-Mihai Stănescu

Coordonator științific: Prof. Dr. Farm. Crina-Maria Monciu

BUCUREȘTI

2017

CUPRINS

1. INTRODUCERE	1
2. Chiralitate. Separări chirale. Selectorii chirali	2
2.1. Lichide ionice chirale	7
2.1.1. Sinteza lichidelor ionice chirale	11
2.2. Ciclodextrine	12
3. Electroforeza capilară. Principii.	14
3.1. Modele matematice ale separărilor enantiomerilor prin CE cu selectorii chirali	17
3.2. Aplicații ale lichidelor ionice în electroforeza capilară	21
3.2.1. Separări prin electroforeza capilară în mediu apos în prezența lichidelor ionice chirale ca selectorii chirali unici și duali	21
3.2.2. Separări în electroforeză capilară prin schimb chiral de liganzi (LECE) în prezența lichidelor ionice chirale	30
3.2.3. Separări prin electroforeză capilară în mediu neapos în prezența lichidelor ionice chirale	33
4. Substanțele medicamentoase studiate	34
5. PARTEA EXPERIMENTALĂ. CERCETĂRI PERSONALE	38
5.1. Sinteza și caracterizarea lichidelor ionice chirale	39
5.1.1. Determinarea purității prin cromatografie în strat subțire	41
5.1.2. Determinările spectrelor ¹ H-RMN ale lichidelor ionice chirale	42
5.1.3. Puterea rotatorie specifică	49
5.1.4. Spectrele IR	50
5.1.5. Analiza elementală	60
5.2. Studiul enantioselectivității lichidelor ionice chirale asupra separărilor prin electroforeză capilară în mediu apos a unor amestecuri racemice medicamentoase	62
5.2.1. Cercetări preliminare	62
5.2.1.1. Capacitatea de enantioseparare a β-ciclodextrinei asupra amestecului racemic al clorhidratului de ondansetron	68

5.2.1.2.	Influența precursorilor lichidelor ionice chirale asupra capacității de separare a β CD	70
5.2.1.3.	Capacitatea de enantioseparare a sistemului de selectori β -ciclodextrină-LeuTBA și β -ciclodextrină-LeuTMA asupra clorhidratului de ondansetron	71
5.2.2.	Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori β ciclodextrină-lichid ionic chiral derivat de tetrabutilamoniu, respectiv, β ciclodextrină-lichid ionic chiral derivat de tetrametilamoniu asupra unor amestecuri racemice medicamentoase	78
5.2.2.1.	Capacitatea de enantioseparare a β CD asupra amestecului racemic al clorhidratului mianserinei	79
5.2.2.2.	Influența precursorilor lichidelor ionice chirale asupra capacității de separare a β CD	81
5.2.2.3.	Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori β -ciclodextrină-LeuTBA și β -ciclodextrină-LeuTMA asupra amestecului racemic al clorhidratului mianserinei	82
5.2.2.4.	Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori β -ciclodextrină-HisTBA și β -ciclodextrină-HisTMA asupra amestecurilor racemice ale clorhidratului ondansetronului și clorhidratului mianserinei	86
5.2.2.5.	Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori β -ciclodextrină-ProTBA și β -ciclodextrină-ProTMA asupra amestecurilor racemice ale clorhidratului ondansetronului și clorhidratului mianserinei.....	92
5.2.3.	Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori hidroxipropil- β -ciclodextrină-lichid ionic chiral derivat de tetraalchilamoniu asupra unor amestecuri racemice medicamentoase	96
5.2.3.1.	Capacitatea de enantioseparare a hidroxipropil- β -ciclodextrinei asupra amestecurilor racemice ale ofloxacinei, clorhidratului ondansetronului și clorhidratului mianserinei	97
5.2.3.2.	Influența precursorilor lichidelor ionice chirale asupra capacității de separare a HP β CD	100

5.2.3.3.	Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori HP β CD-LeuTBA și HP β CD-LeuTMA asupra amestecurilor racemice ale ofloxacinei, clorhidratului ondansetronului și, respectiv, clorhidratului mianserinei	101
5.2.3.4.	Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori HP β CD-HisTBA și HP β CD-HisTMA asupra amestecurilor racemice ale ofloxacinei, clorhidratului de ondansetron și, respectiv, clorhidratului de mianserină	110
5.2.3.5.	Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori HP β CD-ProTBA și HP β CD-ProTMA asupra amestecurilor racemice ale ofloxacinei, clorhidratului de ondansetron și clorhidratului de mianserină.....	118
5.2.4.	Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori RAMEB-lichid ionic chiral derivat de tetraalchilamoniu asupra unor amestecuri racemice medicamentoase	127
5.2.4.1.	Capacitatea de enantioseparare a β -ciclodextrinei metilate aleator asupra amestecurilor racemice ale ofloxacinei, clorhidratului ondansetronului și, respectiv, clorhidratului mianserinei	128
5.2.4.2.	Influența precursorilor lichidelor ionice chirale asupra capacității de separare a RAMEB	131
5.2.4.3.	Capacitatea de enantioseparare a sistemului de selectori RAMEB-LeuTBA și RAMEB-LeuTMA asupra amestecurilor racemice ale ofloxacinei, clorhidratului ondansetronului și, respectiv, clorhidratului mianserinei	132
5.2.4.4.	Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori RAMEB-HisTBA și RAMEB-HisTMA asupra amestecurilor racemice ale ofloxacinei, clorhidratului ondansetronului și, respectiv, clorhidratului mianserinei	141
5.2.4.5.	Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori RAMEB-ProTBA și RAMEB-ProTMA asupra amestecurilor racemice ale	

ofloxacinei, clorhidratului ondansetronului și, respectiv, clorhidratului mianserinei	147
5.2.5. Influența enantioselectivității sistemelor lichid ionic chiral-ciclodextrină asupra mobilităților efective ale separărilor	154
5.2.6. Concluzii	159
5.3. Studiul enantioselectivității lichidelor ionice chirale la separarea unor amestecuri racemice de aminoacizi prin schimb chiral de liganzi (LECE)	160
5.3.1. Capacitatea de enantioseparare a sistemului ProTMA-Cu ²⁺ la separarea unor amestecuri racemice de aminoacizi	160
5.3.2. Efectul concentrației ProTMA și a tipului de modificador organic asupra separării amestecurilor racemice de aminoacizi	162
5.3.3. Efectul concentrației ProTMA asupra mobilităților efective	164
5.3.4. Efectul tipului de modificador organic asupra separării enantiomerilor acidului DL aspartic	165
5.4. Studiul enantioselectivității lichidelor ionice chirale asupra separării unor amestecuri racemice medicamentoase în separări electroforetice în mediu neapos (NACE)	166
5.4.1. Capacitatea de enantiodiscriminare a β-ciclodextrinei și a lichidelor ionice chirale asupra unor amestecuri racemice medicamentoase	167
5.4.2. Efectul concentrației componentelor sistemului binar βCD-L-ProTMA asupra separărilor	168
5.4.3. Efectul potențialului aplicat și a temperaturii de lucru	170
6. CONCLUZII GENERALE	171

1. INTRODUCERE

În ultimii ani importanța separatologiei ca ramură a chimiei analitice a crescut datorită necesității separării unor amestecuri complexe. Tehnicile utilizate au progresat, fie prin miniaturizare (electroforeza capilară în microcip), fie prin creșterea sensibilității metodei (spectrometria de masă). Chiralitatea este o caracteristică particulară a materiei vii, iar separările chirale sunt o ramură a separatologiei importantă pentru științele vieții: biologia și științele medicale.

În domeniul farmaceutic, mai ales din cauza acțiunilor farmacologice diferite, dar și a reacțiilor adverse diferite ale enantiomerilor, unele medicamente sunt prescrise sub forma unui singur enantiomer, fiind necesară separarea acestuia din amestecul racemic.

Datorită avantajelor pe care le prezintă, electroforeza capilară de afinitate este adesea folosită, mai ales în ultimii 30 de ani, în separările chirale, fiind utilizați selectorii chirali care sunt dizolvați în electrolitul de lucru. Dintre selectorii chirali, rezultate interesante s-au obținut în prezența ciclodextrinelor native și derivatizate.

Eficiențizarea separărilor se obține adeseori prin folosirea unor sisteme binare de selectori. Există referiri interesante în literatura de specialitate referitoare la sistemele de selectori care folosesc ciclodextrine și lichide ionice chirale.

Lichidele ionice chirale sunt specii chimice ionofore, cu punctul de topire, în general sub 100°C, care fie datorită cationului organic voluminos, fie datorită anionului organic sau anorganic, de asemenea voluminos, fie datorită ambilor ioni posedă asimetrie moleculară, proprietate datorită căreia, mai ales în ultimii 10 ani, au fost utilizate ca selectori chirali în electroforeza capilară. Deoarece uneori capacitatea lor de enantiodiscriminare nu este suficientă pentru separarea unor amestecuri racemice, se folosesc în asociere, mai ales cu ciclodextrinele.

Am considerat că poate fi de interes, ca subiect al tezei de doctorat, studiul capacității enantioselective a unor sisteme binare de selectori, ciclodextrine-lichide ionice chirale derivate de la aminoacizi, la separarea amestecurilor racemice medicamentoase ale ofloxacinei, clorhidratului ondansetronului, clorhidratului mianserinei și amestecul racemic al acidului aspartic prin electroforeză capilară, cu precizarea condițiilor experimentale care favorizează enantiodiscriminarea, studiu care să permită observații privind eventualele mecanisme de separare chirală.

5. PARTEA EXPERIMENTALĂ. CERCETĂRI PERSONALE

Considerațiile de ordin teoretic din primele capitole ale tezei, evidențiază actualitatea și importanța separărilor chirale prin electroforeză capilară utilizând lichide ionice chirale ca selectori chirali, mai ales în ultimii 10 ani, justificând alegerea subiectului lucrării .

În cercetările întreprinse în partea experimentală s-a urmărit sinteza, caracterizarea apoi utilizarea ca selectori chirali a lichidelor ionice chirale derivate de la aminoacizi în metode electroforetice pentru evaluarea capacității de enantioseparare a acestora asupra unor amestecuri racemice medicametoase.

Au fost luate în studiu lichide ionice derivate de la aminoacizi - AAIL derivate de la tetraalchilamoniu, (tetrametil, respectiv tetrabutilamoniu) deoarece există posibilitatea obținerii acestora printr-o sinteză simplă iar L-aminoacizii sunt o materie primă cu un grad de puritate optică avansat.

Aminoacizii aleși drept anioni chirali ai lichidelor ionice chirale sunt: L-leucina, L-histidina și L-prolina. Hidroxizii de tetraalchil amoniu au o bazicitate suficient de mare pentru a deprotona ușor gruparea carboxil, în urma reacției de neutralizare rezultând un singur produs secundar, apa, care poate fi ușor eliminată din sistem, prin evaporare.

Amestecurile racemice medicamentoase luate în lucru (ofloxacina, ondansetronul și mianserina) pot fi separate parțial sau total de către unele ciclodextrine.

Deoarece capacitatea de enantiodiscriminare a CIL ca selectori chirali unici este redusă, am utilizat lichidele ionice la separarea amestecurilor racemice amintite, în sisteme binare cu ciclodextrinele- β ciclodextrina nativă, hidroxipropil- β -ciclodextrina și derivatul metilat aleator al β -ciclodextrinei prin electroforeză capilară de afinitate. Am utilizat acidul DL aspartic la separări prin electroforeză capilară prin schimb chiral de liganzi.

Etaple studiului întreprins au urmărit:

- sinteza lichidelor ionice chirale conform literaturii;
- caracterizarea analitică a acestora prin analiză elementală, spectrometrie ^1H -RMN și IR, putere rotatorie specifică;
- utilizarea lichidelor ionice chirale derivate de la tetrabutil și tetrametil amoniu ca selectori chirali binari în electroforeză capilară de afinitate;
- utilizarea lichidelor ionice derivate de la tetrametil amoniu în electroforeză capilară

prin schimb chiral de liganzi;

- utilizarea lichidelor ionice derivate de la tetrametil amoniu în electroforeză capilară în mediu neapos.

5.1. Sinteza și caracterizarea lichidelor ionice chirale

S-au obținut lichide ionice chirale derivate de la aminoacizii „L”, L-leucină (Leu), L-histidină (His) și L-prolină (Pro) cu săruri de de tetrabutilamoniu (AATBA) și de tetrametilamoniu (AATMA).

Pentru sinteză s-au folosit metode citate în literatură [30,79], care au la bază reacția dintre aminoacizii naturali, forma „L” și hidroxidul cuaternar de amoniu.

Procedeu de lucru

Amestecul format din aminoacid (0,13 mmoli) suspendat în 20 mL apă și soluția de hidroxid cuaternar de amoniu (tetrabutilamoniu sau tetrametilamoniu) (0,13 mmoli), dizolvat în 20 mL apă s-au agitat pe o plită cu încălzire și cu agitare magnetică timp de 2 ore, la 60°C.

Excesul de apă se evaporă din soluția obținută la etuva timp de 6-12 h, la 60°C. Peste amestecul de reacție s-a adăugat Na₂SO₄ anhidru și 10 mL acetonitril (pentru reacția cu hidroxid de tetrabutilamoniu) sau etanol (pentru reacția cu hidroxidul de tetrametilamoniu). Aminoacidul nereacționat precipită la adăugarea solvenților organici. Suspensia se filtrează prin hârtie de filtru bandă albastră, iar filtratul obținut se evaporă la 60°C, până la pondere constantă.

S-au obținut următoarele lichide ionice derivate de la aminoacizi :

- derivați de tetrametilamoniu ai aminoacizilor (AATMA):
 - L-leucinat de tetrametilamoniu (LeuTMA) - lichid galben,
 - L-histidinat de tetrametilamoniu (HisTMA) - lichid portocaliu,
 - L-prolinat de tetrametilamoniu (ProTMA) - lichid gălbui.
- derivați de tetrabutilamoniu ai aminoacizilor (AATBA)
 - L-leucinat de tetrabutilamoniu (LeuTBA) - lichid galben,
 - L-histidinat de tetrabutilamoniu (HisTBA) - lichid siropos galben-brun,
 - L-prolinat de tetrabutilamoniu (ProTBA) - lichid gălbui.

Prođuşii obţinuţi au fost caracterizaţi prin *cromatografie în strat subţire*, *spectrometrie ¹H-RMN*, *putere rotatorie specifică*, *spectrometrie IR* şi prin *analiză elementală*.

Analiza prin cromatografie în strat subţire a permis evidenţierea purităţii lichidelor ionice cu care s-a lucrat (nu s-au observat spoturi suplimentare).

Spectrele ¹H-RMN ale lichidelor ionice s-au determinat cu spectrometrul Varian Gemini 300 BB, 300 MHz. Pentru înregistrarea spectrelor ¹H-RMN ale lichidelor ionice chirale obţinute s-a lucrat la o frecvenţă de 300 MHz, folosind ca solvent apa deuterată. S-a înregistrat variaţia deplasării semnalului protonului de la atomul de carbon chiral din poziţia α a aminoacidului şi, respectiv, al cationului tetraalchil amoniu din lichidul ionic comparativ cu aminoacidul liber/hidroxidul cuaternar de amoniu, referinţa fiind picul rezidual al apei de la 4,79 ppm.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelele 6 şi 7.

Tabel 6 Deplasările chimice ale protonilor de la atomul de carbon α din aminoacizi şi anionii aminoacidului din AAIL

<i>Deplasare chimică (ppm)</i>	<i>Pro</i>	<i>Leu</i>	<i>His</i>	<i>ProTMA</i>	<i>LeuTMA</i>	<i>HisTMA</i>	<i>ProTBA</i>	<i>LeuTBA</i>	<i>HisTBA</i>
δH^{α} (ppm)	4,080	3,699	3,912	3,627	3,352	3,412	3,755	3,498	3,554
$\Delta \delta H^{\alpha}$ (ppm)	-	-	-	0,452	0,346	0,500	0,324	0,201	0,359

Tabel 7 Deplasările chimice ale protonilor de la atomul de carbon α din hidroxizii cuaternari de amoniu şi cationii tetraalchilamoniu în AAIL

<i>Deplasare chimică (ppm)</i>	<i>TMAOH</i>	<i>TBAOH</i>	<i>ProTMA</i>	<i>LeuTMA</i>	<i>HisTMA</i>	<i>ProTBA</i>	<i>LeuTBA</i>	<i>HisTBA</i>
δH^{α} (ppm)	3,116	3,137	3,126	3,135	3,065	3,153	3,159	3,106
$\Delta \delta H^{\alpha}$ (ppm)	-	-	-0,01	-0,019	-0,051	-0,015	-0,021	-0,031

Considerăm că deplasările importante ale protonilor din poziţia α ale aminoacizilor L-Leu, L-His şi L-Pro evidenţiază interacţiunea dintre hidroxidul cuaternar de amoniu şi aminoacidul cu formarea lichidului ionic chiral (fig. 4-14).

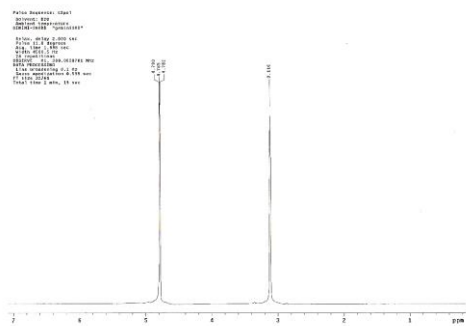


Figura 1 Spectrul $^1\text{HRMN}$ al TMAOH

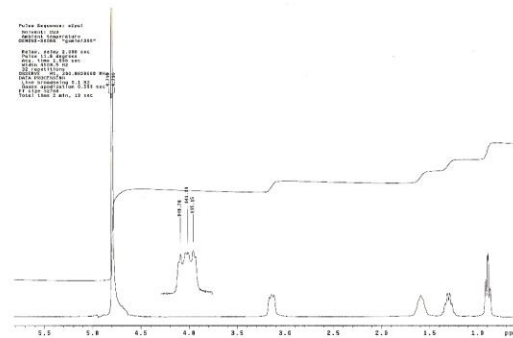


Figura 2 Spectrul $^1\text{HRMN}$ al TBAOH

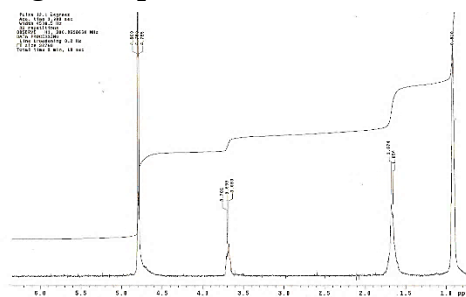


Figura 6 Spectrul $^1\text{HRMN}$ al L-leucinei

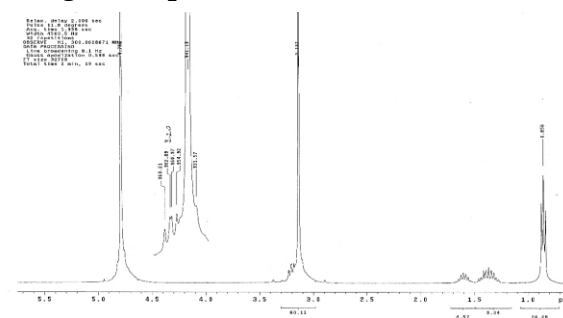


Figura 7 Spectrul $^1\text{HRMN}$ al L-LeuTMA

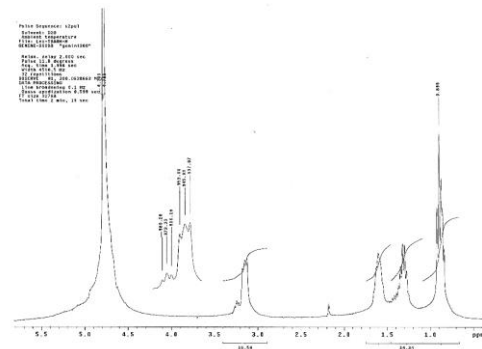


Figura 8 Spectrul $^1\text{HRMN}$ al L-LeuTBA

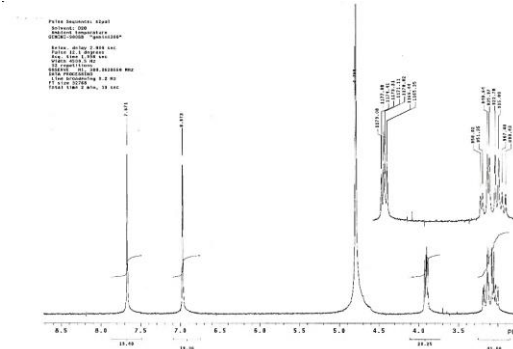


Figura 9 Spectrul $^1\text{HRMN}$ al L-histidinei

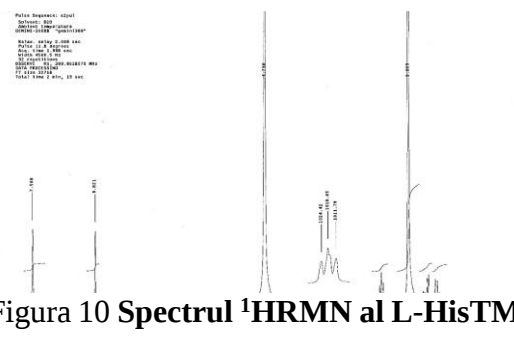


Figura 10 Spectrul $^1\text{HRMN}$ al L-HisTMA

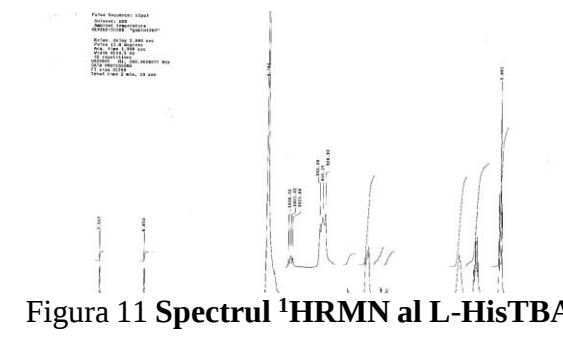


Figura 11 Spectrul $^1\text{HRMN}$ al L-HisTBA

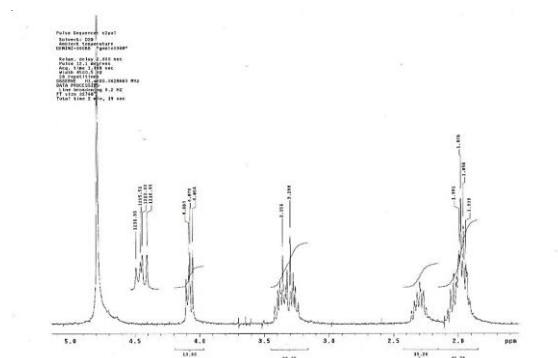


Figura 12 Spectrul ^1H RMN al L-prolinei

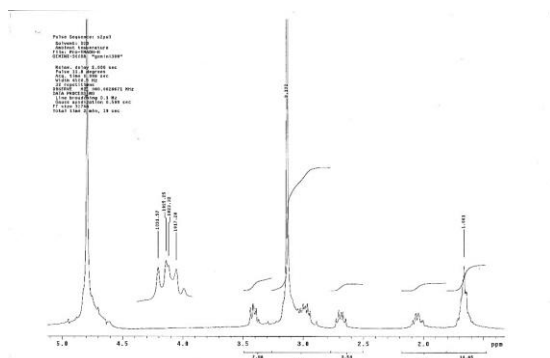


Figura 13 Spectrul ^1H RMN al L-ProTMA

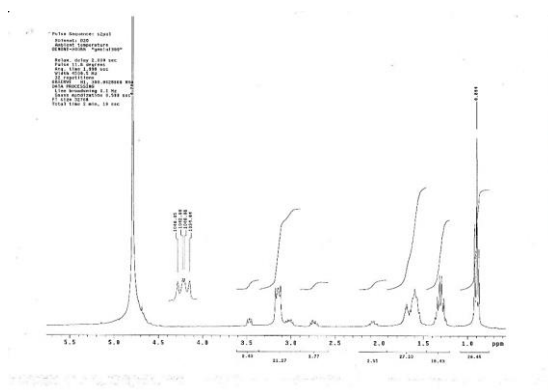


Figura 3 Spectrul ^1H RMN al L-ProTBA

Puterea rotatorie specifică

A fost determinată puterea rotatorie specifică $[\alpha]^{20}_D$, a lichidelor ionice chirale obținute, utilizând apa distilată ca solvent.

Tabel 8 Valorile $[\alpha]^{20}_D$ ale aminoacizilor și ale lichidelor ionice chirale sintetizate

Moleculă/ anion	Aminoacid		AATBA		AATMA	
	c (%)	$[\alpha]^{20}_D$	c (%)	$[\alpha]^{20}_D$	c (%)	$[\alpha]^{20}_D$
L-Leu	0,594%	-8,4	0,591%	-0,617	0,337%	0,053
L-His	0,547%	-38,40	0,647%	-5,53	0,229%	-4,834
L-Pro	0,605%	-84,26	0,643%	-25,225	0,677%	-35,19

Se poate observa în cazul tuturor lichidelor ionice, o modificare a puterii rotatorii specifice față de aminoacizii de la care au provenit, în sensul diminuării acesteia. O modificare mai accentuată a valorii $[\alpha]^{20}_D$ se observă în cazul derivaților de la L-prolină.

Aceste observații confirmă formarea lichidelor ionice chirale considerate.

Spectrele IR

Spectrele IR ale lichidelor ionice chirale obținute de noi au fost comparate cu spectrele aminoacizilor și ale hidroxizilor cuaternari de amoniu.

Se poate observa o diferență semnificativă între alura spectrelor IR ale aminoacizilor și ale hidroxizilor cuaternari de amoniu și, de asemenea, se observă că în spectrele IR ale lichidelor ionice se regăsesc benzile caracteristice partenerilor de reacție. Această ultimă observație se constată cu ușurință în spectrele suprapuse ale aminoacizilor, hidroxizilor cuaternari de amoniu și ale CIL (fig. 26-31). De asemenea, pentru toate AATBA și AATMA se remarcă faptul că semnalul corespunzător $\nu_{C=O}$ -COOH poate fi identificat, se indică deprotonarea acestei grupări, și este prezentă banda corespunzătoare $\nu_{C=O}$ asimetric aparținând grupării carboxilat. De exemplu, în cazul LeuTMA și LeuTBA, se observă banda $\nu_{C=O}$ asimetric la 1570 cm^{-1} (fig. 26 și 29).

Lărgimea benzii din jurul valorii de $3200\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ nu permite atribuirea sigură a grupării -NH_2 , însă semnalele acestei grupări pot fi observate în această regiune (fig. 15-25).

A fost efectuată, de asemenea, o analiză de tip cluster pe baza valorilor spectrale ale celor șase lichide ionice, aminoacizi precursori și celor două baze precursore. Analiza s-a efectuat utilizând metoda Ward pe baza distanțelor Euclidiene și a fost reprezentată sub forma de dendogramă. Pe baza analizei statistice efectuate, se observă 4 clase spectrale majore, un grup al lichidelor ionice pe bază de tetrabutilamoniu, un grup al aminoacizilor, un grup al lichidelor ionice pe bază de tetrametilamoniu și un grup format din cele două baze. Se remarcă și o asemănare statistică mai mare între spectrele IR ale lichidelor ionice din grupul AATBA cu spectrele IR ale aminoacizilor, în timp ce spectrele lichidelor ionice din grupul AATMA prezintă o similitudine mai mare față de grupul bazelor (fig. 32).

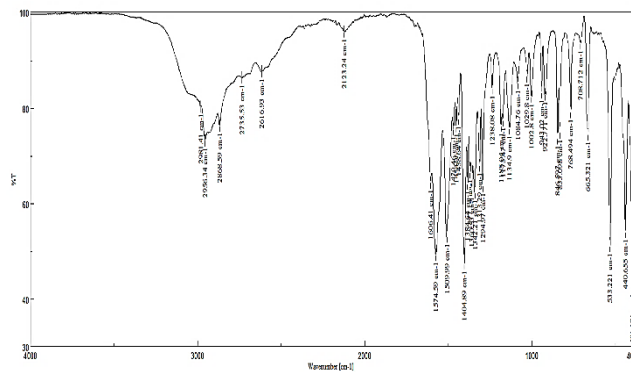


Figura 13 Spectrul IR al L-leucinei

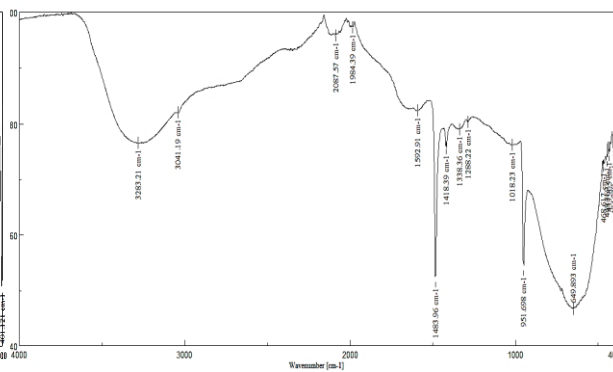


Figura 14 Spectrul IR al TMAOH

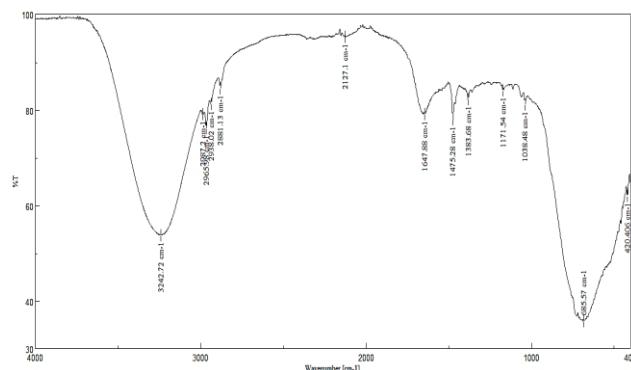


Figura 11 Spectrul IR al TBAOH

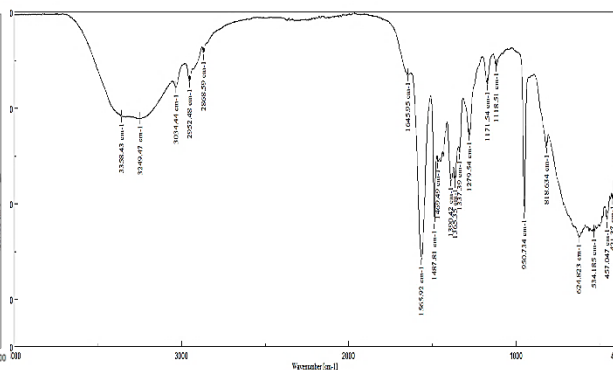


Figura 12 Spectrul IR al L-LeuTMA

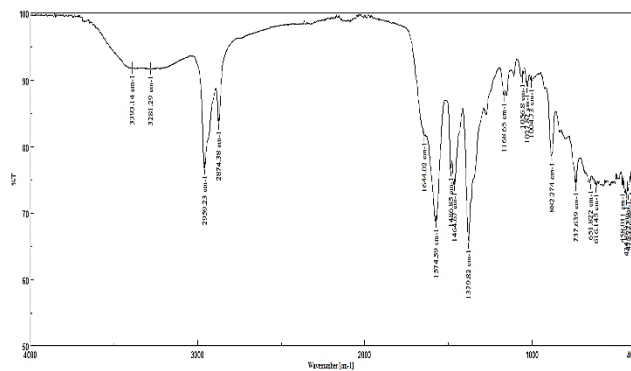


Figura 8 Spectrul IR al L-LeuTBA

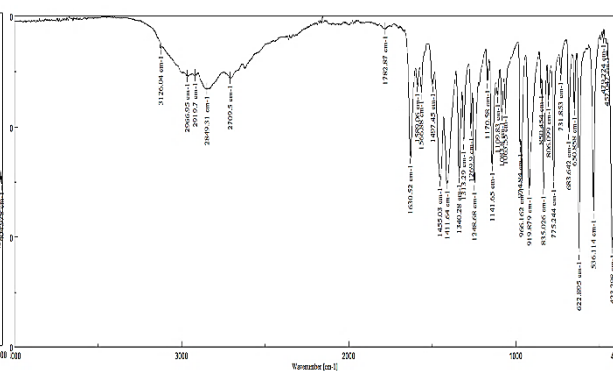


Figura 9 Spectrul IR al L-histidinei

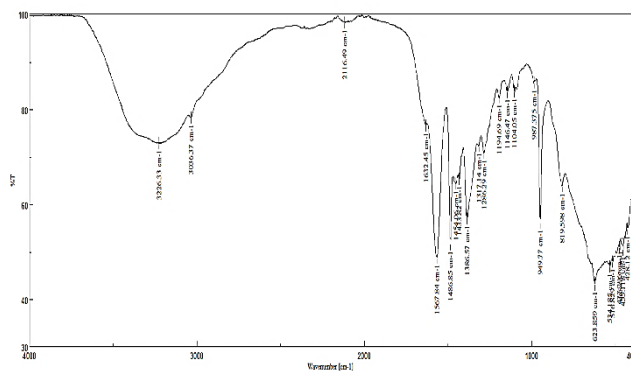


Figura 4 Spectrul IR al L-HisTMA

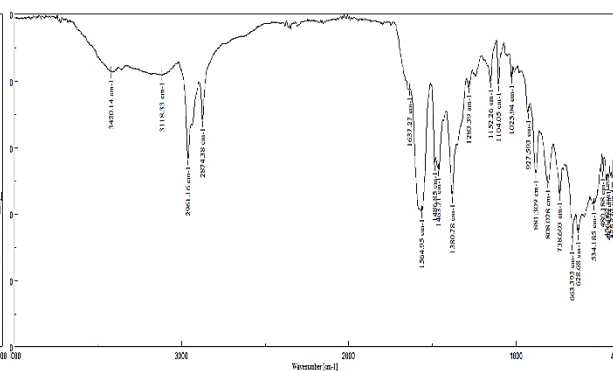


Figura 5 Spectrul IR al L-HisTBA

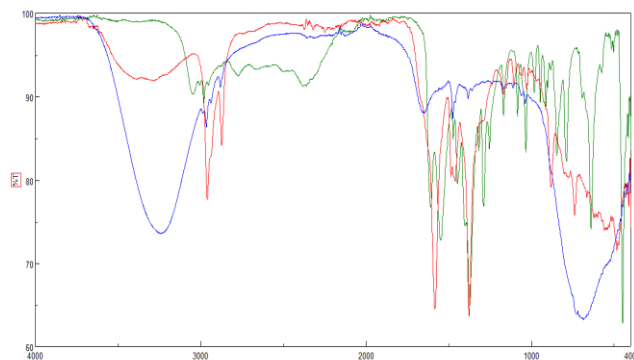


Figura 43 Spectre IR suprapuse ale ProTBA - roșu, TBAOH- albastru și Pro- verde

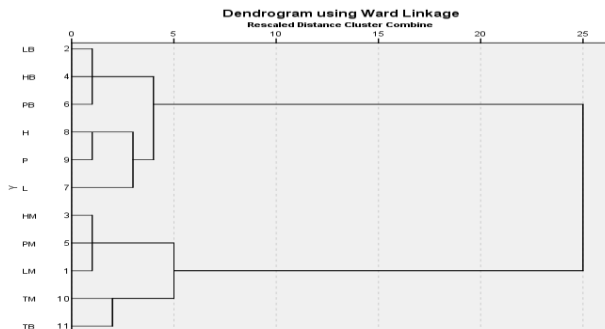


Figura 44 Analiză tip *cluster* a spectrelor IR pentru CIL și pentru precursori CIL

Analiza elementală

Pentru confirmarea structurii chimice a substanțelor sintetizate, pe lângă analizele spectrale menționate, este necesară efectuarea unei analize elementale cantitative, analiză ce exprimă procentual rapoartele cantitative ale atomilor compusului organic studiat.

Rezultatele obținute se găsesc în tabelul 9. Unele diferențele dintre valorile experimentale și cele teroretice se pot explica prin higroscopicitatea CIL.

Tabel 9 Analiza elementală a CIL

CIL	LeuTBA		HisTBA		ProTBA		LeuTMA		HisTMA		ProTMA	
% elem.	Teo- re- tic (%)	Ex- peri- mental (%)	Teo- re- tic (%)	Ex- peri- mental (%)	Teo- re- tic (%)	Ex- peri- mental (%)	Teo- re- tic (%)	Teo- re- tic (%)	Teo- re- tic (%)	Ex- peri- mental (%)	Teo- re- tic (%)	Ex- peri- mental (%)
C	70,93	59,21	66,64	58,9	70,76	59,46	58,77	42,38	52,99	36,89	57,40	38,68
H	12,89	20,89	11,10	18,07	12,35	26,92	11,75	21,4	8,76	16,61	10,63	22,33
N	7,52	5,85	14,13	11,51	7,86	7,27	13,71	9,26	24,54	14,95	14,88	9,56
O	8,59	14,05	8,07	11,52	8,98	6,35	15,67	26,96	14,02	31,55	17,00	29,43

5.2. Studiul enantioselectivității lichidelor ionice chirale asupra separărilor prin electroforeză capilară în mediu apos a unor amestecuri racemice medicamentoase

5.2.1. Cercetări preliminare

În literatura de specialitate se constată că puterea discriminatorie chirală a CIL, utilizați ca selectori unici, nu este satisfăcătoare [113,129], de aceea am avut în vedere posibilitatea utilizării lichidelor ionice chirale pe care le-am sintetizat în asociere cu diferite ciclodextrine (β -ciclodextrina, hidroxipropil β -ciclodextrina și derivatul metilat aleator al β -ciclodextrinei), în intenția de a stabili condițiile experimentale cele mai favorabile pentru enantiosepararea unor amestecuri racemice medicamentoase (ofloxacina, clorhidratul de ondansetron și clorhidratul de mianserină).

În acest scop, în cercetări preliminare, am urmărit să stabilim în ce măsură este influențată enantioselectivitatea ciclodextrinelor, pe de o parte, în prezența precursorilor lichidelor ionice chirale (aminoacizi, hidroxizi cuaternari de amoniu) și pe de altă parte, în prezența lichidelor ionice chirale sintetizate de noi.

Soluțiile preparate pentru determinările electroforetice

Soluții pentru determinările enantioselectivităților în electroforeză capilară de afinitate

Tabel 10 Formulele de preparare ale soluțiilor tampon citrat pH 3-5

pH	Citrat Na 0,1 M (mL)	HCl 0,1 M (mL)	Apă (mL)
3	20,2	29,8	ad 100 mL
4	28,0	22,0	ad 100 mL
5	48,0	2,0	ad 100 mL

Tabel 11 Concentrațiile molare ale selectorilor chirali, ciclodextrină-lichid ionic derivat de tetrabutilamoniu, ciclodextrină-lichid ionic derivat de tetrametilamoniu, ciclodextrină-precursor lichid ionic în tampon citrat

Conc. ciclodextrină	5 mM			10 mM			15 mM		
Conc.CIL/ precursor	5 mM	10 mM	15 mM	5 mM	10 mM	15 mM	5 mM	10 mM	15 mM

Soluții pentru determinările enantioselectivităților prin schimb chiral de liganzi (LECE)

Tabel 12 Formulele de preparare ale soluțiilor de electroliți utilizate în separările prin LECE

Concetrație aminoacid/ lichid ionic chiral	Raport molar aminoacid/lichid ionic chiral: sare Cu^{2+}	Volum acid acetic glacial (mL)	Volum alcool-modificator organic (mL)	Apă (mL)
30 mM	30 mM: 15 mM	0,13 mL	a mL	ad 10 mL
40 mM	40 mM: 20 mM	0,16 mL		ad 10 mL
50 mM	50 mM: 25 mM	0,2 mL		ad 10 mL
60 mM	60 mM: 30 mM	0,26 mL		ad 10 mL

Soluții pentru determinările enantioselectivităților în mediu neapos

Tabel 13 Concentrațiile molare ale selectorilor chirali, β CD-lichid ionic în tampon acid citric/ Tris

Conc. β CD	30 mM			60 mM		
Conc.CIL	30 mM	60 mM	90 mM	30 mM	60 mM	90 mM

Echipamentul utilizat pentru determinările electroforetice este un sistem de electroforeză capilară Agilent G1601 A cu detector DAD; achiziția și prelucrarea datelor s-a făcut cu ajutorul programului *ChemStation* ver. B.02.01.; s-a utilizat un tub capilar cu lungimea totală de 48,5 cm, lungimea efectivă de 40 cm și diametrul intern de 50 μm (Agilent, Germania).

5.2.1.1. Capacitatea de enantioseparare a β -ciclodextrinei asupra amestecului racemic al clorhidratului de ondansetron

Într-o primă etapă, s-a evidențiat, prin calcularea rezoluțiilor, capacitatea de separare chirală a β -ciclodextrinei, în tampon citrat la diferite valori de pH (3, 4 și 5) față de amestecul racemic al clorhidratului de ondansetron.

Procedeul de lucru

Au fost analizate soluții de amestec racemic, folosind soluție de electrolit de lucru care conține β CD (15 mM) în tampon citrat la pH 3, pH 4 și, respectiv, pH 5. Potențialul aplicat a fost de 20 kV; proba a fost introdusă în sistem hidrodinamic, folosind o presiune de 50 mbar x 1s. Temperatura de lucru a fost de 25 °C. Detecția pentru ondansetron s-a făcut la $\lambda=216$ nm.

Electroforegramele obținute sunt redată în fig. 33.

Rezoluțiile (R_s) au fost calculate după formula:

$$R_s = \frac{1,18 (t_B - t_A)}{(w_{\frac{1}{2}B} + w_{\frac{1}{2}A})}$$

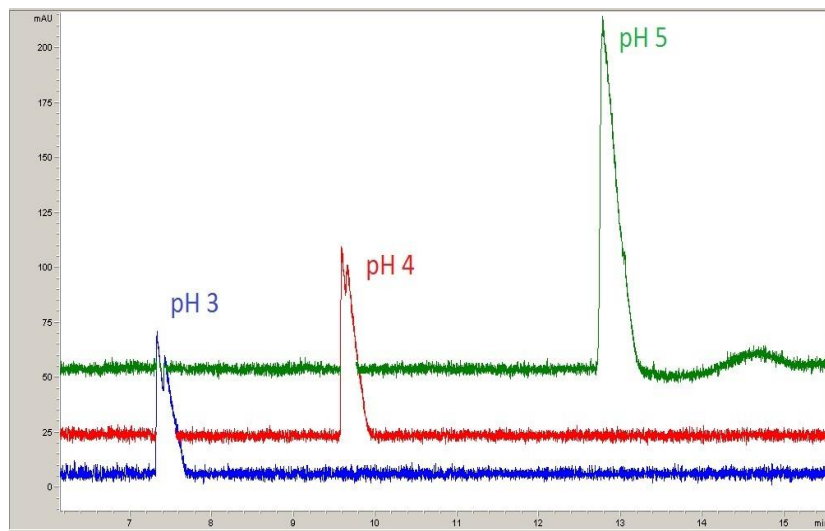


Figura 52 Electroforegrame reprezentând influența pH-ului asupra separărilor chirale a amestecului racemic al clorhidratului de ondansetron în prezența β CD 15 mM

în care t_A și t_B sunt timpii de migrare ai celor doi enantiomeri, iar $w_{1/2 A}$ și $w_{1/2 B}$ sunt lățimile picurilor la jumătatea înălțimii. Valorile timpilor de migrare și ale rezoluțiilor obținute la separarea enantiomerilor ondansetronului sunt redată în tabelul 14.

Tabel 14 Influența pH-ului asupra separării chirale a clorhidratului de ondansetron în amestec tampon citrat

pH	R _s	t _A (min)	t _B (min)	w _{1/2 A} (min)	w _{1/2 B} (min)
3	0,67	7,331	7,428	0,0572	0,1123
4	0,5335	6,587	6,656	0,0403	0,1118
5	0	6,774	-	0,184	-

Capacitatea de separare în sistem tampon citrat este influențată de pH, scăzând odată cu creșterea pH-ului. Rezoluția nu este însă satisfăcătoare, indiferent de pH, fiind maximă la pH 3 (R_s=0,67). Nu s-a lucrat la pH mai mare de 5 din cauza solubilității limitate a ondansetronului.

Înlocuind tamponul citrat cu tampon fosfat la pH 3 se constată că βCD nu poate separa amestecul racemic considerat.

Având în vedere observațiile făcute, determinările ulterioare s-au efectuat în tampon citrat, pH 3.

5.2.1.2. Influența precursorilor lichidelor ionice chirale asupra capacității de separare a βCD

S-a urmărit efectul concentrației precursorilor lichidelor ionice chirale hidroxizii cuaternari de amoniu și aminoacidul leucina, în amestec cu βCD, la separarea amestecului racemic al clorhidratului de ondansetron.

Tabel 15 Influența sistemului de selectori βCD-hidroxizi de tetraalchilamoniu (TAAOH) la separarea enantiomerilor ondansetronului la concentrații de 15 mM βCD

Procedeu de lucru

S-au preparat soluții care conțin o concentrație de βCD de 15 mM și hidroxizi cuaternari de amoniu, conform tabelului 11. După filtrarea și degazarea soluțiilor, s-au înregistrat electroforegramele. Concentrația amestecului racemic al ondansetronului a fost de 1 mg/mL. S-a lucrat la un potențial de 20 kV și o temperatură de lucru de 25°C. Rezultatele obținute sunt redate în tabelul 15. Se poate observa că, în timp ce TBAOH exercită un efect de creștere a rezoluțiilor la separarea enantiomerilor clorhidratului de ondansetron, TMAOH scade rezoluțiile.

15 mM βCD	TAAOH (mM)	R _s ondansetron
TBAOH	0 mM	0,6705
	5 mM	0,699
	10 mM	0,792
	15 mM	0,9037
TMAOH	0 mM	0,6705
	5 mM	0,3180
	10 mM	0,5792
	15 mM	0,5887

Menționăm că, urmărindu-se efectul amestecului β CD-leucină la separarea enantiomerilor clorhidratului de ondansetron, s-a constatat că prezența aminoacidului nu influențează efectul de discriminare chirală a β CD.

5.2.1.3. Capacitatea de enantioseparare a sistemului de selectori β -ciclodextrină-LeuTBA și β -ciclodextrină-LeuTMA asupra clorhidratului de ondansetron

S-au înregistrat electroforegramele și s-au calculat rezoluțiile la separarea amestecului racemic studiat, clorhidrat de ondansetron, în prezența sistemelor chirale β CD-LeuTBA, respectiv, β CD-LeuTMA, urmărindu-se influența concentrației celor două componente ale sistemului de selectori, β -ciclodextrina și lichidul ionic, a potențialului aplicat și ale temperaturii.

Procedeu de lucru

S-au preparat soluții de amestec β CD-LeuTBA, respectiv, β CD-LeuTMA, în tampon citrat pH 3. Concentrațiile acestora corespund tabelului 11. După filtrarea și degazarea soluțiilor s-au înregistrat electroforegramele. Concentrația amestecului racemic a fost de 1 mg/mL.

Influența potențialului aplicat și a temperaturii

S-a urmărit efectul potențialelor de 10, 15 și, respectiv, 20 kV asupra separării clorhidratului de ondansetron, pentru sistemul chiral binar β CD 15 mM și lichid ionic, LeuTBA, respectiv, LeuTMA, 5 mM (tabel 16).

Tabel 16 Efectul potențialului asupra separărilor enantiomerilor ondansetronului în prezența sistemului de selectori, β CD 15 mM și LeuTBA 5 mM și β CD 15 mM și LeuTMA 5 mM

U (kV)	Rs	
	LeuTBA 5 mM	LeuTMA 5 mM
10 kV	0,9841	0,2588
15 kV	0,9764	0,4352
20 kV	0,998	0,6529

Tabel 17 Efectul temperaturii asupra separărilor enantiomerilor ondansetronului în prezența sistemului de selectori, β CD 15 mM și LeuTBA 5 mM și β CD 15 mM și LeuTMA 5 mM

t (°C)	Rs	
	LeuTBA 5 mM	LeuTMA 5 mM
16 °C	0,8294	0,288
20 °C	0,9729	0,6470
25 °C	0,998	0,6529

Valorile rezoluțiilor, la diferite potențiale, pentru separarea enantiomerilor ondansetronului în prezența sistemelor de selectori β CD-LeuTBA și β CD-LeuTMA sunt prezentate în tabelul 16. Pe baza acestora s-a construit graficul din fig. 35. Pentru determinările ulterioare s-a ales

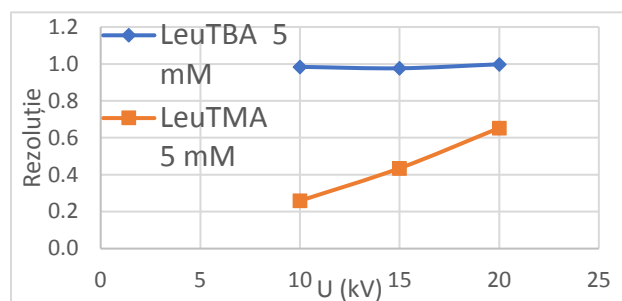


Figura 55 Influența potențialului aplicat asupra separărilor amestecului racemic al ondansetronului în sistem de selectori β CD-LeuTBA și β CD-LeuTMA

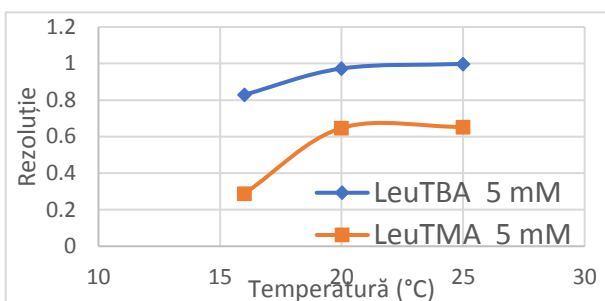


Figura 53 Influența temperaturii asupra separărilor amestecului racemic al ondansetronului în sistem de selectori β CD-LeuTBA, respectiv, β CD-LeuTMA, 15 mM : 5 mM. potențial 20 kV

potențialul de 20 kV.

S-a urmărit efectul temperaturii la 16°C, 20°C și, respectiv, 25 °C asupra separărilor enantiomerilor clorhidratului de ondansetron, la un potențial de 20 kV, pentru concentrații ale sistemelor chirale binare de 15 mM β CD și 5 mM LeuTBA, respectiv, 5 mM LeuTMA (tabel 17).

Se poate observa, că la potențialul de 20 kV, pentru rapoarte de concentrații β CD-LeuTBA, respectiv β CD-LeuTMA 15 mM : 5 mM, rezoluțiile maxime s-au obținut pentru o temperatură de 25 °C.

Influența concentrației β CD și a lichidului ionic chiral

Urmărindu-se în ce măsură lichidele ionice, în absența β CD, au efect de discriminare asupra enantiomerilor clorhidratului de ondansetron la o concentrație de LeuTBA, respectiv, LeuTMA de 10 mM, s-a observat că niciunul dintre acestea nu are efect de discriminare asupra amestecului racemic studiat. În fig. 37 este redată electroforegrama amestecului racemic de clorhidrat de ondansetron în prezența LeuTBA 10 mM, la pH 3.

Pentru a stabili efectul concentrațiilor celor două componente ale selectorilor chirali, β CD-LeuTBA și β CD-LeuTMA, asupra separării amestecului racemic clorhidrat de ondansetron, s-a lucrat la concentrații constante de ciclodextrină (5 mM, 10 mM, 15 mM) și s-au adăugat concentrații diferite, între 5 mM și 15 mM de lichid ionic chiral, LeuTBA, respectiv, LeuTMA,

conform tabelului 11. Electroliul de lucru a fost tamponul citrat la pH 3. S-a lucrat la un potențial de 20 kV și la temperatura de 25°C.

S-au înregistrat timpii de migrare, lățimea la bază a picurilor, și s-au calculat rezoluțiile. Rezultatele obținute se găsesc în tabelele 18 și 19 și în electroforegramele din fig. 38 și 39.

Din datele obținute, se poate observa eficiența diferită a sistemelor de selectori, β CD - LeuTBA și β CD-LeuTMA, la separarea amestecului racemic clorhidrat de ondansetron, și anume, se constată că selectorul β CD-LeuTBA prezintă o capacitate de discriminare mai accentuată decât β CD-LeuTMA (fig. 40 și 41).

Menționăm că nu s-a lucrat la concentrații de β CD mai mari de 15 mM, datorită solubilității reduse a acesteia în electroliul de lucru. De asemenea, o creștere a concentrației lichidului ionic chiral nu este favorabilă, deoarece determină creșterea vâscozității soluției și conduce la un efect Joule accentuat.

Din cercetările efectuate se poate observa faptul că β CD permite separarea parțială a enantiomerilor clorhidratului de ondansetron; o separare în proporție de 85% ($R_s=1,04$) se obține în prezența amestecului de selectori chirali β CD-LeuTBA în anumite condiții experimentale: tampon citrat pH 3, potențial aplicat 20 kV și temperatură 25 °C, pentru raportul de concentrații β CD-LeuTBA 15 mM: 15 mM.

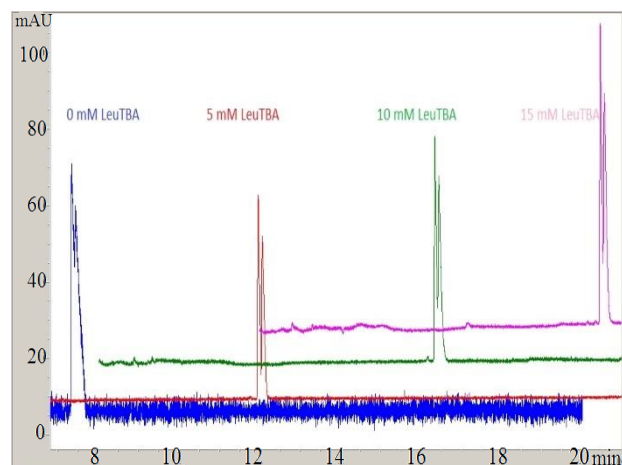


Figura 38 Influența concentrației LeuTBA asupra separărilor enantiomerilor clorhidratului de ondansetron (β CD 15 mM, pH 3, U=20 kV la 25°C)

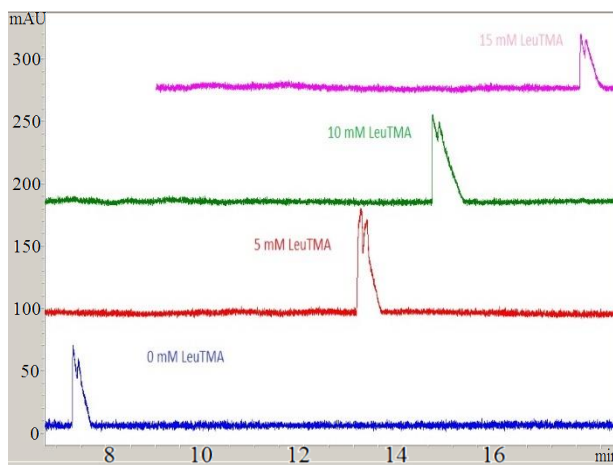


Figura 39 Influența concentrației LeuTMA asupra separărilor enantiomerilor clorhidratului de ondansetron (β CD 15 mM, pH 3, U=20 kV, 25°C)

Acești parametri experimentali au constituit baza pentru cercetările ulterioare efectuate asupra altor amestecuri racemice medicamentoase (mianserină, ofloxacină) cu

Tabel 18 Influența sistemului de selectori β CD-LeuTBA asupra separărilor enantiomerilor ondansetronului , la concentrații constante de β CD

β CD (mM)	LeuTBA (mM)	t_A (min)	t_B (min)	$w_{1/2 A}$ (min)	$w_{1/2 B}$ (min)	R_s
5 mM	0 mM	6,22	6,26	0,0345	0,0986	0,2828
	5 mM	6,79	-	0,0720	-	0
	10 mM	6,848	-	0,0560	-	0
	15 mM	6,84	-	0,0607	-	0
10 mM	0 mM	6,70	6,76	0,0382	0,0813	0,5907
	5 mM	6,89	6,935	0,0533	0,0383	0,5138
	10 mM	7,374	7,429	0,0322	0,0444	0,8447
	15 mM	7,31	7,37	0,0330	0,0492	0,8015
15 mM	0 mM	7,73	7,42	0,0643	0,1123	0,6736
	5 mM	7,95	8,06	0,0643	0,0657	0,998
	10 mM	8,335	8,434	0,0464	0,0688	1,011
	15 mM	8,43	8,53	0,0453	0,0676	1,0421

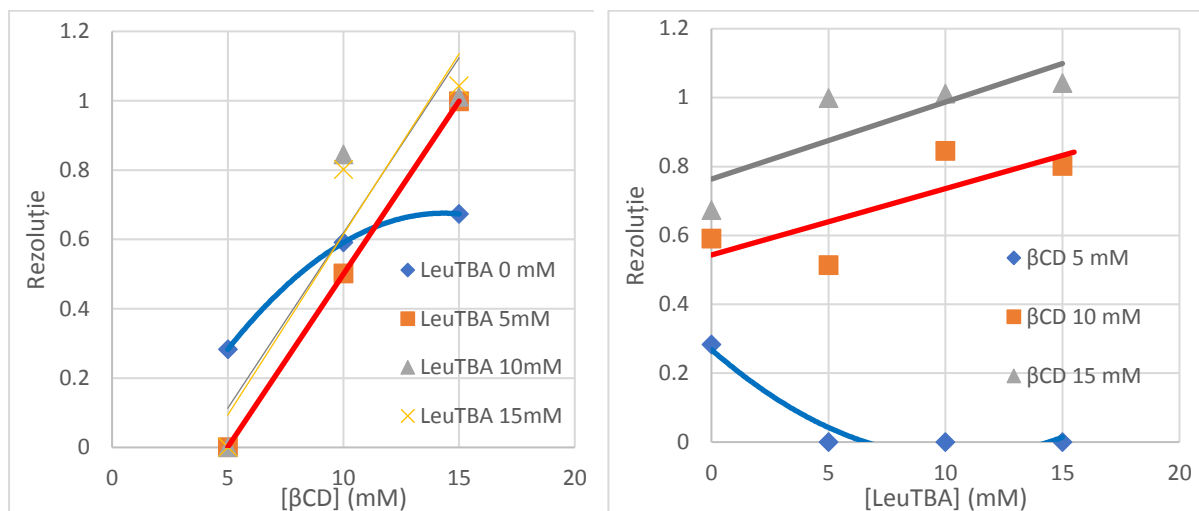
Tabel 19 Influența sistemului de selectori β CD-LeuTMA asupra separărilor enantiomerilor ondansetronului , la concentrații constante de β CD

β CD (mM)	LeuTMA (mM)	t_A (min)	t_B (min)	$w_{1/2 A}$ (min)	$w_{1/2 B}$ (min)	R_s
5 mM	0 mM	6,22	6,26	0,0345	0,0986	0,2828
	5 mM	7,07	7,16	0,1808	0,2346	0,25
	10 mM	6,85	6,87	0,025	0,1564	0,1686
	15 mM	6,86	6,90	0,0473	0,2858	0,1681
10 mM	0 mM	6,70	6,76	0,0382	0,0813	0,5907
	5 mM	7,16	7,24	0,094	0,109	0,493
	10 mM	7,24	7,33	0,0487	0,1635	0,4934
	15 mM	14,20	14,38	0,1129	0,2406	0,5791
15 mM	0 mM	7,73	7,42	0,0571	0,1123	0,6736
	5 mM	10,14	10,26	0,0787	0,1336	0,6539
	10 mM	8,59	8,71	0,107	0,1067	0,6602
	15 mM	8,57	8,68	0,0616	0,1331	0,6768

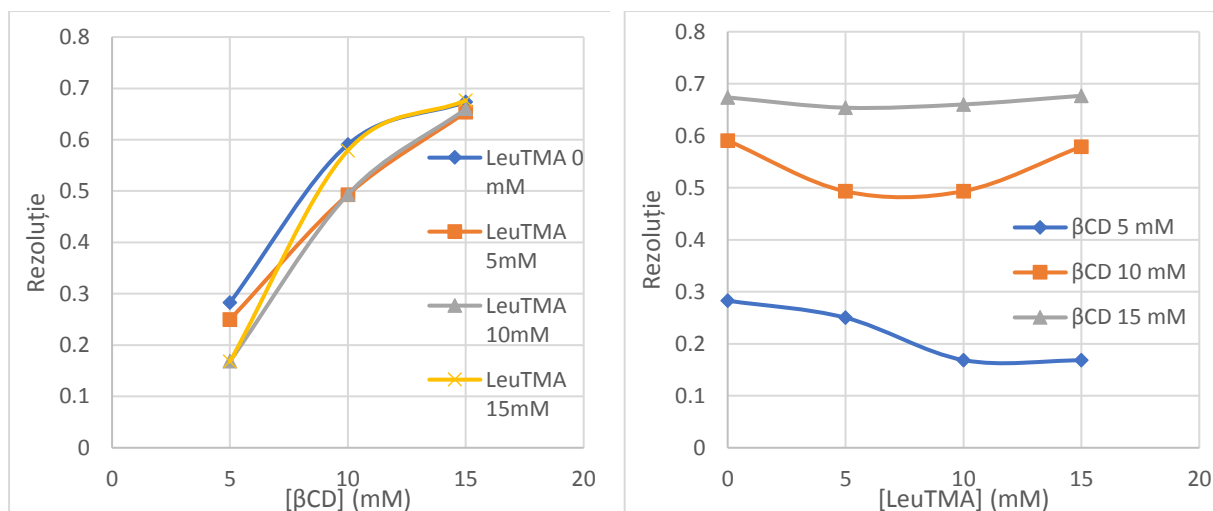
diferite tipuri de amestecuri de selectori chirali cu lichide ionice chirale provenite de la aminoacizi, derivate de tetraalchilamoniu-AATAA (HP β CD-AATAA, RAMEB-AATAA).

Adaosul lichidului ionic LeuTMA la β CD este mai puțin favorabil separărilor enantiomerilor clorhidratului de ondansetron. Rezoluția cea mai mare obținută pentru sistemul β CD-LeuTMA (0,6768) corespunde raportului de concentrații β CD 15 mM - LeuTMA 15 mM, cu foarte puțin mai mare decât rezoluția obținută în cazul folosirii β CD 15 mM singure (0,673).

Observațiile făcute ne-au permis să presupunem existența unui mecanism sinergic de separare chirală determinat de sistemul de selectori β CD-LeuTBA.



A **B**
Figura 40 Influența parametrilor experimentali: concentrație de βCD (A), concentrație de LeuTBA (B), asupra rezoluțiilor separărilor enantiomerilor clorhidratului de ondansetron



A **B**
Figura 41 Influența parametrilor experimentali: concentrație de βCD (A), concentrație de LeuTMA (B), asupra rezoluțiilor separărilor enantiomerilor clorhidratului de ondansetron

Deși literatura nu citează complecși de incluziune ai ondansetronului cu βCD, considerăm că atomul chiral al ondansetronului rămâne în afara cavității ciclodextrinei, și cei doi enantiomeri stabilesc interacțiuni diferite cu lichidul ionic.

5.2.2. Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori β CD-lichid ionic chiral derivat de tetrabutilamoniu, respectiv, β CD-lichid ionic chiral derivat de tetrametilamoniu asupra unor amestecuri racemice medicamentoase

Cercetările preliminare efectuate folosind ca selectori chirali β CD-LeuTBA și β CD-LeuTMA la separarea enantiomerilor clorhidratului de ondansetron au constituit baza pentru extinderea cercetărilor utilizând alți selectori chirali binari formați din β CD și lichide ionice chirale - săruri de tetrabutilamoniu sau tetrametilamoniu ale unor aminoacizi cum sunt leucina, histidina și prolina - la separarea enantiomerilor clorhidratului de ondansetron și clorhidratului de mianserină prin electroforeză capilară. Ca și în cercetările preliminare, s-au urmărit influența pH-ului soluției tampon citrat, folosit ca electrolit de lucru, efectul concentrațiilor β -ciclodextrinei și ale lichidelor ionice chirale, influențele potențialului și ale temperaturii. S-a urmărit de asemenea efectul precursorilor lichidelor ionice asupra separărilor chirale a enantiomerilor clorhidratului mianserinei.

Astfel, pentru separarea enantiomerilor clorhidratului de ondansetron s-au folosit sistemele chirale:

- β -ciclodextrină cu histidinat de tetrabutilamoniu (β CD-HisTBA),
- β -ciclodextrină cu histidinat de tetrametilamoniu (β CD-HisTMA),
- β -ciclodextrină cu prolinat de tetrabutilamoniu (β CD-ProTBA),
- β -ciclodextrină cu prolinat de tetrametilamoniu (β CD-ProTMA),

iar pentru separarea enantiomerilor clorhidratului de mianserină am utilizat sistemele chirale:

- β -ciclodextrină cu leucinat de tetrabutilamoniu (β CD-LeuTBA),
- β -ciclodextrină cu leucinat de tetrametilamoniu (β CD-LeuTMA),
- β -ciclodextrină cu histidinat de tetrabutilamoniu (β CD-HisTBA),
- β -ciclodextrină cu histidinat de tetrametilamoniu (β CD-HisTMA),
- β -ciclodextrină cu prolinat de tetrabutilamoniu (β CD-ProTBA),
- β -ciclodextrină cu prolinat de tetrametilamoniu (β CD-ProTMA).

5.2.2.1. Capacitatea de enantioseparare a β CD asupra amestecului racemic al clorhidratului mianserinei

S-a urmărit capacitatea de separare chirală a β -ciclodextrinei ca selector chiral unic, în tampon citrat la pH 3-5.

Procedeul de lucru

S-a lucrat după procedeul de lucru prezentat la capitolul 5.2.1.1. Detecția s-a făcut la lungimile de undă $\lambda=279$ nm și $\lambda=216$ nm.

Electroforegramele din fig. 42 evidențiază separarea chirală a enantiomerilor mianserinei în prezența β CD 15 mM. Timpii de migare înregistrați și rezoluțiile calculate sunt prezentate în tabelul 20.

Tabel 20 Influența pH-ului asupra separării chirale a clorhidratului de mianserină

pH	R_s	t_A (min)	t_B (min)	$w_{1/2 A}$ (min)	$w_{1/2 B}$ (min)
3	2,8405	9,574	10,376	0,1291	0,203
4	2,7294	7,353	8,512	0,232	0,2667
5	2,0764	6,089	6,393	0,0786	0,0933

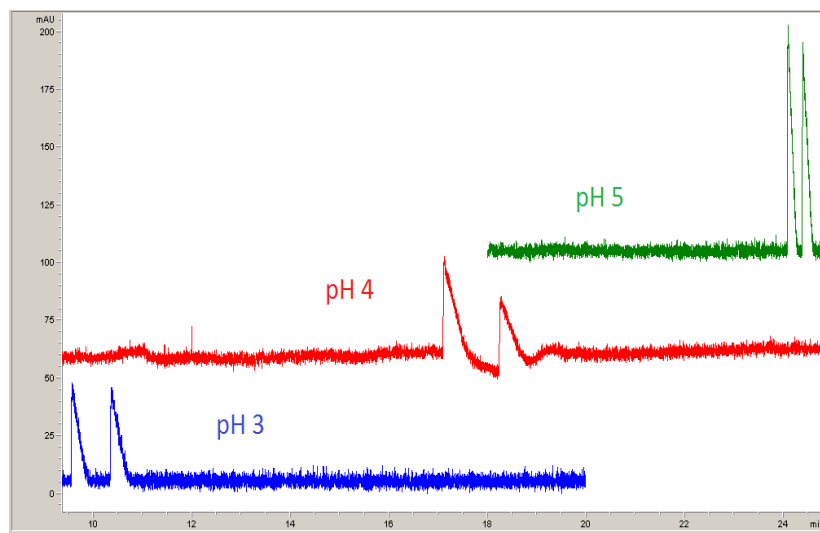


Figura 42 Electroforegramele reprezentând influența pH-ului asupra separărilor chirale ale amestecului racemic al clorhidratului de mianserină în prezența β CD 15 mM

Din electroforegramele din fig. 42, tabelul 20 și graficul 43, se constată că β CD singură permite o separare corespunzătoare a enantiomerilor mianserinei ($R_s > 2,00$). Capacitatea de discriminare a β CD scade la creșterea pH-ului electrolitului de lucru. Rezoluția cea mai mare se obține la pH 3 (2,8). Pentru celelalte determinări a fost ales ca electrolit de lucru tamponul citrat pH 3.

5.2.2.3. Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori β -ciclodextrină-LeuTBA, respectiv, β -ciclodextrină-LeuTMA asupra amestecului racemic al clorhidratului mianserinei

S-au înregistrat electroforegramele și s-au calculat rezoluțiile obținute la separarea amestecului racemic al clorhidratului de mianserină în prezența sistemelor binare: β -ciclodextrină-leucinat de tetrabutilamoniu (β CD-LeuTBA) și β -ciclodextrină-leucinat de tetrametilamoniu (β CD-LeuTMA).

Procedeul de lucru

Prepararea soluțiilor care conțin sistemele de selectori β CD-LeuTBA și β CD-LeuTMA se face după un procedeu asemănător cu cel enunțat în capitolul 5.2.1., iar procedeul de lucru este același cu cel prezentat în capitolul 5.2.1.3.

Influența concentrației β CD și a lichidului ionic chiral

Ca și în cazul clorhidratului de ondansetron, lichidele ionice LeuTBA, respectiv, LeuTMA folosite ca selectori unici (concentrație 10 mM), nu permit separarea enantiomerilor clorhidratului de mianserină. Rezultatele obținute se găsesc în tabelele 22 și 23.

Deși β CD permite o separare bună a enantiomerilor clorhidratului de mianserină, adaosul selectorului LeuTBA are ca rezultat o creștere evidentă a rezoluțiilor, pentru raportul de concentrații β CD-LeuTBA de 10 mM : 15 mM obținându-se o rezoluție de 5,29 și, respectiv 5,57 pentru raportul 5 mM β CD : 15 mM LeuTBA.

Efectul selectorului chiral binar β CD-LeuTMA este mai puțin favorabil separărilor, în general, adaosul LeuTMA la diferite concentrații de ciclodextrină determinând rezoluții inferioare celor obținute în prezența β CD singure.

Influența potențialului aplicat și a temperaturii

S-a variat potențialul aplicat între 10-20 kV la concentrații ale sistemelor chirale de 5 mM β CD : 15 mM LeuTBA și 10 mM β CD : 15 mM LeuTBA, respectiv, 10 mM β CD : 15 mM

Tabel 22 Influența sistemului de selectori β CD-LeuTBA asupra separărilor enantiomerilor clorhidratului de mianserină, la concentrații constante de β CD

β CD (mM)	LeuTBA (mM)	t_A (min)	t_B (min)	$w_{1/2 A}$ (min)	$w_{1/2 B}$ (min)	R_s
5 mM	0 mM	7,06	7,61	0,0823	0,0992	3,578
	5 mM	7,56	8,15	0,0622	0,0748	5,0923
	10 mM	8,11	8,80	0,0662	0,095	4,992
	15 mM	7,879	8,513	0,0604	0,0735	5,5705
10 mM	0 mM	8,35	9,08	0,1122	0,138	3,4278
	5 mM	8,46	9,21	0,0775	0,0869	5,3314
	10 mM	8,88	9,81	0,1067	0,1206	4,8446
	15 mM	9,36	10,22	0,0957	0,0961	5,29
15 mM	0 mM	9,57	10,37	0,1291	0,203	2,8411
	5 mM	9,92	10,78	0,1445	0,1617	3,31
	10 mM	10,47	11,43	0,1563	0,1493	3,6842
	15 mM	10,40	11,35	0,0914	0,1028	4,0358

Tabel 23 Influența sistemului de selectori β CD-LeuTMA asupra separărilor enantiomerilor clorhidratului de mianserină, la concentrații constante de β CD

β CD (mM)	LeuTMA (mM)	t_A (min)	t_B (min)	$w_{1/2 A}$ (min)	$w_{1/2 B}$ (min)	R_s
5 mM	0 mM	7,06	7,61	0,0823	0,0992	3,578
	5 mM	9,19	9,78	0,1597	0,1770	2,0677
	10 mM	8,86	9,80	0,1774	0,2167	2,7971
	15 mM	8,21	8,91	0,1513	0,2035	2,3145
10 mM	0 mM	8,35	9,08	0,1122	0,138	3,4278
	5 mM	8,88	9,55	0,1583	0,1765	2,3825
	10 mM	8,73	9,71	0,2105	0,2369	2,369
	15 mM	9,13	10,05	0,1805	0,2069	2,7696
15 mM	0 mM	9,57	10,37	0,1291	0,203	2,8411
	5 mM	11,70	12,95	0,2693	0,3069	2,56
	10 mM	10,57	11,70	0,3169	0,3334	2,05
	15 mM	11,14	12,23	0,2595	0,2979	2,3069

LeuTMA și s-a constatat un efect nesemnificativ al acestuia asupra separărilor clorhidratului de mianserină.

Efectul variației temperaturii (16-25°C) s-a studiat pentru aceleași concentrații ale sistemelor binare de selectori cu cele pentru care s-a urmărit influența potențialului și s-a observat că temperatura nu influențează separările.

5.2.2.4. Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori β -ciclodextrină-HisTBA și β -ciclodextrină-HisTMA asupra amestecurilor racemice ale clorhidratului ondansetronului și clorhidratului mianserinei

Efectul adaosului lichidelor ionice HisTBA, respectiv, HisTMA la β CD asupra enantioseparării celor trei amestecuri racemice studiate este inferior efectului adaosului lichidelor ionice LeuTBA, respectiv, LeuTMA la β CD.

5.2.2.5. Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori β -ciclodextrină-ProTBA și β -ciclodextrină-ProTMA asupra amestecurilor racemice ale clorhidratului ondansetronului și clorhidratului mianserinei

Efectul adaosului lichidelor ionice ProTBA, respectiv, ProTMA la β CD asupra enantioseparării celor trei amestecuri racemice studiate este inferior efectului adaosului lichidelor ionice LeuTBA, respectiv, LeuTMA la β CD.

5.2.3. Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori hidroxipropil- β -ciclodextrină-lichid ionic chiral derivat de tetraalchilamoniu asupra unor amestecuri racemice medicamentoase

În continuarea cercetărilor întreprinse ne-am propus studiul capacității de enantiodiscriminare a sistemelor binare HP β CD-lichide ionice chirale provenite de la aminoacizi la separarea amestecurilor racemice ale ofloxacinei, ondansetronului și mianserinei.

S-au analizat: influența pH-ului, concentrația ciclodextrinei și a lichidelor ionice chirale, a potențialului aplicat și a temperaturii. Pentru separarea enantiomerilor celor trei amestecuri racemice medicamentoase s-au folosit următoarele sisteme chirale:

- hidroxipropil- β -ciclodextrină cu leucinat de tetrabutilamoniu (HP β CD-LeuTBA),
- hidroxipropil- β -ciclodextrină cu leucinat de tetrametilamoniu (HP β CD-LeuTMA),
- hidroxipropil- β -ciclodextrină cu histidinat de tetrabutilamoniu (HP β CD-HisTBA),
- hidroxipropil- β -ciclodextrină cu histidinat de tetrametilamoniu (HP β CD-HisTMA),
- hidroxipropil- β -ciclodextrină cu prolinat de tetrabutilamoniu (HP β CD-ProTBA),
- hidroxipropil- β -ciclodextrină cu prolinat de tetrametilamoniu (HP β CD-ProTMA).

5.2.3.1. Capacitatea de enantioseparare a hidroxipropil- β -ciclodextrinei asupra amestecurilor racemice ale ofloxacinei, clorhidratului ondansetronului și clorhidratului mianserinei

S-a urmărit în ce măsură hidroxipropil- β -ciclodextrina poate funcționa ca selector chiral asupra enantiomerilor ofloxacinei, ondansetronului și mianserinei și influența pH-ului asupra separărilor. S-a lucrat în amestec tampon citrat la pH 3,4 și 5.

Procedeul de lucru

Procedeul de lucru este identic cu cel prezentat în capitolul 5.2.1.1., în locul β -ciclodextrinei fiind folosită o soluție de hidroxipropil- β -ciclodextrină 15 mM. Detecția s-a efectuat la $\lambda=226$ nm pentru ofloxacină, $\lambda=216$ nm pentru ondansetron, iar pentru mianserină s-au înregistrat absorbantele la $\lambda=279$ nm și $\lambda=216$ nm.

Separările sunt influențate de pH în cazul tuturor amestecurilor racemice, rezoluțiile fiind cu atât mai mari cu cât pH-ul este mai mic, influența pH-ului este mai accentuată în cazul mianserinei, pentru care scăderea pH-ului de la 5 la 3 produce o creștere a rezoluției de la 2 la 4,98 pentru toate cele trei amestecuri rezoluțiile cele mai mari au fost la pH 3 ($R_s=0,88$ pentru ofloxacină, $R_s=0,94$ pentru ondansetron și $R_s=4,98$ pentru mianserină) (tabele 34-36) .

Determinările ulterioare au fost efectuate în tampon citrat la pH 3.

Tabel 34 Influența pH-ului asupra separării chirale a ofloxacinei

pH	R_s	t_A (min)	t_B (min)	$w_{1/2 A}$ (min)	$w_{1/2 B}$ (min)
3	0,8848	6,826	7,012	0,0941	0,1532
4	0,5981	6,512	6,608	0,0629	0,1254
5	0,4894	6,149	6,205	0,0366	0,098

Tabel 35 Influența pH-ului asupra separării chirale a clorhidratului de ondansetron

pH	R_s	t_A (min)	t_B (min)	$w_{1/2 A}$ (min)	$w_{1/2 B}$ (min)
3	0,9403	7,683	7,834	0,0784	0,151
4	0,4400	7,196	7,283	0,0552	0,1774
5	0,4098	6,046	6,097	0,0325	0,1139

Tabel 36 Influența pH-ului asupra separării chirale a clorhidratului de mianserină

pH	R_s	t_A (min)	t_B (min)	w_{1/2 A} (min)	w_{1/2 B} (min)
3	4,988	8,456	9,08	0,0659	0,0731
4	2,2822	8,059	8,647	0,1415	0,1616
5	2,0045	7,001	7,367	0,1012	0,1136

5.2.3.2. Influența precursorilor lichidelor ionice chirale asupra capacității de separare a HPβCD

S-a urmărit, pe de o parte, efectul amestecului de HPβCD cu hidroxizii cuaternari de amoniu - hidroxid de tetrabutilamoniu și hidroxid de tetrametilamoniu – și, pe de altă parte, a amestecului de HPβCD cu aminoacizii leucină, histidină, prolină asupra separării amestecurilor racemice ale ofloxacinei, clorhidratului de ondansetron și clorhidratului de mianserină.

Procedeu de lucru

S-a lucrat după un procedeu similar cu cel prezentat în capitolul 5.2.1.2., înlocuindu-se βCD cu HPβCD. Determinările electroforetice au condus la rezultatele din tabelul 37.

15 mM HPβCD	TAAOH (mM)	R_s ofloxacin	R_s ondansetron	R_s mianserină
TBAOH	0 mM	0,8848	0,7743	5,2814
	5 mM	1,0238	0,8715	5,2932
	10 mM	1,1743	1,0414	4,8645
	15 mM	1,1061	1,0198	5,25
TMAOH	0 mM	0,8848	0,7743	5,2814
	5 mM	0,7442	0,7608	5,2639
	10 mM	0,8431	0,7688	4,6177
	15 mM	0,8848	0,8592	4,8642

Tabel 37 Influența sistemului de selectori HPβCD-TAAOH la separarea enantiomerilor ofloxacinei, ondansetronului și mianserinei la concentrații de 15 mM HPβCD

Se poate observa că sistemul binar HPβCD-TBAOH nu influențează semnificativ rezoluțiile la separarea enantiomerilor mianserinei, însă, determină o ușoară ameliorare a separărilor pentru amestecurile racemice ale ondansetronului și ale ofloxacinei. TMAOH influențează nesemnificativ capacitatea de separare a HPβCD. Aminoacizii precursori ai lichidelor ionice leucină, histidină, prolină, în amestec cu HPβCD nu influențează separările enantiomerilor celor trei amestecuri racemice.

5.2.3.3. Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori HP β CD-LeuTBA și HP β CD-LeuTMA asupra amestecurilor racemice ale ofloxacinei, clorhidratului ondansetronului și, respectiv, clorhidratului mianserinei

S-a urmărit să se stabilească efectul de enantiodiscriminare a sistemelor de selectori formate din HP β CD și lichidele ionice provenite de la leucină și hidroxid de tetrabutilamoniu și, respectiv, hidroxid de tetrametilamoniu.

Procedeul de lucru

Prepararea soluțiilor care conțin sistemele de selectori HP β CD-LeuTBA și HP β CD-LeuTMA se face după procedeul de la capitolul 5.2.1.3., utilizându-se HP β CD în locul β CD. S-a lucrat la un potențial de 20 kV și la o temperatură de 25°C.

Influența concentrației HP β CD și a lichidului ionic chiral

Menționăm că cele două sisteme LeuTBA (10 mM) și LeuTMA (10 mM) nu permit separarea enantiomerilor niciuna din cele trei amestecuri racemice studiate.

Pentru a stabili capacitatea de discriminare chirală a sistemelor HP β CD-LeuTBA și HP β CD-LeuTMA, s-au preparat soluții de amestec ciclodextrină-lichid ionic conform tabelului 11 .

Electroforegramele obținute la separarea enantiomerilor ofloxacinei și ondansetronului în prezența sistemelor binare de selectori HP β CD-LeuTBA, respectiv, HP β CD-LeuTMA sunt prezentate în fig. 62, 63, 66, 67 iar tabelele 38-43 înscriu rezoluțiile calculate pe baza datelor experimentale la determinarea celor trei amestecuri racemice.

Adăosul lichidelor ionice, LeuTBA, respectiv, LeuTMA determină o îmbunătățire a separării pentru aproape toate rapoartele de concentrație în cazul enantiomerilor ofloxacinei.

Cele mai bune separări s-au obținut pentru rapoartele molare HP β CD 15 mM: LeuTBA 15 mM și HP β CD 15 mM: LeuTBA 10 mM. Pentru sistemul de selectori HP β CD-LeuTMA s-a evidențiat enantioselectivitatea maximă pentru raportul HP β CD 15 mM : LeuTMA 15 mM.

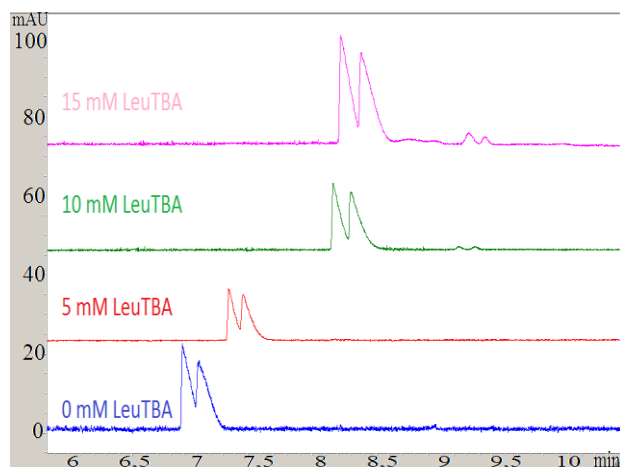


Figura 62 Influența concentrației de LeuTBA asupra separărilor enantiomerilor ofloxacinei (condiții experimentale : 15 mM HP β CD, 20 kV, 25 °C)

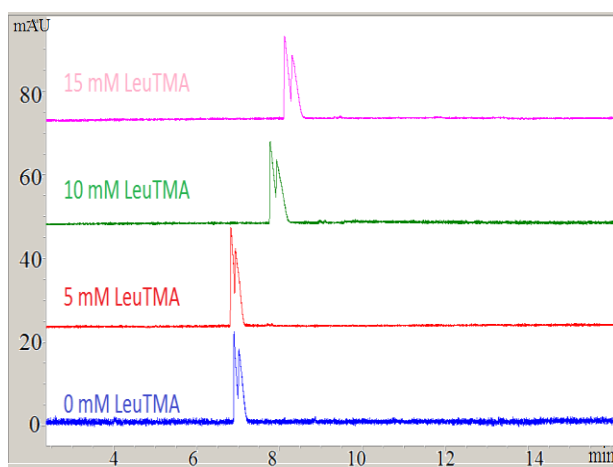


Figura 63 Influența concentrației de LeuTMA asupra separărilor enantiomerilor ofloxacinei (condiții experimentale : 15 mM HP β CD, 20 kV, 25 °C)

Tabel 38 Influența sistemului de selectori HP β CD-LeuTBA asupra separărilor enantiomerilor ofloxacinei , la concentrații constante de HP β CD

HP β CD (mM)	LeuTBA (mM)	t _A (min)	t _B (min)	w _{1/2 A} (min)	w _{1/2 B} (min)	R _s
5 mM	0 mM	5,813	5,867	0,0366	0,1506	0,3394
	5 mM	6,714	6,738	0,0219	0,1002	0,2312
	10 mM	7,376	7,427	0,0382	0,0907	0,4655
	15 mM	7,23	7,276	0,0345	0,0844	0,4551
10 mM	0 mM	6,424	6,548	0,069	0,1512	0,6625
	5 mM	7,477	7,569	0,05	0,0849	0,8023
	10 mM	7,902	7,999	0,0514	0,0825	0,8522
	15 mM	7,754	7,859	0,0534	0,0873	0,8779
15 mM	0 mM	6,826	7,012	0,0941	0,1532	0,8848
	5 mM	7,248	7,359	0,0496	0,0706	1,086
	10 mM	8,06	8,198	0,0575	0,0801	1,1799
	15 mM	8,119	8,276	0,0704	0,0883	1,1638

Pentru amestecul racemic al ondansetronului la separările cu sistemul de selectori chirali HP β CD-LeuTBA se poate observa că o dată cu creșterea concentrației de HP β CD la 10 mM și, respectiv 15 mM se determină o separare mai bună pentru concentrațiile cele mai mari de lichid ionic (raport echimolar 15 mM HP β CD: 15 mM LeuTBA). Derivatul de tetrametilamoniu al leucinei în sistem binar cu HP β CD se comportă asemănător, dar prezența lichidului ionic LeuTMA determină o eficiență mai scăzută a separărilor (rezoluții mai mici sub 1,00).

Tabel 39 Influența sistemului de selectori HPβCD-LeuTMA asupra separărilor enantiomerilor ofloxacinei , la concentrații constante de HPβCD

HPβCD (mM)	LeuTMA (mM)	t _A (min)	t _B (min)	w _{1/2} A (min)	w _{1/2} B (min)	Rs
5 mM	0 mM	5,813	5,867	0,0366	0,1506	0,3394
	5 mM	7,01	7,055	0,031	0,1069	0,3839
	10 mM	7,389	7,441	0,0338	0,1227	0,3909
	15 mM	7,595	7,65	0,0349	0,1132	0,4369
10 mM	0 mM	6,424	6,548	0,069	0,1512	0,6625
	5 mM	6,958	7,032	0,0462	0,1015	0,5894
	10 mM	6,958	7,032	0,0462	0,1015	0,5894
	15 mM	7,236	7,33	0,0579	0,1053	0,6776
15 mM	0 mM	6,826	7,012	0,0941	0,1532	0,8848
	5 mM	6,811	6,929	0,0637	0,0922	0,8904
	10 mM	7,763	7,917	0,0751	0,1192	0,9324
	15 mM	8,113	8,284	0,0788	0,1123	1,0527

Amestecul racemic al mianserinei este separat la bază de către HPβCD. Lichidul ionic LeuTBA crește rezoluțiile la concentrații mici de HPβCD (5 mM și 10 mM); pentru aceste concentrații de HPβCD lichidul ionic îmbunătățește separările. Pentru concentrația 15 mM HPβCD adaosul lichidului ionic nu este favorabil separărilor enantiomerilor mianserinei. Derivatul de tetrametilamoniu în sistem binar cu HPβCD conduce la rezoluții mai mici ale separărilor.

Influența potențialului aplicat

Pentru separarea electroforetică a enantiomerilor celor trei amestecuri racemice s-a variat potențialul între 20 și 10 kV (tabelul 44).

La separarea enantiomerilor mianserinei rezoluțiile nu s-au modificat semnificativ la scăderea potențialului aplicat pentru rapoartele de concentrații 10 mM HPβCD: 15 mM LeuTBA și 5 mM HPβCD: 5 mM LeuTMA.

O scădere a potențialului aplicat până la 10 kV, favorizează creșterea rezoluțiilor separărilor amestecurilor racemice ale ofloxacinei și ale mianserinei.

Rezoluția este crescută la un potențial de 15 kV pentru separările amestecului racemic al ofloxacinei pentru sistemul 15 HPβCD mM : 10 mM LeuTBA, respectiv, pentru amestecul racemic al mianserinei (15 mM HPβCD : 5 mM LeuTMA).

Influența temperaturii

Am studiat influența temperaturii de lucru asupra rezoluțiilor separărilor la potențialul 15 kV și pentru concentrațiile selectorilor de 15 mM HP β CD cu 5 mM CIL, 10 mM CIL, respectiv

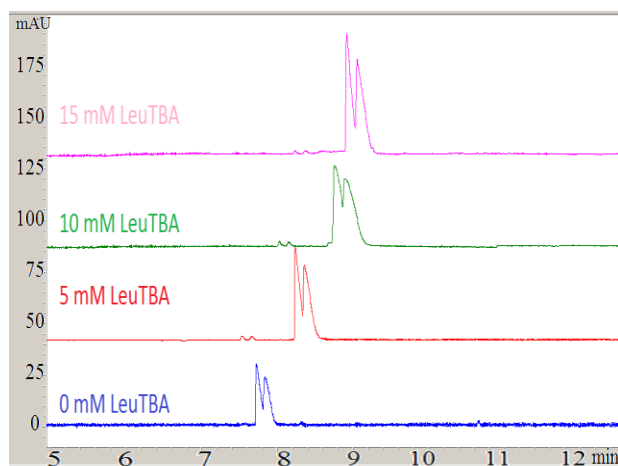


Figura 66 Influența concentrației de LeuTBA asupra separărilor enantiomerilor ondansetronului (15 mM HP β CD, 20 kV, 25 °C)

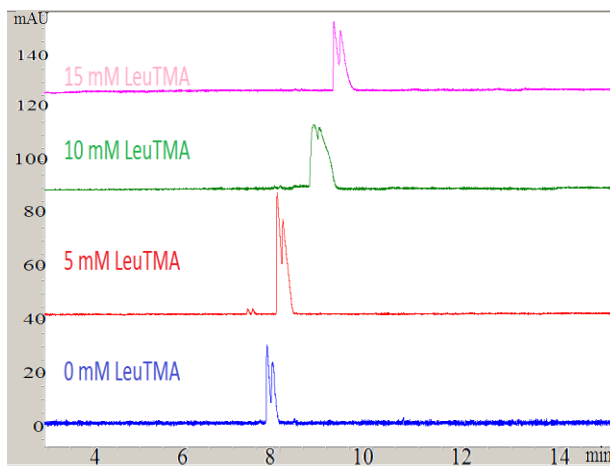


Figura 67 Influența concentrației de LeuTMA asupra separărilor enantiomerilor ondansetronului (15 mM HP β CD, 20 kV, 25 °C)

Tabel 40 Influența sistemului de selectori HP β CD-LeuTBA asupra separărilor enantiomerilor ondansetronului, la concentrații constante de HP β CD

HP β CD (mM)	LeuTBA (mM)	t _A (min)	t _B (min)	w _{1/2 A} (min)	w _{1/2 B} (min)	R _s
5 mM	0 mM	6,666	6,744	0,0541	0,1296	0,4995
	5 mM	7,308	7,351	0,037	0,0507	0,5768
	10 mM	7,388	7,455	0,0385	0,0662	0,7528
	15 mM	7,076	7,131	0,0322	0,0602	0,7002
10 mM	0 mM	6,942	7,086	0,0793	0,1584	0,7127
	5 mM	7,921	8,015	0,0459	0,0727	0,9324
	10 mM	8,286	8,386	0,0492	0,0859	0,8707
	15 mM	8,173	8,279	0,0479	0,0726	1,0349
15 mM	0 mM	7,683	7,834	0,0784	0,151	0,7744
	5 mM	8,234	8,354	0,0793	0,0823	0,876
	10 mM	8,756	8,888	0,0673	0,0695	1,138
	15 mM	8,91	9,047	0,0569	0,0581	1,405

15 mM lichid ionic chiral. Se observă că, în general, temperatura nu influențează semnificativ separările enantiomerilor ofloxacinei, ondansetronului și mianserinei.

Din analiza datelor experimentale prezentate se poate observa că AATBA conduce la o enantioselectivitate mai mare la separarea amestecurilor racemice studiate, comparativ cu derivatul de tetrametilamoniu; uneori, scăderea temperaturii și a potențialului aplicat poate crește ne semnificativ capacitatea de enantiodiscriminare a sistemelor binare.

Tabel 41 Influența sistemului de selectori HP β CD-LeuTMA asupra separărilor enantiomerilor ondansetronului , la concentrații constante de HP β CD

HP β CD (mM)	LeuTMA (mM)	t _A (min)	t _B (min)	w _{1/2} A (min)	w _{1/2} B (min)	Rs
5 mM	0 mM	6,666	6,744	0,0541	0,1296	0,4995
	5 mM	7,164	7,231	0,0422	0,0968	0,5671
	10 mM	8,207	8,29	0,047	0,0991	0,6684
	15 mM	7,1	7,163	0,0354	0,0907	0,5878
10 mM	0 mM	6,942	7,086	0,0793	0,1584	0,7127
	5 mM	7,437	7,528	0,0496	0,0961	0,7348
	10 mM	7,64	7,724	0,0842	0,0915	0,564
	15 mM	7,992	8,097	0,0755	0,0797	0,798
15 mM	0 mM	7,683	7,834	0,0784	0,151	0,7744
	5 mM	7,944	8,058	0,0589	0,0962	0,8276
	10 mM	8,726	8,836	0,104	0,1772	0,4602
	15 mM	9,166	9,298	0,0649	0,1021	0,8871

Tabel 44 Efectul potențialului asupra separărilor enantiomerilor mianserinei în prezența sistemelor de selectori binari, HP β CD 15 mM și LeuTBA, respectiv, LeuTMA

U (kV)	Rs ofloxacină		Rs ondansetron		Rs mianserină	
	10 mM LeuTBA	15 mM LeuTMA	15 mM LeuTBA	15 mM LeuTMA	15 mM LeuTBA	5 mM LeuTMA
10 kV	1,264	1,2532	1,1068	1,0901	6,2335	3,5775
15 kV	2,0843	1,0131	1,2071	0,864	5,1981	4,5321
20 kV	1,1799	1,0527	1,405	0,8871	5,4635	3,9216

5.2.3.4. Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori HP β CD-HisTBA și HP β CD-HisTMA asupra amestecurilor racemice ale ofloxacinei, clorhidratului de ondansetron și, respectiv clorhidratului de mianserină

Efectul adaosului lichidelor ionice HisTBA, respectiv, HisTMA la HP β CD asupra enantioseparării celor trei amestecuri racemice studiate este inferior efectului adaosului lichidelor ionice LeuTBA, respectiv, LeuTMA la HP β CD.

5.2.3.5. Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori HP β CD-ProTBA și HP β CD-ProTMA asupra amestecurilor racemice ale ofloxacinei, clorhidratului de ondansetron și, respectiv clorhidratului de mianserină

Efectul adaosului lichidelor ionice ProTBA, respectiv, ProTMA la HP β CD asupra enantioseparării celor trei amestecuri racemice studiate este inferior efectului adaosului lichidelor ionice ProTBA, respectiv, ProTMA la HP β CD.

5.2.4. Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori RAMEB-lichid ionic chiral derivat de tetraalchilamoniu asupra unor amestecuri racemice medicamentoase

Derivatul metilat aleator al β ciclodextrinei (RAMEB) așa cum se va vedea, are o putere discriminatorie chirală care se manifestă diferit asupra amestecurilor racemice medicamentoase studiate: ofloxacină, clorhidrat de ondansetron și clorhidrat de mianserină.

Am urmărit să stabilim cum se modifică eficiența separării acestor amestecuri prin adăugarea lichidelor ionice chirale sintetizate la derivatul metilat aleator al β -ciclodextrinei, menținând concentrațiile selectorilor chirali la valori de maximum 15 mM.

Pentru separare prin electroforeză a enantiomerilor celor trei amestecuri racemice medicamentoase s-au folosit sistemele chirale menționate mai jos, urmărindu-se, de asemenea, influența parametrilor experimentali avuți în vedere și în determinările cu β -ciclodextrină-lichid ionic și hidroxipropil-ciclodextrină-lichid ionic:

- derivatul metilat aleator al β -ciclodextrinei cu leucinat de tetrabutilamoniu (RAMEB-LeuTBA),
- derivatul metilat aleator al β -ciclodextrinei cu leucinat de tetrametilamoniu (RAMEB-LeuTMA),
- derivatul metilat aleator al β -ciclodextrinei cu histidinat de tetrabutilamoniu (RAMEB-HisTBA),
- derivatul metilat aleator al β -ciclodextrinei cu histidinat de tetrametilamoniu (RAMEB-HisTMA),
- derivatul metilat aleator al β -ciclodextrinei cu prolinat de tetrabutilamoniu (RAMEB-ProTBA),
- derivatul metilat aleator al β -ciclodextrinei cu prolinat de tetrametilamoniu (RAMEB-ProTMA).

5.2.4.1. Capacitatea de enantioseparare a β -ciclodextrinei metilate aleator asupra amestecurilor racemice ale ofloxacinei, clorhidratului ondansetronului și, respectiv, clorhidratului mianserinei

S-a evidențiat capacitatea de enantiodiscriminare a RAMEB la separarea enantiomerilor ofloxacinei, ondansetronului și mianserinei prin electroforeză capilară folosind tampon citrat la pH 3,4 și 5.

Procedeul de lucru

Procedeul de lucru este identic cu cel prezentat în capitolul 5.2.1.1., în locul β -ciclodextrinei fiind folosită o soluție de RAMEB 15 mM.

Valorile timpilor de migare și ale rezoluțiilor sunt trecute în tabelul 62 pentru ofloxacină, tabelul 63 pentru ondansetron și tabelul 64 pentru mianserină. Se constată că RAMEB are capacitate de enantiodiscriminare scăzută asupra amestecului racemic al ondansetronului ($R_s = 0,2376$) indiferent de pH, iar amestecurile racemice ale ofloxacinei și ale mianserinei sunt separate cu rezoluții peste valoarea 1,2.

Capacitatea de discriminare chirală scade la creșterea pH-ului electrolitului de lucru pentru toate amestecurile racemice studiate. Determinările experimentale ulterioare au fost efectuate în tampon citrat la pH 3.

Tabel 62 Influența pH-ului asupra separării chirale a ofloxacinei

pH	R_s	t_A (min)	t_B (min)	$w_{1/2 A}$ (min)	$w_{1/2 B}$ (min)
3	1,2858	7,335	7,57	0,0993	0,1157
4	0,7941	6,629	6,801	0,092	0,1628
5	1,0642	7,203	7,349	0,0646	0,0968

Tabel 63 Influența pH-ului asupra separării chirale a clorhidratului de ondansetron

pH	R_s	t_A (min)	t_B (min)	$w_{1/2 A}$ (min)	$w_{1/2 B}$ (min)
3	0,2376	8,053	8,095	0,0331	0,1748
4	0,1206	7,305	7,329	0,0317	0,2023
5	0	7,415	-	0,1772	-

Tabel 64 Influența pH-ului asupra separării chirale a clorhidratului de mianserină

pH	R _s	t _A (min)	t _B (min)	w _{1/2 A} (min)	w _{1/2 B} (min)
3	2,5298	9,644	10,173	0,1167	0,1293
4	1,832	7,0907	8,228	0,0959	0,1102
5	1,4526	8,31	8,593	0,105	0,1242

5.2.4.2. Influența precursorilor lichidelor ionice chirale asupra capacității de separare a RAMEB

S-a urmărit efectul concentrației precursorilor lichidelor ionice (hidroxizii cuaternari de amoniu și aminoacizii) în amestec cu RAMEB, la separarea amestecurilor racemice ale ofloxacinei, clorhidratului de ondansetron și clorhidratului de mianserină.

Procedeu de lucru

Prepararea soluțiilor s-a efectuat similar cu procedeul din capitolul 5.2.1.2; s-a utilizat RAMEB în locul βCD. Concentrațiile amestecurilor racemice sunt de 1 mg/mL. S-a lucrat la un potențial de 20 kV și la o temperatură de lucru de 25°C.

Tabel 65 Influența sistemului de selectori RAMEB-TAAOH la separarea enantiomerilor ofloxacinei, ondansetronului și mianserinei la concentrații de 15 mM RAMEB

15 mM RAMEB	TAAOH (mM)	R _s ofloxacină	R _s ondansetron	R _s mianserină
TBAOH	0 mM	1,6564	0,2376	2,5298
	5 mM	1,3781	0,1459	1,535
	10 mM	1,3535	0,1845	2,2978
	15 mM	1,4694	0,1775	2,2443
TMAOH	0 mM	1,6564	0,2376	2,5298
	5 mM	1,1498	0,1542	1,1617
	10 mM	1,1958	0,1597	1,7863
	15 mM	1,135	0,3157	1,667

Rezultatele obținute se găsesc în tabelul 65. Se poate observa că prezența hidroxizilor de tetraalchilamoniu, fie TBAOH, fie TMAOH în amestec cu RAMEB are un efect nefavorabil asupra separărilor enantiomerilor pentru toate cele trei amestecuri racemice, efectul fiind mai accentuat în cazul TMAOH.

Aminoacizii precursori ai lichidelor ionice nu influențează enantioselectivitatea RAMEB la separarea amestecurilor racemice considerate.

5.2.4.3. Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori RAMEB-LeuTBA și RAMEB-LeuTMA asupra amestecurilor racemice ale ofloxacinei, clorhidratului ondansetronului și, respectiv, clorhidratului mianserinei

S-a urmărit evidențierea efectului prezenței lichidelor ionice chirale LeuTBA și LeuTMA în amestec cu β -ciclodextrina metilată aleator asupra enantioseparărilor amestecurilor racemice medicamentoase studiate.

Procedeu de lucru

Prepararea soluțiilor care conțin sistemele de selectori RAMEB-LeuTBA și RAMEB-LeuTMA se face după procedeul de la capitolul 5.2.1.3., utilizându-se RAMEB în locul β CD. S-a lucrat la un potențial de 20 kV și la o temperatură de 25°C.

Influența concentrației RAMEB și a lichidului ionic chiral

Pentru studierea efectului de discriminare chirală a celor două componente ale sistemului binar de selectori, RAMEB-LeuTBA și RAMEB-LeuTMA s-au preparat soluții conform tabelului 11.

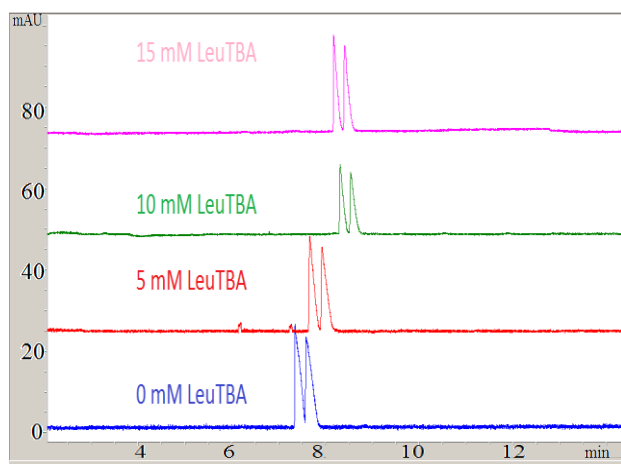


Figura 98 Influența concentrației de LeuTBA la separările enantiomerilor ofloxacinei (15 mM RAMEB, 20 kV, 25 °C)

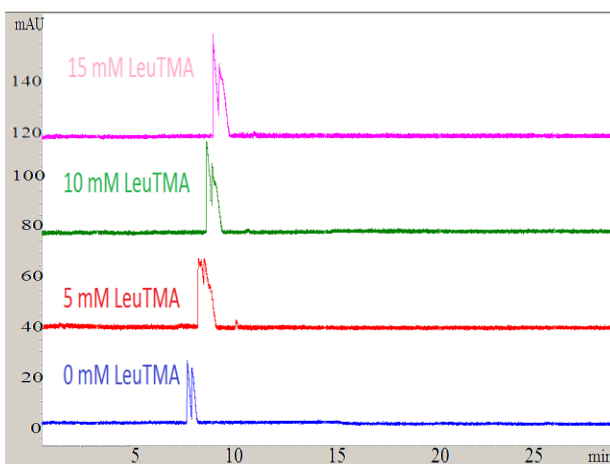


Figura 99 Influența concentrației de LeuTMA asupra separărilor enantiomerilor ofloxacinei (15 mM RAMEB, 20 kV, 25 °C)

Tabel 66 Influența sistemului de selectori RAMEB-LeuTBA asupra separărilor enantiomerilor ofloxacinei, la concentrații constante de RAMEB

RAMEB (mM)	LeuTBA (mM)	t _A (min)	t _B (min)	w _{1/2 A} (min)	w _{1/2 B} (min)	Rs
5 mM	0 mM	6,258	6,33	0,044	0,1071	0,5606
	5 mM	6,852	6,936	0,0413	0,0764	0,8396
	10 mM	7,197	7,295	0,0485	0,0804	0,8845
	15 mM	7,924	8,046	0,0625	0,1121	0,8221
10 mM	0 mM	6,943	7,1	0,0702	0,1029	1,0671
	5 mM	6,997	7,148	0,0713	0,0747	1,2204
	10 mM	7,741	7,926	0,073	0,0924	1,3159
	15 mM	7,687	7,863	0,0697	0,888	1,3064
15 mM	0 mM	7,335	7,57	0,0993	0,1157	1,2859
	5 mM	7,733	7,949	0,0763	0,0786	1,6454
	10 mM	8,3	8,528	0,0703	0,0822	1,7589
	15 mM	8,166	8,392	0,07	0,0809	1,762

Tabel 67 Influența sistemului de selectori RAMEB-LeuTMA asupra separărilor enantiomerilor ofloxacinei, la concentrații constante de RAMEB

RAMEB (mM)	LeuTMA (mM)	t _A (min)	t _B (min)	w _{1/2 A} (min)	w _{1/2 B} (min)	Rs
5 mM	0 mM	6,258	6,33	0,044	0,1071	0,5606
	5 mM	6,807	6,864	0,0629	0,2622	0,2063
	10 mM	9,081	9,236	0,0981	0,201	0,6096
	15 mM	7,694	7,786	0,0489	0,1019	0,7178
10 mM	0 mM	6,943	7,1	0,0702	0,1029	1,0671
	5 mM	7,039	7,184	0,1055	0,2428	0,4898
	10 mM	7,393	7,568	0,1023	0,202	0,6766
	15 mM	13,186	14,642	0,695	1,0108	0,8666
15 mM	0 mM	7,335	7,57	0,0993	0,1157	1,2859
	5 mM	7,914	8,184	0,2632	0,3631	0,5072
	10 mM	8,301	8,597	0,1447	0,2176	0,9612
	15 mM	8,647	8,968	0,1403	0,2203	1,0473

În electroforegramele din fig. 98 și 99 și în tabelele 66 și 67 sunt prezentate rezultatele de la separarea enantiomerilor ofloxacinei în prezența sistemelor, RAMEB-LeuTBA/LeuTMA.

Electroforegramele din fig. 102 și 103 și tabelele 68 și 69 prezintă rezultatele obținute la separarea enantiomerilor ondansetronului în prezența acelorași sisteme binare de selectori.

În cazul separării enantiomerilor ofloxacinei se poate observa pentru toate rapoartele de concentrații efectul sinergic al celor două componente ale sistemelor de selectori RAMEB-

LeuTBA, în sensul creșterii rezoluției față de ciclodextrina singură, rezoluțiile cele mai mari se obțin pentru raportul RAMEB 15 mM: LeuTBA 15 mM. Raportul concentrațiilor 15 mM: 15 mM pentru sistemul RAMEB-LeuTMA conduce la rezoluția cea mai mare, însă toate rezoluțiile pentru acest sistem de selectori sunt inferioare celor obținute cu sistemul RAMEB-LeuTBA.

În cazul separării enantiomerilor ondansetronului, la adaosul lichidului ionic, rezoluțiile cresc nesemnificativ pentru ambele sisteme RAMEB – LeuTBA și, respectiv, RAMEB – LeuTMA pentru toate rapoartele de concentrații studiate.

Amestecul racemic al mianserinei este separat cu $R_s > 2,00$ în prezența RAMEB. Se observă însă, că la creșterea concentrației ciclodextrinei de la 5 mM la 15 mM rezoluțiile scad, iar adaosul lichidului ionic LeuTBA are în general un efect nefavorabil asupra separărilor. De asemenea, adaosul lichidului ionic LeuTMA are un efect de micșorare a rezoluțiilor față de RAMEB singur.

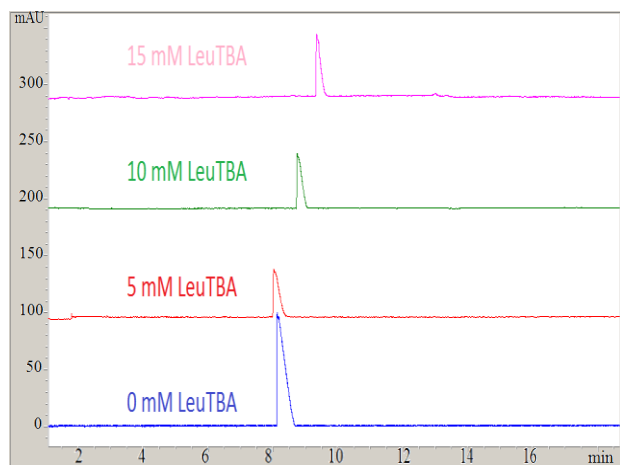


Figura 102 Influența concentrației de LeuTBA asupra separărilor enantiomerilor ondansetronului (15 mM RAMEB, 20 kV, 25 °C)

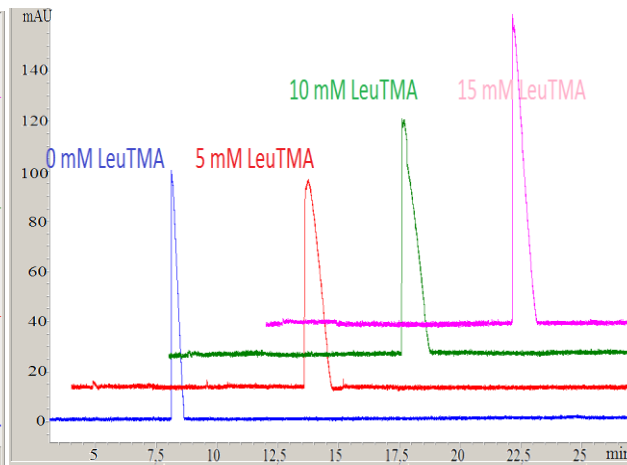


Figura 103 Influența concentrației de LeuTMA asupra separărilor enantiomerilor ondansetronului (15 mM RAMEB, 20 kV, 25 °C)

Influența potențialului aplicat

Pentru sistemele binare RAMEB-LeuTBA, o scădere a potențialului aplicat de la 20 kV la 10 kV conduce la creșterea rezoluțiilor separărilor pentru amestecurile racemice studiate.

În cazul sistemului binar RAMEB-LeuTMA, pentru amestecurile racemice ale ofloxacinei și mianserinei rezoluțiile se obțin la 15 kV pentru ofloxacina în raport molar 15 mM RAMEB : 15 mM LeuTMA și respectiv, pentru mianserină pentru raportul molar 15 mM RAMEB : 5 mM LeuTMA (tabel 72).

Tabel 68 Influența sistemului de selectori RAMEB-LeuTBA asupra separărilor enantiomerilor ondansetronului, la concentrații constante de RAMEB

RAMEB (mM)	LeuTBA (mM)	t _A (min)	t _B (min)	w _{1/2 A} (min)	w _{1/2 B} (min)	Rs
5 mM	0 mM	6,85	6,865	0,205	0,1893	0,1114
	5 mM	7,488	7,497	0,0447	0,0456	0,1176
	10 mM	7,623	7,635	0,0246	0,0803	0,1346
	15 mM	7,956	7,977	0,0331	0,1469	0,1372
10 mM	0 mM	7,747	7,785	0,0376	0,1874	0,1361
	5 mM	8,332	8,371	0,0513	0,2876	0,1354
	10 mM	8,736	8,784	0,1513	0,1587	0,1485
	15 mM	8,548	8,582	0,0428	0,2098	0,1584
15 mM	0 mM	8,053	8,095	0,0331	0,1748	0,1411
	5 mM	8,037	8,059	0,0335	0,1145	0,1749
	10 mM	8,741	8,7660	0,0382	0,1342	0,1706
	15 mM	9,322	9,345	0,0389	0,1312	0,1591

Tabel 69 Influența sistemului de selectori RAMEB-LeuTMA asupra separărilor enantiomerilor ondansetronului, la concentrații constante de RAMEB

RAMEB (mM)	LeuTMA (mM)	t _A (min)	t _B (min)	w _{1/2 A} (min)	w _{1/2 B} (min)	Rs
5 mM	0 mM	6,85	6,865	0,0205	0,1893	0,1114
	5 mM	7,085	-	0,2251	-	0
	10 mM	6,647	-	0,2032	-	0
	15 mM	7,451	-	0,2507	-	0
10 mM	0 mM	7,747	7,785	0,0376	0,1874	0,1361
	5 mM	8,292	-	0,364	-	0
	10 mM	8,119	8,168	0,0429	0,374	0,1383
	15 mM	7,205	7,235	0,0333	0,2488	0,1251
15 mM	0 mM	8,053	8,095	0,0331	0,1748	0,1411
	5 mM	9,713	9,747	0,124	0,5616	0,061
	10 mM	9,612	9,683	0,0386	0,3995	0,1906
	15 mM	10,144	10,214	0,0451	0,3298	0,2196

Influența temperaturii

În cazul amestecului racemic al ondansetronului, scăderea temperaturii de lucru la 20 °C a condus la o ușoară creștere a rezoluției pentru sistemele 15 mM RAMEB: 10 mM LeuTBA, respectiv; pentru sistemul 15 mM RAMEB: 5 mM LeuTMA o temperatură de 16 °C este favorabilă separărilor. Creșterea rezoluțiilor la scăderea temperaturii se poate observa și în cazul amestecului racemic al mianserinei; enantioselectivitatea crește la o temperatură de 16°C pentru un amestec de

5 mM RAMEB și 5 mM LeuTBA; pentru sistemul de selectori 15 mM RAMEB: 5 mM LeuTMA enantioselectivitatea nu se modifică la scăderea temperaturii (tabel 73).

Tabel 72 Efectul potențialului asupra separărilor enantiomerilor ofloxacinei, ondansetronului și mianserinei în prezența sistemelor de selectori binarii, RAMEB 15 mM și LeuTBA, respectiv LeuTMA

U (kV)	Rs ofloxacină		Rs ondansetron		Rs mianserină	
	15 mM LeuTBA	15 mM LeuTMA	10 mM LeuTBA	5 mM LeuTMA	5 mM LeuTBA	5 mM LeuTMA
10 kV	1,9503	1,1441	0,1147	0,405	3,5288	2,6852
15 kV	1,4228	1,5641	0	0,37	3,3011	3,3624
20 kV	1,762	1,047	0,1705	0,0605	2,0108	1,8484

5.2.4.4. Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori RAMEB-HisTBA și RAMEB-HisTMA asupra amestecurilor racemice ale ofloxacinei, clorhidratului ondansetronului și, respectiv, clorhidratului mianserinei

Efectul adaosului lichidelor ionice HisTBA, respectiv, HisTMA la RAMEB asupra enantioseparării celor trei amestecuri racemice studiate este inferior efectului adaosului lichidelor ionice LeuTBA, respectiv, LeuTMA la RAMEB.

5.2.4.5. Capacitatea de enantioseparare a sistemelor de selectori RAMEB-ProTBA și RAMEB-ProTMA asupra amestecurilor racemice ale ofloxacinei, clorhidratului ondansetronului și, respectiv, clorhidratului mianserinei

Efectul adaosului lichidelor ionice ProTBA, respectiv, ProTMA la RAMEB asupra enantioseparării celor trei amestecuri racemice studiate este inferior efectului adaosului lichidelor ionice LeuTBA, respectiv, LeuTMA la RAMEB.

5.2.5. Influența enantioselectivității sistemelor lichid ionic chiral-ciclodextrină asupra mobilităților efective ale separărilor

Așa cum reiese din datele obținute, eficiența sistemelor de selectori ciclodextrină- lichid ionic chiral derivat de la tetrabutilamoniu este mai mare decât a sistemelor binare ciclodextrină-lichid ionic derivat de la tetrametilamoniu.

La pH 3 (tampon citrat), timpii de migrare sunt mari, iar mobilitatea fluxului electroosmotiv este foarte redusă.

În cazul în care s-a observat picul corespunzător markerului tiouree, s-au calculat mobilitățile efective ale celor doi enantiomeri după formula:

$$\mu_{effi} = \left(\frac{1}{t_i} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \frac{l_{eff} l_t}{V}$$

în care μ_{effi} este mobilitatea efectivă a analitului i , l_{eff} este lungimea efectivă a capilarului (40 cm), l_{tot} este lungimea totală a capilarului (48,5 cm), V este potențialul aplicat (V), t_i este timpul de migrare al analitului i , iar t_{EOF} este timpul de migare al fluxului electroosmotiv.

Prin liniarizarea relației matematice dintre mobilitatea electroforetică și concentrația de echilibru a ligandului se obțin ecuații care permit estimarea constantei de formare a complexului de incluziune. Am utilizat următorul modelul matematic de liniarizare :

- modelul dublu-reciproc ,:

$$\frac{1}{\mu_i - \mu_f} = \frac{1}{(\mu_c - \mu_f) \cdot K} \cdot \frac{1}{[CD]} + \frac{1}{\mu_c - \mu_f}$$

în care μ_i este mobilitatea efectivă a analitului, μ_f este mobilitatea efectivă a analitului necomplexat iar μ_c este mobilitatea analitului complexat iar $[CD]$ este concentrația ciclodextrinei.

Constanta aparentă de formare a complexului de incluziune, K , se obține prin raportarea pantei la ordonata la origine, care panta și ordonata la origine fiind parametrii dreptei obținute prin reprezentarea grafică a $[CD]/(\mu_i - \mu_f)$ față de $[CD]$ [167].

Din analiza rezultatelor obținute se observă că, în general funcția de liniarizare xy reciprocă este cea mai adecvată pentru estimarea constantelor de formare.

În cazul ofloxacinei, adaosul de HisTBA și ProTBA în concentrații crescătoare determină variații mici crescătoare ale constantei de formare, care se pot explica printr-un efect antientropic

al constantei lichidului ionic, prin care la concentrații mari favorizează formarea complexelor prin incluziune ofloxacină-RAMEB (tabel 91).

Pentru ondansetron, lichidele ionice au efecte diferite asupra interacțiunii substanță farmaceutică cu ciclodextrina.

Adaosul de ProTBA în electrolitul de lucru determină scăderea constantei de formare a complexelor de incluziune cu ciclodextrina. Corelând această observație cu creșterea rezoluției chirale, se indică un mecanism de interacțiune în care fenomenul de incluziune are o importanță redusă.

În cazul mianserinei, stabilitatea relativă mai mare și asemănătoare a complexelor de incluziune formați de cei doi enantiomeri face ca variațiile înregistrate la adaosul de lichid ionic să fie reduse și neuniforme. Capacitatea de enantiodiscriminare a RAMEB este factorul principal care asigură separarea enantiomerilor mianserinei (tabel 93).

RAMEB (mM)	HisTBA (mM)	μ free (cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)	μ 1 (cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)	μ 2 (cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)	<i>xy reciprocă</i>	
					K ₁ (Lmol ⁻¹)	K ₂ (Lmol ⁻¹)
0	0	0,0002185			-38,55	-28,40
5	0		0,0002123	0,0002088		
15	0		0,0001829	0,000175		
0	0	0,0002185			14,81	12,62
5	5		0,000202	0,0001993		
15	5		0,000175	0,0001687		
0	0	0,0002185			27,59	30,30
5	10		0,000198	0,0001953		
15	10		0,000169	0,0001634		
0	0	0,0002185			142,42	136,87
5	15		0,000184	0,0001811		
15	15		0,000162	0,0001566		

Tabel 91 Valorile mobilităților efective și ale constantelor aparente de incluziune calculate la separarea enantiomerilor ofloxacinei cu sistemul binar RAMEB-ProTBA

RAMEB (mM)	LeuTBA (mM)	μ free (cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)	μ 1 (cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)	μ 2 (cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)	<i>xy reciprocă</i>	
					K ₁ (Lmol ⁻¹)	K ₂ (Lmol ⁻¹)
0	0	0,0002535			117,93	181,43
5	0		0,0001876	0,000172		
10	0		0,00014	0,0001282		
0	0	0,0002535			-122,64	451,79
5	5		0,0001656	0,0001524		
10	5		0,000375	0,0001264		

Tabel 93 Valorile mobilităților efective și ale constantelor aparente de incluziune calculate la separarea enantiomerilor mianserinei cu sistemul RAMEB-LeuTBA

5.2.6. Concluzii

Separările amestecurilor racemice ofloxacină, clorhidrat de ondansetron și clorhidrat de mianserină prin electroforeză capilară de afinitate au fost efectuate cu sisteme binare de selectori ciclodextrină (HP β CD, RAMEB și β CD) - lichide ionice chirale (derivați de la tetrametilamoniu: LeuTMA, HisTMA, ProTMA și derivați de la tetrabutilamoniu: LeuTBA, HisTBA, ProTBA). Cele trei ciclodextrine singure exercită un efect de separare diferit asupra celor trei amestecuri racemice, influențat de concentrația acestora. Se observă că, exceptând enantiomerii mianserinei, amestecurile racemice ale ofloxacinei și ondansetronului sunt mai bine separate odată cu creșterea concentrației ciclodextrinei, fără însă ca ciclodextrina singură să producă o separare totală a acestora. Amestecul racemic al mianserinei este separat cu rezoluții mai mari de 2,00 de oricare din cele trei ciclodextrine, însă, creșterea concentrației ciclodextrinei poate diminua valorile rezoluțiilor. Deși se formează complecși de incluziune între ofloxacină- β -ciclodextrină [156], nu există enantiodiscriminare la separarea acestui amestec racemic prin metodele electroforetice studiate.

Determinările experimentale efectuate au evidențiat modul diferit în care adaosul lichidelor ionice chirale sintetizate la ciclodextrine influențează enantiosepararea amestecurilor racemice studiate și influența unor parametri experimentali, cum sunt concentrațiile ciclodextrinei și lichidului ionic, pH-ul electrolitului de lucru (tampon citrat), potențialul aplicat și temperatura.

Efectul adaosului lichidului ionic chiral în electrolitul de lucru la separarea celor trei amestecuri racemice a fost evaluat prin calcularea rezoluțiilor separărilor.

De asemenea s-a studiat efectul lichidelor ionice chirale asupra mobilităților efective ale separărilor enantiomerilor prin calculul constantelor aparente de incluziune.

Modificarea enantioselectivității a fost apreciată prin comparare cu rezoluțiile separărilor cu ciclodextrină sau cu sistemele binare care conțin hidroxizi cuaternari de amoniu și ciclodextrină.

5.3. Studiul enantioselectivității lichidelor ionice chirale la separarea unor amestecuri racemice de aminoacizi prin schimb chiral de liganzi (LECE)

În continuarea cercetărilor, am urmărit capacitatea enantioselectivă a unora dintre lichidele ionice chirale sintetizate de noi (capitolul 5.1), și anume, derivații de tetrametilamoniu ai leucinei (LeuTMA), histidinei (HisTMA) și prolinei (ProTMA), având la bază mecanismul de separare prin schimb chiral de liganzi (LECE). Am avut în vedere separarea unor amestecuri racemice de aminoacizi: acidul DL aspartic, DL alanina, DL norvalina. Așa cum indică cercetări din literatură, în separările electroforetice care au la bază acest mecanism, lichidele ionice se folosesc, cel mai adesea, alături de săruri de cupru [132,142].

În cercetările efectuate, am urmărit pe de o parte, efectul sistemului L-ProTMA-Cu²⁺ asupra separării enantiomerilor acidului DL aspartic, DL alaninei, DL norvalinei, și pe de altă parte, efectul adaosului diferiților modificatori organici (metanol, etanol, propanol, izopropanol), ca și efectul concentrației componentelor sistemului ProTMA-Cu²⁺.

Procedeu de lucru

S-au înregistrat electroforeramele soluțiilor care conțin L-ProTMA și sare de cupru în raport de concentrații 30 mM : 15 mM (raport considerat optim în literatură pentru sistemul L-Pro-Cu²⁺ la separarea amestecurilor racemice ale aminoacizilor) [132].

Amestecurile racemice ale aminoacizilor testați au avut concentrația de 1 mg/mL, în soluție apoasă.

Proba amestecului racemic de aminoacid a fost introdusă în sistem hidrodinamic, folosind o presiune de 50 mbar x 5s. Detecția s-a efectuat la lungimea de undă caracteristică pentru complexii Cu²⁺ cu aminoacizii, $\lambda=254$ nm (aminoacizii nu absorb în UV sau intensitățile absorbanțelor au valori foarte mici ; formarea complexilor cu ionii de Cu²⁺ determină o deplasare hipercromă la 254 nm). S-a lucrat la temperatura de 25 °C, iar potențialul aplicat a fost de 20 kV.

Electroforeramele înregistrate astfel evidențiază faptul că aceste condiții experimentale nu permit separarea amestecurilor de aminoacizi studiate.

Am variat concentrația CIL, păstrând raportul CIL: Cu^{2+} de 2:1, însă nu s-au obținut separări nici pentru concentrații de CIL 60 mM. Creșterea concentrației CIL peste 60 mM crește tăria ionică a electrolitului de lucru și implicit intensitatea curentului din timpul analizei.

Cercetările efectuate de Mu și colab. [136,143] subliniază importanța prezenței modificatorilor organici, de exemplu, metanol (20%) în electrolitul de lucru pentru enantioseparări asemănătoare. Am utilizat amestecul racemic al acidului aspartic, deoarece nu am obținut separări ale celorlalte amestecuri racemice de aminoacizi studiate.

Condițiile de analiză optime sunt pentru un raport molar CIL: Cu^{2+} de 2:1, în care concentrația CIL este de 50 mM, cu adaos de modificator organic de 20 %. A fost identificată și ordinea migrării enantiomerilor: enantiomerul L, înaintea enantiomerului D (tabel 97 și fig. 122).

Datele obținute ne permit să considerăm că procedeul propus pentru separarea enantiomerilor acidului DL aspartic dă posibilitatea identificării enantiomerilor acestuia.

Tabel 97 Valorile timpilor de migrare, ale mobilităților și ale rezoluțiilor la separările cu 50 mM ProTMA, 20% moficator organic

Modificator organic	t_L (min)	t_D (min)	$W_{L\ 1/2}$ (min)	$W_{D\ 1/2}$ (min)	t_{EOF} (min)	$\mu^{eff\ L} \cdot 10^6 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\mu^{eff\ D} \cdot 10^6 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	R_s
20 % MeOH	35,043	36,754	0,8279	0,7285	29,36	-6,081	-7,358	1,2933
20% EtOH	30,659	31,853	0,508	0,4347	24,416	-9,232	-10,58	1,4900
20% ProOH	40,169	41,923	0,561	0,5553	29,613	-9,75	-10,89	1,8485
20% iProOH	45,78	47,902	0,6758	0,6487	36,628	-59,68	-70,22	1,8848

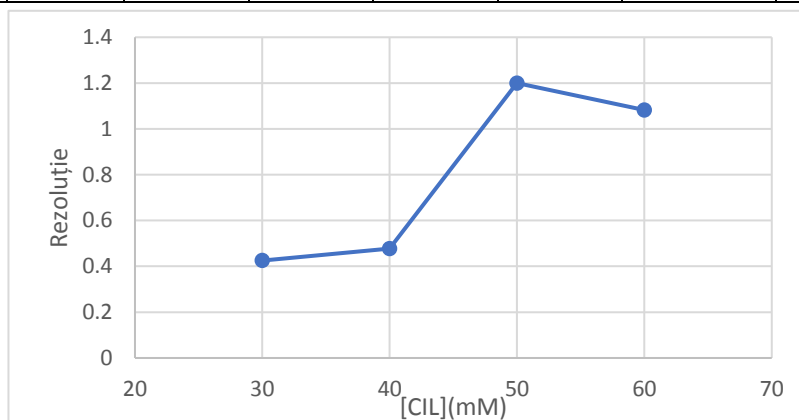


Figura 122 Efectul concentrației AAIL asupra rezoluțiilor separărilor enantiomerilor acidului DL aspartic

5.4. Studiul enantioselectivității lichidelor ionice chirale asupra separării unor amestecuri racemice medicamentoase în separări electroforetice în mediu neapos (NACE)

Electroforeza capilară în mediu neapos (NACE) este o alternativă a electroforezei în mediu apos pentru amestecurile racemice parțial solubile sau insolubile în apă.

În determinările făcute în mediu neapos am utilizat ca solvent formamida. În tabelul 98 sunt prezentate comparativ câteva dintre cele mai importante proprietăți ale acestui solvent și ale apei.

Pentru determinările experimentale din NACE am ales formamida ca solvent.

Tabel 98 Proprietăți ale formamidei și ale apei [147]

Solvent	ϵ	η (mPas)	ϵ/η	Polaritate (π^*)
Formamidă	109,5	3,30	33	0,97
Apă	78,4	0,89	88	1,09

5.4.1. Capacitatea de enantiodiscriminare a β -ciclodextrinei și a lichidelor ionice chirale asupra amestecurilor unor amestecuri racemice medicamentoase

Într-o primă etapă, s-a urmărit, capacitatea de separare chirală a β -ciclodextrinei, în tampon acid citric-tris în mediu de formamidă față de cele trei amestecuri racemice, clorhidrat de ondansetron, clorhidrat de mianserină și ofloxacină.

Procedul de lucru

Au fost analizate soluțiile amestecurilor racemice medicamentoase luate în studiu, folosind soluții ca electrolit de lucru o soluție în formamidă care conține β CD (30 mM sau 60 mM) în tampon acid citric-Tris. Potențialul aplicat a fost de 20 kV; proba a fost introdusă în sistem hidrodinamic, folosind o presiune de 50 mbar x 10s (în toate determinările, timpul de injecție a fost crescut din cauza vâscozității soluției). S-a lucrat la 20 °C. Detecția s-a efectuat la 254 nm.

În aceste condiții s-a constatat separarea totală a enantiomerilor mianserinei, așa cum prevede și literatura consultată ($R_s=1,3$ pentru 30 mM β CD, respectiv $R_s=2,9$ pentru 60 mM β CD),

Conc.βCD (mM)	Rs			
	ProTMA 0 mM	ProTMA 30 mM	ProTMA 60 mM	ProTMA 90 mM
30 mM	1,3008	1,7671	1,9091	1,7765
60 mM	2,9034	3,7081	3,128	3,4037

enantiomerii ondansetronului se separă parțial, cu rezoluții mici, la concentrații mari de ciclodextrină (60 mM) ($R_s=0,76$) iar pentru

enantiomerii ofloxacinei nu se realizează separarea.

De asemenea, niciunul din amestecurile racemice nu a fost separat cu niciunul dintre lichidele ionice ProTMA, HisTMA, LeuTMA în concentrație 30 mM.

Am analizat în continuare, soluțiile amestecurilor racemice medicamentoase folosind ca electrolit de lucru soluția în formamidă a βCD (30 sau 60 mM) în tampon acid citric-Tris, la care s-au adăugat lichidele ionice, ProTMA, HisTMA, LeuTMA în concentrație 30 mM. Menționăm că LeuTMA și HisTMA nu au o solubilitate corespunzătoare în electrolitul de lucru la concentrații mai mari de 30 mM. De aceea, în determinările ulterioare am ales dintre lichidele ionice, ProTMA.

În aceste condiții, are loc separarea cu o rezoluție mai mare a enantiomerilor mianserinei ($R_s=1,76$ pentru 30 mM βCD : 30 mM ProTMA și $R_s=3,7$ pentru 60 mM βCD : 30 mM ProTMA) și am observat că nu se pot separa amestecurile racemice ale ondansetronului și ofloxacinei.

În cercetările ulterioare am studiat amestecul racemic al mianserinei. Am urmărit efectul adaosului lichidului ionic ProTMA asupra mobilităților efective, efectul concentrației selectorilor chirali în sistemul βCD-ProTMA și influențele potențialului aplicat și ale temperaturii de lucru.

5.4.2. Efectul concentrației componentelor sistemului binar βCD-L-ProTMA asupra separărilor

În determinările prin electroforeză capilară în mediu neapos, concentrațiile componentelor sistemului binar de selectori βCD-L-ProTMA au fost variate conform tabelului 13. S-a lucrat la un potențial aplicat de 20 kV și la o temperatură de 20 °C. βCD nu depășește 60 mM pentru a nu crește vâscozitatea electrolitului, dar concentrațiile lichidului ionic ProTMA pot fi crescute până

Conc.βCD (mM)	Rs			
	ProTMA 0 mM	ProTMA 30 mM	ProTMA 60 mM	ProTMA 90 mM
30 mM	1,3008	1,7671	1,9091	1,7765
60 mM	2,9034	3,7081	3,128	3,4037

Tabel 99 Rezoluțiile separărilor la variația concentrației selectorilor chirali βCD și ProTMA la un potențial aplicat de 20 kV și 20°C

la 90 mM în formamidă. În aceste condiții, în tabelul 99 sunt redate rezoluțiile calculate pentru diferitele rapoarte de concentrații β CD-L-ProTMA.

Așa cum se poate observa, pentru concentrația 60 mM β CD, separarea cea mai bună se obține pentru o concentrație de 30 mM L-ProTMA, în timp ce pentru concentrația 30 mM β CD adaosul lichidului ionic până la 60 mM favorizează separarea, după această concentrație rezoluțiile nu se modifică semnificativ.

5.4.4. Efectul potențialului aplicat și a temperaturii de lucru

Efectul potențialului a fost urmărit în intervalul 15-25 kV, iar cel al temperaturii în domeniul 20-30°C. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 101. Rezoluțiile separărilor cresc la scăderea potențialului aplicat și a temperaturii, separările fiind favorizate de un potențial de 15 kV și de temperatura scăzută 20°C.

Tabel 101 Efectul potențialului aplicat și a temperaturii asupra rezoluțiilor la separarea enantiomerilor mianserinei în sistem binar β CD-ProTMA

Potențial (kV)	Rs	
	30 mM ProTMA	60 mM ProTMA
15 kV	3,2300	3,3366
20 kV	2,7719	2,7998
25 kV	2,5528	2,8915

t (°C)	Rs		
	30 mM ProTMA	60 mM ProTMA	90 mM ProTMA
20 °C	3,7081	3,128	3,4037
25 °C	2,7719	2,7998	2,9509
30 °C	2,3244	2,406	2,3622

Rezoluțiile cresc mai pronunțat la descreșterea temperaturii în cazul determinărilor din mediu neapos comparativ cu determinările în mediu apos.

6. CONCLUZII GENERALE

Partea experimentală a tezei prezintă sinteza, caracterizarea unor lichide ionice chirale, derivate de tetrametilamoniu și tetrabutilamoniu ale aminoacizilor: leucină, histidină și prolină, și studiile făcute în vederea evidențierii capacității de discriminare chirală a acestora la separarea unor amestecuri racemice medicamentoase.

Am sintetizat următoarele lichide ionice chirale:

- derivați de tetrametilamoniu ai aminoacizilor (AATMA) :
 - l-leucinat de tetrametilamoniu (LeuTMA),
 - l-histidinat de tetrametilamoniu (HisTMA),
 - l-prolinat de tetrametilamoniu (ProTMA).
- derivați de tetrabutilamoniu ai aminoacizilor (AATBA) :
 - l-leucinat de tetrabutilamoniu (LeuTBA),
 - l-histidinat de tetrabutilamoniu (HisTBA),
 - l-prolinat de tetrabutilamoniu (ProTBA).

Sinteza celor două tipuri de lichide ionice a avut la bază procesul de neutralizare.

După determinarea purității acestora prin cromatografie în strat subțire, au fost caracterizate prin spectrometrie ^1H -RMN, spectrometrie IR, analiză elementală și determinarea puterii rotatorii specifice.

Din determinările spectrelor ^1H -RMN, prin comparație cu spectrele ^1H -RMN ale precursorilor, a fost confirmată deprotonarea grupării carboxil prin creșterea valorii deplasării chimice a protonului de la atomul de carbon din poziția α a anionului aminoacidului din lichidul ionic; de asemenea deplasarea chimică a protonului de la atomul de carbon din poziția α a cationului tetraalchil amoniu scade prin comparație cu hidroxidul cuaternar de amoniu. Analizele IR au evidențiat benzi caracteristice pentru grupările funcționale importante (amino și carboxilat) ale compușilor studiați.

Datorită avantajelor pe care le prezintă electroforeza capilară, dintre care, în mod special, ne-au interesat optimizarea separărilor prin posibilitatea adăugării unor aditivi la electrolitul de lucru, cu efect favorabil asupra rezoluțiilor, sensibilitatea crescută și posibilitatea folosirii unor cantități mici de soluție tampon și a unor solvenți care nu pot fi utilizați în HPLC, am folosit această

metodă pentru a pune în evidență proprietățile enantioselective ale lichidelor ionice chirale sintetizate.

Deși unele CIL sintetizate prezintă în structură o grupare voluminoasă, $N^+(C_4H_9)_4$, care poate exercita un efect de împiedicare sterică, și, deși CIL pot stabili interacțiuni electrostatice analit-selector, nu îndeplinesc condiția interacțiunii în trei puncte cu analitul (probabil, datorită lipsei nesaturării moleculare care împiedică interacțiunile de tip π - π cu nucleele aromatice) și, prin urmare, nu pot funcționa ca selectori chirali unici.

De aceea, am utilizat CIL sintetizate în sistem binar, alături de ciclodextrine, β CD și unii derivați substituiți ai acestora, HP β CD și β -ciclodextrina metilată aleator (unele ciclodextrine funcționând ele însele ca selectori chirali).

Am luat în studiu următoarele tipuri de amestecuri racemice:

- amestecuri racemice separate de ciclodextrine la concentrații mari (ofloxacina în prezența HP β CD, RAMEB),
- amestecuri racemice separate parțial de ciclodextrine (ondansetronul în prezența HP β CD, RAMEB, β CD),
- amestecuri racemice separate total la concentrații mici de către toate ciclodextrinele studiate (mianserina în prezența HP β CD, RAMEB, β CD),
- amestecuri racemice ale unor aminoacizi, pentru separări prin mecanismul schimbului chiral de liganzi.

În cazul separărilor cu sistemele de selectori CIL-ciclodextrină, în determinările efectuate, am evidențiat rolul lichidelor ionice chirale asupra enantioselectivității în sistemul binar și influența parametrilor experimentali asupra separărilor : natura sistemului tampon, pH-ul acestuia, concentrația ciclodextrinei, concentrația lichidului ionic chiral, potențialul aplicat și temperatura.

Pe baza datelor obținute, s-a ales ca electrolit de lucru soluția tampon citrat cu pH 3 care asigură și solubilizarea analiților.

Din datele obținute, reiese importanța fenomenului de includere a enantiomerilor în structura ciclodextrinelor pentru separarea acestora, efectul lichidelor ionice chirale fiind direct corelat cu proporția în care analitul este implicat în complexare și cu stabilitatea aparentă a complexilor de incluziune analit-ciclodextrină. CIL și enantiomerii pot fi antrenați în echilibre competitive de complexare prin incluziune în cavitatea ciclodextrinei, având ca rezultat separarea,

într-o măsură mai mică sau mai mare, a enantiomerilor. Interacțiunile de stabilizare dintre selectori și analiți sunt reprezentate de legături dipol-dipol, van der Waals, legături de hidrogen, legături electrostatice (datorită naturii ionice a CIL), dar și de legături hidrofobe. Se constată efectul enantioselectiv mai accentuat al CIL derivate de tetrabutilamoniu ale aminoacizilor (AATBA), comparativ cu cel al AATMA, efect care ar putea fi atribuit stabilității relative mai mari a complexilor de incluziune formați în cazul AATBA, determinată de volumul mai mare și hidrofobia mai accentuată a cationului ($N^+(C_4H_9)_4$).

Se poate observa rolul concentrațiilor celor două componente ale selectorului chiral, ciclodextrină și lichid ionic asupra rezoluțiilor separărilor. S-a lucrat cu concentrații între 5 mM și 15 mM de ciclodextrină și s-a constatat, că, în general, rezoluțiile separărilor cresc cu creșterea concentrației în ciclodextrină. De asemenea, pentru o concentrație dată de ciclodextrină (15 mM), de cele mai multe ori, creșterea concentrației lichidului ionic LeuTBA favorizează separările (rezoluțiile cele mai mari obținându-se pentru raportul echimolecular 15 mM ciclodextrină: 15 mM LeuTBA), în timp ce creșterea concentrației de HisTBA defavorizează enantioselectivitatea separărilor (pentru concentrația 15 mM HisTBA se obțin rezoluții mai mici decât pentru separările pentru ciclodextrina singură) prin comparație cu separările cu ciclodextrina singură sau cu sistemul ciclodextrină-hidroxid cuaternar de amoniu. Rezoluțiile separărilor în sistem ciclodextrină: ProTBA sunt intermediare între cele obținute cu ciclodextrină-LeuTBA și ciclodextrină-HisTBA.

Pentru lichidele ionice derivate de la tetrametilamoniu, rezoluțiile separărilor în sistem binar sunt inferioare rezoluțiilor obținute cu lichidele ionice derivate de la tetrabutilamoniu. S-a observat că, de cele mai multe ori lichidul ionic care crește rezoluțiile în sistem binar, este LeuTBA, probabil din cauza faptului că interacțiunile între selectori-analit sunt mai pronunțate.

Potențialul aplicat și temperatura de lucru nu influențează semnificativ separările.

În soluție, **ofloxacina** formează cu ciclodextrinele studiate (β -ciclodextrina, HP β CD) și derivații substituiți ai acesteia complexi de incluziune stabili, cu constante aparente de formare cuprinse între 300 și 1500. Stabilitatea complexilor variază în funcție de pH-ul soluției și de tipul de ciclodextrină: la pH acid (3), stabilitatea complexului cu HP β CD este de aproximativ 4 ori mai mare decât stabilitatea complexului format cu β CD ; în medii neutre, β CD formează complex mai stabil, în timp ce în mediu alcalin (10,5) stabilitatea complexilor este mare și comparabilă (ambele constante aparente de formare sunt mai mari de 1000) [156]. Complexii de incluziune se formează,

cel mai probabil, prin includerea nucleului pirido-benzoxazinic, inclusiv a centrului de chiralitate, ceea ce poate conduce la capacitatea de enantiodiscriminare semnificativă pe care o manifestă derivații substituiți ai β -ciclodextrinei, (în concentrații relativ mari) în separările electroforetice de enantiomeri.

Includerea centrului de chiralitate determină creșterea enantioselectivității în prezența CIL, mai ales în prezența CIL de tip AATBA (LeuTBA).

Pentru **ondansetron**, polaritatea moleculei face puțin probabilă incluziunea în β -ciclodextrină și derivați ai acesteia substituiți cu radicali hidrofobi sau cu polaritate medie. De altfel, literatura de specialitate nu citează date despre complecși de incluziune ai ondansetronului cu ciclodextrinele HP β CD, RAMEB și β CD. Se poate presupune că o parte dintre interacțiunile dintre ondansetron și ciclodextrină sunt externe, deci cu un potențial redus de enantiodiscriminare. Lichidele ionice sunt incluse în ciclodextrină, mai ales prin cation (cu polaritate mai mică), astfel că anionul chiral rămâne expus și disponibil pentru interacțiunea cu enantiomerii ondansetronului. Astfel se explică rezoluțiile mai mari obținute, de regulă, în toate separările care folosesc sistem binar CD-AATBA în comparație cu cele obținute folosind ciclodextrina ca selector chiral unic. Este motivul pentru care rezoluțiile obținute în separarea enantiomerilor ondansetronului sunt mici, în foarte puține cazuri (rapoarte echimolare pentru o concentrație de 15 mM din fiecare selector) având valori apropiate de 1; molecula este neinclusă în cavitatea ciclodextrinei, interacțiunile între analit-ciclodextrină sunt exterioare (fără incluziune), iar rezoluțiile cresc la adaosul de LeuTBA (crește numărul de interacțiuni între ciclodextrină-lichid ionic-analit).

Mianserina, conform datelor din literatură formează complecși de incluziune cu ciclodextrinele studiate. În cazul β -ciclodextrinei, cei doi enantiomeri interacționează asemănător, constantele aparente de formare ale complecșilor de incluziune având valori apropiate, atât în stare solidă, cât și în soluție [155]. Interacțiunea se stabilește la nivelul unuia dintre cele două nuclee benzenice, poziția moleculei fiind mai degrabă suspendată deasupra deschiderii mai largi a cavității ciclodextrinei. Formarea complecșilor de incluziune explică separarea completă a enantiomerilor în prezența β ciclodextrinei și a derivaților substituiți ai acesteia. Influența CIL asupra separărilor este modestă și, probabil, mai ales indirectă, printr-un efect steric.

În general, AATMA nu are efect favorabil asupra enantioselectivității separărilor prin metoda electroforetică prezentată mai sus, de aceea, am studiat modul în care aceste lichide ionice modifică enantioselectivitățile separărilor unor amestecuri racemice utilizând alte metode electroforetice.

Separările aminoacizilor prin LECE se obțin pentru un raport molar ProTMA : $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$ 2:1, în prezența unui modificador organic (alcool). Metanolul ca modificador organic permite creșterea enantioselectivității separărilor. Utilizarea alcoolilor cu catenă mai lungă are ca rezultat creșterea valorilor rezoluției, simultan cu creșterea timpului de analiză. Aceasta din urmă se produce din cauza scăderii potențialului ζ prin scăderea constantei dielectrice a alcoolului utilizat.

Nu se obțin separări cu lichidele ionice LeuTMA și HisTMA prin această metodă și nici prin electroforeză capilară în mediu neapos, lichidele ionice nu sunt solubile în formamidă, de aceea în ambele tipuri de metode s-a utilizat lichidul ionic ProTMA.

Separările în mediu neapos demonstrează, de asemenea, că la adaosul de lichid ionic în electrolitul de lucru de formamidă rezoluțiile separărilor enantiomerilor mianserinei în sistem binar cu βCD cresc utilizând concentrații mai mari ale celor doi selectori (60 mM βCD și 90 mM ProTMA).

Scăderea temperaturii de lucru și a potențialului aplicat au o influență mai pronunțată asupra separărilor în mediu neapos comparativ cu separările în mediul apos.

O parte din rezultatele cercetărilor întreprinse în studiile pentru teza de doctorat au fost publicate în reviste de specialitate, atât sub formă de articol tip *review* [56], cât și sub formă de articol de cercetare [57].

Bibliografie selectivă

1. Bentley, R., Diastereoisomerism, contact points, and chiral selectivity a four site saga, *Archives of biochemistry and biophysics*, 2003; 414: p.1-12;
2. Berthod A., Chiral recognition Mechanisms, *Analytical chemistry*, 2006: p. 2093-2099;
3. Nenițescu C. D., *Chimie organică, volumul I*, Editura didactică și pedagogică, București, 1981;
4. Iovu M., *Chimie Organică*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1999;
5. Branch, K. S., *International Regulation of Chiral Drugs*, Subramanian, G., *Chiral Separation Techinques: A Practical Approach*, Second, completely revised and updated edition, Willey-VCH Verlag GmbH, 2001;
6. Berthod A., Ruiz-Angel M. J., Carda-Broch S., Ionic liquids in separation techniques, *Journal of Chromatography A*, 2008; 1184: p. 6–18;
7. Blanco, M., Valverde, I., Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis, *Trends in Analytical Chemistry*, 2003; 20: p. 428-439;
8. Gübitz G., Schmid M. G., Chiral separation by capillary electromigration techniques, *Journal of Chromatography A*, 2008; 1204: p. 140-156;
9. Scriba G., *Chiral Separations. Methods and Protocols*, Second Edition, Humana Press, 2013;
10. Rizzi A., Fundamental aspects of chiral separations by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 2001; 22: p. 3079-3106;
11. Easson L. H., Stedman E., Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action, *Biochemical Journal*, 1933; 27: p. 1257-66;
12. Booth D. T., Wahnnon D., Wainer W. Irving, Is Chiral Recognition a Three-Point Process, *Chirality*, 1997; 9: p. 96-98;
13. Sundaresan V., Abrol R., Biological Chiral Recognition The Substrate's Perspective, *Chirality*, 2005; 17: p. s30-s39;
14. Kafri R., Lancet D., Probabilty rule for Chiral Recognition, *Chirality*, 2004; 16 : p. 369-378;
15. Jozwiak, K., Moaddel R., Ravichandran S., Wainer I., Exploring enantiospecific ligand–protein interactions using cellular membrane Chiral recognition, *Journal of Chromatography B*, 2008; 875: p. 200–207;
16. Li M., Bwambok D., Fakayode S., Warner I., Chiral Ionic Liquids in Chromatographic Separation and Spectroscopic Discrimination , Berthod A., *Chiral Recognition in Separation Methods, Mechanisms and Applications*-Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2010);
17. Tarbell, D., S., The Chemical World of Paul Walden Organic Chemistry from 1880 to 1935, *Journal of Chemical Education*, 1974; vol. 51 nr. 1: p. 7-9;
18. Walden P., Ueber die Molekulargrosse und elektrische Leitfähigkeit einiger geschmolzene, *Bull. Acad. Sci. St. Petersburg*, 1914, p. 405–422;
19. Ding J., Armstrong D., Chiral Ionic Liquids Synthesis and Applications, *Chirality*, 2005; 17: p. 281–292;
20. Niedermeyer H., Hallett J., Villar-Garcia I., Hunt P., Mixtures of ionic liquids, *Chem. Soc. Rev.*, 2012; 41: p. 7780-7802;
21. Ohno H., Fukumoto K., Amino acids ionic liquids, *Accounts of Chemical Research*, 2007; 40: p. 1122–1129;
22. Zhang S. , Jianji W., J. Lu X. , Zhou Q., Structures and Interactions of Ionic Liquids, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014;
23. Bwambok D., Marwani H., Fernand V., Fakayode S., Lowry M., Negulescu I., Strongin R., Warner I., Synthesis and Characterization of Novel Chiral Ionic Liquids and Investigation of their Enantiomeric Recognition Propperties, *Chirality*, 2008; 20: p. 151–158;
24. Rivzi S., Shamsi S., Synthesis, Characterization, and Application of Chiral Ionic Liquids and Their Polymers in Micellar Electrokinetic Chromatography, *Analytical Chemistry*, 2006; 78: p. 7061-7069;
25. Anderson J., Armstrong D., Wei G.-T., Ionic liquids in Analytical Chemistry, *Analytical Chemistry* 2006; 78: p. 2893-2902;
26. Earle M.J., Esperanca J., Gilea M., Lopes J., Rebelo L., Magee L., Seddon K., Widegren J., The distillation and volatility of ionic liquids, *Nature* 2006; 439 (7078): p. 831–834;
27. Øye H., Jagtoyen M., Oksefjell T., Wilkes J., Vapour pressure and thermodynamics of the system 1-methyl-3-ethyl-imidazolium chloride-aluminium chloride, *Trans Tech Publ*; 1991: p. 183–190;
28. Lopez-Pastor M., Simonet B., Lendl B., Valcarcel M., Ionic liquids and CE combination, *Electrophoresis*, 2008; 29: p. 94–107;
29. Dyson, P.,Tilman G., Metal Catalysed Reactions in Ionic Liquids, Ed. Springer, 2005, 29, p.15-40 (Cap. 2 Ionic Liquids - Properties and Preparation);
30. Jiang Y.Y., Wang G.N., Zhou Z., Wu Y.-T., Geng J., Zhang Z.-B., Tetraalkylammonium amino acids as functionalized ionic liquids of low viscosity, *Chem. Commun.*; 2008: p. 505–507;

31. De Rooy S., Li M., Bwambok D., El-Zahab B., Challa S., Warner I., Ephedrinium-Based Protic Chiral Ionic Liquids for Enantiomeric Recognition, *Chirality*, 2011; 23: p. 54–62;
32. Aslanov L. A., Ionic liquids: Liquid structure, *Journal of Molecular Liquids*, 2011;162: p. 101–104;
33. Ye C.F., Shreeve J.M., Rapid and accurate estimation of densities of room-temperature ionic liquids and salts, *J Phys Chem A*, 2007; 111(8): p. 1456–1461;
34. Chen C.C., Simoni L.D., Brennecke J.F., Stadtherr M., Correlation and prediction of phase behavior of organic compounds in ionic liquids using the nonrandom two-liquid segment activity coefficient model, *Ind Eng Chem Res*, 2008; 47(18): p. 7081–7093;
35. Gmehling J., Li J.D., Schiller M., A modified UNIFAC model. 2. Present parameter matrix and results for different thermodynamic properties, *Ind Eng Chem Res*, 1993; 32 (1): p. 178–193;
36. Klamt A., Conductor-like screening model for real solvents – a new approach to the quantitative calculation of solvation phenomena, *J Phys Chem*, 1995; 99(7): p. 2224–2235;
37. Kokorin A., *Ionic Liquids: Theory, Properties, New Approaches*, Ed. InTech, 2011;
38. Dupont J., Suarez P., De Souza R., Burrow R., Kintzinger J.-P., C-H- π Interactions in 1-n-Butyl-3-methylimidazolium Tetraphenylborate: Molten Salts Solid and Solution Structures, *Chem. Eur. J.*, 2000; 6, Nr. 13: p. 2377-2381;
39. Leclerc L., Suisse I., Nowogrocki G., Agbossou-Niedercorn F., On the solid state inclusion of tetrabutylammonium cation in the imidazolium-trifluoromethanesulfonate H-bonds network observed in ionic co-cristals, *Journal of Molecular Structure*, 2008; 892: p. 433-437;
40. Dupont, J., On the Solid, Liquid and Solution Structural organization of Imidazolium Ionic Liquids, *Journal of Brazilian Chemical Society*, 2004; vol 15, nr. 3: p. 341-350;
41. Leclerc L., Schmitzer R., Multiple Equilibria in the Complexation of Dibenzylimidazolium Bromide Salts by Cyclodextrins: Toward Controlled Self-Assembly, *Journal of Physical Chemistry B*; 2008, 112: p. 11064-11070;
42. François Y., Zhang K., Varenne A., Gareil P., New integrated measurement protocol using capillary electrophoresis instrumentation for the determination of viscosity, conductivity and absorbance, *Analytica Chimica Acta*, 2006; 562: p. 164–170;
43. Wang P., Zakeeruddin S.M., Moser J.E., Grätzel M., A new ionic liquid electrolyte enhances the conversion efficiency of dye-sensitized solar cells, *J Phys Chem B*, 2003; 107(48): p. 13280–13285;
44. Holbrey J.D., Heat capacities of common ionic liquids – potential applications as thermal fluids?, *Chim Oggi-Chem Today*, 2007 25(6): p. 24–26;
45. França J.M.P., De Castro C.A.N., Lopes M.M., Nunes V., Influence of thermophysical properties of ionic liquids in chemical process design, *J Chem Eng Data*, 2009; 54(9): p. 2569–2575;
46. Moens L., Blake D.M. Rudnicki D.L., Hale M. J., Advanced thermal storage fluids for solar parabolic trough systems, *J Sol Ener Eng Trans-ASME*, 2003; 125(1): p. 112–116;
47. Van Valkenburg M.E., Vaughn R.L., Williams M., Hale M.J., Thermochemistry of ionic liquid heat-transfer fluids, *Thermochim Acta*, 2005; 425 (1–2): p. 181–188;
48. Pandey S., Analytical applications of room-temperature ionic liquids: a review of recent efforts, *Anal Chim Acta*, 2006; 556(1): p. 38–45;
49. Visser A.E., Swatoski R.P., Reichert W.M., Mayton R., Sheff, S., Wierzbicki A., Davis, Jr. J., Rogers R., Task-specific ionic liquids for the extraction of metal ions from aqueous solutions, *Chem Commun* 2001;1: p. 135–136;
50. Tang F. Qianli Zhang Q., Ren D., Nie Z., Liu Q., Yao S. , Functional amino acid ionic liquids as solvent and selector in chiral extraction, *Journal of Chromatography A*, 2010; 1217: p. 4669–4674;
51. Swatoski R.P., Spear S.K., Holbrey J.D., Rogers R., Dissolution of cellulose with ionic liquids, *J Am Chem Soc*, 2002; 124 (18): p. 4974–4975;
52. Li Z.H., Luan Y.X., Mu T.C., Chen G., Unusual nanostructured ZnO particles from an ionic liquid precursor, *Chem Commun*, 2009; 10: p. 1258–1260;
53. Li Z.H., Jia Z., Luan Y.X., Mu T., Chen G., Ionic liquids for synthesis of inorganic nanomaterials, *Curr Opin Solid State, Mater Sci*, 2009; 12(1): p. 1–8;
54. Kapnissi-Christodoulou C., Stavrou I., Mavroudi M., Chiral ionic liquids in chromatographic and electrophoretic separations, *Journal of Chromatography A*, 1363; 2014: p. 2–10;

55. Zeng H. L., Shen H., Nakagama T., Uchiyama K., Property of ionic liquid in electrophoresis and its application in chiral separation on microchips, *Electrophoresis*, 2007; 28: p. 4590–4596;
56. Stănescu M., Aramă C., Monciu C.-M., Chiral ionic liquids in chiral electrophoretical applications, *Farmacia*, 2015, Vol. 63, 5: p. 623-630;
57. Stănescu M., Monciu C.-M., Nițulescu M., Drăghici C., Doicin I., Lupașcu G., Lupu A., Aramă C., Amino acids based chiral ionic liquids for enantiomer separation by capillary electrophoresis, *Farmacia*, 2017, Vol. 65, 1: p. 46-55;
58. Earle M.J., McCormac P.B., Seddon K.R., Diels – Alder reactions in ionic liquids: a safe recyclable alternative to lithium perchlorate – diethylether mixtures, *Green Chem* 1999;1: p. 23 – 25;
59. Zahn S. Kirchner B., Uncovering molecular secrets of ionic liquids, *Chem. Modell.*, 2012; 9: p. 1-24;
60. Payagala, T., Armstrong, D., Chiral Ionic Liquids A Compendium of Syntheses and Applications (2005-2012), *Chirality*, 2012; 24: p. 17–53;
61. Patil, M., Sasai H., Recent Developments on Chiral Ionic Liquids Design, Synthesis and Applications, *The Chemical Record*, 2008; Vol. 8: p. 98–108;
62. Tao G.-H., He L., Liu W., Xu L., Xiong W., Wang T., Kou Y., Preparation, characterization and application of amino acid-based green ionic liquids, *Green Chem.*, 2006; 8: p. 639–646;
63. Dzygiel P., Reeve T., Piarulli U., Krupicka M., Tvaroska I., Gennari C., Resolution of Racemic N-Benzyl α -Amino Acids by Liquid-Liquid Extraction: A Practical Method Using a Lipophilic Chiral Cobalt(III) Salen Complex and Mechanistic Studies, *C. Eur. J. Org. Chem.*, 2008; 7: p. 1253-1264;
64. Zgonnik V., Reeve T., Piarulli U., Krupicka M., Tvaroska I., Gennari C., Design and Scalable Synthesis of New Chiral Selectors. Part 2 Chiral Ionic Liquids Derived from Diaminocyclohexane and Histidine, *Organic Process Research and Development*, 2012; 16: p. 277–285;
65. Gao H.-S., Hu Z.-G., Wang J.-J., Qiu Z.-F., Fan F.-Q., Synthesis and properties of novel chiral ionic liquids from L-proline, *Aust J Chem*, 2008; 61: p. 521–525;
66. Ishida Y., Miyauchi H., Saigo K., Design and synthesis of a novel imidazolium-based ionic liquid with planar chirality, *Chem Commun*, 2002 : p. 2240–2241;
67. Levillain J., Dubant G., Abrunhosa I., Synthesis and properties of thiazoline based ionic liquids derived from the chiral pool, *Chem Commun*, 2003: p. 2914–2915;
68. Patil M.L., Rao C.V.L., Yonezawa K., Design and synthesis of novel chiral spiro ionic liquids, *Org Lett*, 2006: p. 227–230;
69. Wassercheid P., Boesmann A., Bolm C., Synthesis and properties of ionic liquids derived from the “chiral pool”, *Chem Commun*, 2002, p. 200–201;
70. Ishida Y., Sasaki D., Miyauchi H., Saigo K., Design and synthesis of novel imidazoliumbased ionic liquids with a pseudo crown-ether moiety: diastereomeric interaction of a racemic ionic liquid with enantiopure europium complexes, *Tetrahedron Lett*, 2004: p. 9455–9459;
71. Yu S., Lindeman S., Tran C., Chiral Ionic Liquids Synthesis, Properties, and Enantiomeric Recognition , *J. Org. Chem.* 2008; 73: p. 2576-2591;
72. Tran C. D., de Paoli Lacerda S. H., Determination of Binding Constants of Cyclodextrins in Room-Temperature Ionic Liquids by Near-Infrared Spectrometry, *Analytical Chemistry* 2002; 74: p. 5337-5341;
73. Tran C., Oliveira D., Yu S., Chiral Ionic Liquid that Functions as Both Solvent and Chiral Selector for the Determination of Enantiomeric Compositions of Pharmaceutical Products, *Analytical Chemistry*, 2006; 78: p. 1349-1356;
74. Tran C., Oliveira D., Fluorescence determination of enantiomeric composition of pharmaceuticals via use of ionic liquid that serves as both solvent and chiral selector, *Analytical Biochemistry*, 2006; 356: p. 51–58;
75. Adhikary R., Bose S., Mukherjee P., Thite, A., Kraus, G., Wieratne A., Sharma P., Armstrong D., Petrich J., Influence of Chiral Ionic Liquids on the Excited-State Properties of Naproxen Analogs, *J. Phys. Chem. B*, 2008; 112: p.7555-7559;
76. Bose, S., Wijeratne, A., Thite, A., Kraus, G., Armstrong, D., Influence of Chiral Ionic Liquids on Stereoselective Fluorescence Quenching by Photoinduced Electron Transfer in a Naproxen Dyad, *J. Phys. Chem. B*, 2009; 113: p. 10825–10829;
77. Tran C., Yu S., Spectroscopic Investigations of Solvent Effect on Chiral Interactions, *J. Phys. Chem. B*, 2005; 109: p. 12627-12635;
78. Kroupa D., Brown C., Heckman L., Hopkins T., Chiroptical Study of Chiral Discrimination by Amino Acid Based Ionic Liquids, *Journal of Physical Chemistry B*, 2012; 116, p. 4952–4958;
79. Allen C., Richard P., Ward A., Van De Water L., Masters A., Maschmeyer T., Facile synthesis of ionic liquids possessing chiral carboxylates, *Tetrahedron Letters*, 2006; 47: p.7367–7370;

80. Guillen F., Bregeon D., Plaquevent J.-C., (S) - Histidine the ideal precursor for a novel family of chiral amino acid and peptidic ionic liquids, *Tetrahedron Letters*, 2006; 47: p. 1245–1248;
81. Ni, B., Garre S., Headley A. D., Design and synthesis of fused-ring chiral ionic liquids from amino acid derivatives, *Tetrahedron Letters*, 2007; 48: p. 1999–2002;
82. Fukumoto K., Masahiro Y., Ohno H., Room temperature ionic liquids from 20 Natural Amino Acids, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005; 127: p. 2398–2399;
83. Muhammad N., Man Z., Bustam M., Mutalib M., Wilfred C., Rafiq S., Synthesis and Thermophysical Properties of Low Viscosity Amino Acid-Based Ionic Liquids, *Journal of Chemical Engineering & Data*, 2011; 56: p. 3157–3162;
84. Ni B., Headley A., Li G., Design and Synthesis of C-2 Substituted Chiral Imidazolium Ionic Liquids from Amino Acid Derivatives, *J. Org. Chem.*, 2005; 70: p. 10600–10602;
85. Ni B., Headley A. D., Novel imidazolium chiral ionic liquids that contain a urea functionality, *Tetrahedron Letters*, 2006; 47: p. 7331–7334;
86. Wang Z., Wang Q., Zhang Y., Bao W., Synthesis of new chiral ionic liquids from natural acids and their applications in enantioselective Michael addition, *Tetrahedron Letters*, 2005; 46: p. 4657–4660;
87. Patil M., Rao Laxman C.V., Takizawa S., Takenaka K., Onitsuka K., Synthesis of novel spiro imidazolium salts as chiral ionic liquids, *Tetrahedron*, 2007; 63: p. 12702–12711;
88. Yoshida Y., Takizawa S., Sasai H., Synthesis of spiro bis(1,2,3-triazolium) salts as chiral ionic liquids, *Tetrahedron Letters*, 2011; 52: p. 6877–6879;
89. Poletti L., Chiappe C., Lay L., Pieraccini D., Polito L., Russo G., Glucose-derived ionic liquids: exploring low-cost sources for novel chiral solvents, *Green Chem* 2007; 9: p. 337–341;
90. Van Buu O.N., Vo-Thanh G., Synthesis of Novel Chiral Ammonium-Based Ionic Liquids Derived from Isosorbide and their Applications in an Asymmetric Aza Diels-Alder Reaction, *Lett Org Chem*, 2007; 4: p. 158–167;
91. Zhang Q., Du Y., Du S., Zhang J., Feng Z., Zhang, Y., Li X., Tetramethylammonium-lactobionate: a novel ionic liquid chiral selector based on saccharides in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 2015; 36, (9-10): p. 1216–1223;
92. Matos, R. A., Andrade, C.K., Synthesis of new chiral ionic liquids based on (-)-menthol and (-) borneol, *Tetrahedron Letters*, 2008; 49: p. 1652–1655;
93. Pernak J., Feder-Kubis J., Cieniecka-Roslonkiewicz A., Fischmeister C., Griffin S.T., Rogers R.D., Synthesis and properties of chiral imidazolium ionic liquids with a (1R,2S,5R)-(-)-menthoxyethyl substituent, *New J. Chem.* 2007; 31: p. 879–892;
94. Ni B., Zhang Q., Headley A. D., Design and Synthesis of Pyridinium Chiral Ionic Liquids Tethered to a Urea Functionality, *J Org Chem*, 2006; 71: p. 9857–9860;
95. Ni B., Zhang Q., Headley A.D., Pyrrolidine-based chiral pyridinium ionic liquids (ILs) as recyclable and highly efficient organocatalysts for the asymmetric Michael addition reactions, *Tetrahedron Lett*, 2008; 49: p. 1249–1252;
96. Wang L.-J., Hu S.-H., Guo Q.-L. Yang G.-L., Chen X.-G., Di-n-amyl L-tartrate-boric acid complex chiral selector in situ synthesis and its application in chiral NACE, *Journal of Chromatography A*, 2011; 1218: p. 1300–1309;
97. Duchêne, D., Cyclodextrins and their inclusion complexes, Bilensoy E., *Cyclodextrins in pharmaceuticals, cosmetics and biomedicine. Current and Future Industrial Applications*, Ed. John Wiley and Sons, 2011;
98. Loftsson T., Hreinsdóttir D., Masson M., Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 2005; 302: p. 18–28;
99. Zhou Z., Li X., Chen X., Hao X., Synthesis of ionic liquids functionalized β -cyclodextrin-bonded chiral stationary phases and their applications in high-performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 2010; 678: p. 208–214;
100. Huang K., Zhang X., Armstrong, D., Ionic cyclodextrins in ionic liquid matrices as chiral stationary phases for GC, *Journal of Chromatography A*, 2010; 1217: p. 5261–5273;
101. Kuhn R., Hoffstetter-Kuhn, *Capillary electrophoresis. Principles and Practice*. Springer Verlag, 1993;
102. Hammistzsch-Wiedemann M., Scriba K.E., Mathematical Approach by a Selectivity Model for Rationalization of pH- and Selector Concentration-Dependent Reversal of the Enantiomer Migration Order in Capillary Electrophoresis, *Analytical Chemistry*, 2009; 81: p. 8765–8773;

103. Lelièvre, F., Gareil, P., Selectivity in Capillary Electrophoresis: Application to Chiral Separations with Cyclodextrins, *Analytical Chemistry*, 1997; 69: p. 385-392;
104. Chankvetadze B., Lindner W., Scriba G., Enantiomer separations in Capillary Electrophoresis in Case of Equal Binding Constants of the enantiomers with a chiral selector: Comment of the feasibility of the Concept, *Analytical Chemistry*, 2004; 76: p. 4256-4260;
105. Williams, B.A., Vigh, G., Dry look at CHARM (charged resolving agent migration) model of enantiomer separations by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 1997; 777: p. 295-309;
106. Preinerstorfer B., Lämmerhofer M., Lindner W., Advances in enantioselective separations using electromigration capillary techniques, *Electrophoresis*, 2009; 30: p. 100-132;
107. Tang S., Liu S., Guo Y., Liu X., Jiang S., Recent advances of ionic liquids and polymeric ionic liquids in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 2014; 1357: p. 147-157;
108. Maier V., Horakova J., Petr J., Sevcik J., Using of S(-)-2-hydroxymethyl-1,1-dimethylpyrrolidinium tetrafluoroborate as additive to the background electrolyte in capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 2006; 1103: p. 337-343;
109. Stavrou I., Kapnissi-Christodoulou C., Use of chiral amino acid ester-based ionic liquids as chiral selectors in CE, *Electrophoresis*, 2013; 34: p. 524-530;
110. Mavroudi M. C., Kapnissi-Christodoulou C., Evaluation of amino acids ester-based ionic liquids as buffer additives in CE for the separation of 2-arylpropionic acids nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Electrophoresis*, 2014; 35: p. 2573-2578;
111. Yu J., Zuo L., Liu H., Zhang L., Guo X., Synthesis and application of a chiral ionic liquid functionalized β -cyclodextrin as a chiral selector in capillary electrophoresis, *Biomedical Chromatography*, 2013; 27, (8): p. 1027-1033;
112. Kapnissi K., Vallée B., Warner, I., Chiral Separations Using Polymeric Surfactants and Polyelectrolyte Multilayers in Open-Tubular Capillary Electrochromatography, *Analytical Chemistry*, 2003; 75: p. 6097-6104;
113. Yuan, L. M., Han Y., Zhou Y., Meng X., Li Z., Zi M., Chang Y.X., (R)-N,N,N-Trimethyl-2-Aminobutanol-Bis(Trifluoromethane-Sulfon)Imidate CIL Used as Chiral Selector in HPCE, HPLC, CGC, *Analytical Letters*, 2006; 39: p. 1439-1449;
114. Liu Y., Shamshi S., Combined use of chiral ionic liquid surfactants and neutral cyclodextrins, *Journal of Chromatography A*, 2014; 1360: p. 296-304;
115. Wang B., He J., Bianchi V., Shamsi S., Combined use of chiral ionic liquid and cyclodextrin for MEKC: Part I. Simultaneous enantioseparation of anionic profens, *Electrophoresis*, 2009; 30: p. 2812-2819;
116. Wang B., He J., Bianchi V., Shamsi S., Combined use of chiral ionic liquid and CD for MEKC: Part II. Determination of binding constants, *Electrophoresis*, 2009; 30: p. 2820-2828;
117. Yujiao W., Guoyan Z., Wenyan Z., Hongfen J., Huangwang J., Anija C., Chiral separation of phenylalanine and tryptophan by capillary electrophoresis using a mixture of β -CD and chiral ionic liquid ([TBA][L-ASP]) as selectors, *Biomed. Chromatogr.* 2014; 28: p. 610-614;
118. Zhang J., Du Y., Zhang Q., Chen J., Xu G., Yu T., Hua X., Investigation of the synergistic effect with amino acid-derived chiral ionic liquids as additives for enantiomeric separation in capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 2013; 1316: p.119-126;
119. Zhang Y., Yu H., Wu Y., Zhao W., Yang M., Jing H., Chen A., Combine use of [TBA][L-ASP] and hydroxypropyl- β -cyclodextrin as selectors for separation of Cinchona alkaloids by capillary electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, 462; 2014: p. 13-18;
120. Zhang Q., Du Y., Evaluation of the enantioselectivity of glycogen-based synergistic system with amino acid chiral ionic liquids as additives in capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 1306; 2013: p. 97-103;
121. Zhang J., Du Y., Zhang Q., Lei Y., Evaluation of vancomycin-based synergistic system with amino acid ester chiral ionic liquids as additives for enantioseparation of non-steroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis, *Talanta*, 2014; 119: p. 193-201;
122. Xu G., Du Y., Du F., Chen J., Yu T., Zhang Q., Zhang J., Du S., Feng J., Establishment and Evaluation of the Novel Tetramethylammonium-L-Hydroxyproline Chiral Ionic Liquid Synergistic System Based on Clindamycin Phosphate for Enantioseparation by Capillary Electrophoresis, *Chirality*, 2015; 27: p. 598-604;
123. Cui Y., Ma X., Zhao M., Jiang Z., Xu S., Guo X., Combined Use of Ionic Liquid and Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin for the Enantioseparation of Ten Drugs by Capillary Electrophoresis, *Chirality*, 2013; 25: p. 409-414;
124. Zhao M., Cui Y., Yu J., Xu S., Guo X., Combined use of hydroxypropyl- β -cyclodextrin and ionic liquids for the simultaneous enantioseparation of four azole antifungals by CE and a study of the synergistic effect, *Journal of Separation Science*, 2014; 37: p. 151-157;

125. Zuo L., Meng H., Wu J., Jiang Z., Xu S., Guo X., Combined use of ionic liquid and β -CD for enantioseparation of 12 pharmaceuticals using CE, *J. Sep. Sci.*, 2013; 23: p. 517–523;
126. François Y., Varenne A., Juillerat E., Villemain D., Gareil P., Evaluation of chiral ionic liquids as additives to cyclodextrins for enantiomeric separations by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 2007, 1155: p. 134–141;
127. Mofaddel N., Krajian H., Villemain D., Desbène P.L., Enantioseparation of binaphthol and its mono derivatives by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 2008; 1211: p. 142–150;
128. Tran C. D., Mejac I., Chiral ionic liquids for enantioseparation of pharmaceutical products by CE, *Journal of Chromatography A*, 2008; 1204: p. 204–209;
129. Zhang Q., Qi X., Feng C., Tong S., Rui M., Three chiral ionic liquids as additives for enantioseparation in capillary electrophoresis and their comparison with conventional modifiers, *J. Chromatogr. A*, 2016;1462: p. 146–152;
130. Zhang Y., Du S., Feng Z., Du Y., Yan Z.; Evaluation of synergistic enantioseparation systems with chiral spirocyclic ionic liquids as additives by capillary electrophoresis, *Anal. Bioanal. Chem.* 2016; 408: p. 2543–2555;
131. Stavrou I., Breitbach Z., Kapnissi Christodolou C., Combined use of cyclofructans and an amino acid ester-based ionic liquid for the enantioseparation of huperzine A and coumarin derivatives in CE, *Electrophoresis*, 2015; 36: p. 3061–3068;
132. Schmid M.G., Chiral metal-ion complexes for enantioseparation by capillary electrophoresis and capillary electrochromatography: A selective review, *Journal of Chromatography A*, 2012; 1267: p. 10–16;
133. Wren, S., 1) Enantiomers and separation, *Chromatographia Supplement vol. 54*, jan. 2001, S7–S14;
134. Wren, S., 2) The principles of separations in CE, *Chromatographia Supplement vol. 54*, jan. 2001, S15–S23 ;
135. Wren, S. 3) Modelling enantiomer separation in CE, *Chromatographia Supplement vol. 54*, jan. 2001, S24–S41;
136. Mu X. Qi L., Shen Y., Zhang, H., Qiao J., Ma H., A novel chiral ligand exchange capillary electrophoresis system with amino acid ionic liquid as ligand and its application in screening D-amino-acid oxidase inhibitors, *Analyst*, 2012; 137: p. 4235–4240;
137. Sun B., Mu X., Qi L., Development of new chiral ligand exchange capillary electrophoresis system with amino acid ionic liquids ligands and its application in studying the kinetics of L-amino acid oxidase, *Analytica Chimica Acta*, 2014; 821: p. 97–102;
138. Su Y., Mu X., Qi L., Development of a capillary electrophoresis system with Mn (II) complexes and β -cyclodextrin as the dual chiral selectors for enantioseparation of dansyl amino acids and its application in screening enzyme inhibitors, *RSC Adv.*, 2015; 5: p. 28762–28768;
139. Liu Q., Wu X., Tang F., Yao L., Yang F., Nie Z., Yao S., Amino Acid Ionic Liquids as Chiral Ligands in Ligand-Exchange Chiral Separations, *Chem. Eur. J.*, 2009; 15: p. 9889 – 9896;
140. Zhang H., Qi L., Shen Y., Qiao J., Mao L., L-Lysine-derived ionic liquids as chiral ligands of Zn(II) complexes used in ligand-exchange CE, *Electrophoresis*, 2013; 34: p. 846–853;
141. Qi L., Han Y., Zuo M., Chen Y., Chiral CE of aromatic amino acids by ligand-exchange with zinc(II)–L-lysine complex, *Electrophoresis*, 2007; 28: p. 2629–2634;
142. Liu R., Du Y., Chen J., Zhang Q., Du S., Feng Z., Investigation of the Enantioselectivity of Tetramethylammonium L-hydroxyproline Ionic Liquid as a Novel Chiral Ligand in Ligand-Exchange CE and Ligand-Exchange MEKC, *Chirality*, 2015; 27: p. 58–63;
143. Mu X., Qi L., Zhang H., Shen Y., Qiao J., Ma H., Ionic liquids with amino acids as cations: Novel chiral ligands in chiral ligand-exchange capillary electrophoresis, *Talanta*, 2012; 97: p. 349–354;
144. Oprean R., Servais A.C., Bodoki E., Oprean L., Rus L., Săndulescu R., Crommen J. Hubert P.H., Enantioseparation of chiral drugs by capillary zone electrophoresis in non-aqueous media, Propranolol enantiomers discrimination, *Farmacia*, 2007; 55(2): p. 244–250;
145. Purdel N. C., Bălălaşu D., Ilie M., Aramă C., Determination of venlafaxine toxic levels from human serum by non-aqueous capillary electrophoresis, *Farmacia*, 2010, 58(1): p. 62–69 ;
146. Wang F., Khaleli G. M., Chiral Separation by Nonaqueous Capillary Electrophoresis, *Analytical Chemistry*, 1996; 68: p. 3460–3476;
147. Lämmerhofer M., Chiral separations by capillary electromigration techniques in nonaqueous media I. Enantioselective nonaqueous capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 2005; 1068: p. 3–30;
148. Ma Z., Zhang L., Lin L., Ji P., Guo X., Enantioseparation of rabepazole and omeprazole by nonaqueous capillary electrophoresis with an ephedrine-based ionic liquid as the chiral selector, *Biomedical Chromatography*; 2010; 24, (12): p. 1332–1337;
149. Ding J., Welton T., Armstrong D., Chiral Ionic Liquids as Stationary Phases in Gas Chromatography, *Analytical Chemistry*, 2004; 76: p. 6819–6822;

150. Rousseau A., Florence X., Pirotte B., Varenne A., Gareil P., Villemin D., Chiap P., Crommen J., Filet M., Servais A.-C., Development and validation of a nonaqueous capillary electrophoretic method for the enantiomeric purity determination of a synthetic intermediate of new 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyrans using a single-isomer anionic cyclodextrin derivative and an ionic liquid, *Journal of Chromatography A*, 2010; 1217: p. 7949–7955;
151. François Y., Varenne A., Sirieix-Plenet, J., Gareil P., Determination of aqueous inclusion complexation constants and stoichiometry of alkyl(methyl)-methylimidazolium-based ionic liquid cations and neutral cyclodextrins by affinity capillary electrophoresis, *J. Sep. Sci.*, 2007; 30: p. 751-760;
152. Mofaddel N., Fourmentin S., Guillen F., Landy D., Gouhier G., Ionic liquids and cyclodextrin inclusion complexes: limitation of the affinity capillary electrophoresis technique, *Anal Bioanal Chem*, 2016; 408: p. 8211-8220;
153. Mendes A., Branco L., Morais C., Simplicio A. L., Electroosmotic flow modulation in capillary electrophoresis by organic cations from ionic liquids, *Electrophoresis*, 2012; 33, p. 1182-1190;
154. Chankvetadze B., Endresz G., Bergenthal D., Blaschke G., Enantioseparation of mianserine analogues using CE with neutral and charged CD buffer modifiers ¹³C NMR of the chiral recognition study, *Journal of Chromatography A*, 1995; 717: p. 245-253;
155. Ignaczak A., Bartłomiej Pałecz B., Belica-Pacha S., Quantum chemical study and isothermal titration calorimetry of β -cyclodextrin complexes with mianserin in aqueous solution, *Org. Biomol. Chem.*, 2017; 15: p. 1209-1216;
156. Li J., Zhang X., Preparation and characterization of the inclusion complex of Ofloxacin with β -CD and HP- β -CD, *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 2011; 69: p. 173–179;
157. Cristea A. N., *Tratat de farmacologie*, Ediția I, Editura Medicală, București, 2009;
158. Moffat A. C., Osselson M. D., Widdop B., *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons* 4th ed. - (Pharma. Press, 2011) BBS;
159. Suliman F. E., Elbashir A., Schmitz O., Study on the separation of ofloxacin enantiomers by hydroxylpropyl- β -cyclodextrin as a chiral selector in capillary electrophoresis: a computational approach, *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 2015; 83: p. 119–129;
160. Jiang Z., Thorogate R., Smith N.W., Highlighting the role of the hydroxyl position on the alkyl spacer of hydroxypropyl- β -cyclodextrin for enantioseparation in capillary electrophoresis, *J. Sep. Sci.*, 2008; 31: p. 177 – 187
161. Toth G., Mohacsi R., Racz A., Rusu A., Horvath P., Szente L., Beni S., Noszal B., Equilibrium and structural characterization of ofloxacin–cyclodextrin complexation, *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 2013; 77: p. 291–300;
162. Szekely-Szentmiklosi B., Tokes B., Study of ofloxacin-random methylated- β -cyclodextrin inclusion complex, *Farmacia* 2016; 64(1): p. 147-151;
163. Siluveru M., Stewart J., Enantioselective determination of S-(+)- and R-(-)-ondansetron in human serum using derivatized cyclodextrin-modified capillary electrophoresis and solid-phase extraction, *Journal of Chromatography B*, 1997; 691: p. 217-222;
164. Ren X., Huang A., Wang T., Sun Y., Sun Z., Enantiomeric separation of three chiral drugs by nonaqueous capillary electrophoresis with triethylamine as additive, *Chromatographia*, 1999; 50, p. 625–628;
165. Eap, C., Powell K., Baumann P., Determination of the enantiomers of Mianserin and its metabolites in plasma by capillary electrophoresis after liquid-liquid extraction and on-column sample preconcentration, *Journal of Chromatographic Science*, 1997; 35: p. 315-320;
166. Seracu D., *Îndreptar de chimie analitică*, Editura Tehnică, București, 1989;
167. Chen Z., Weber S., Determination of binding constants by affinity capillary electrophoresis, electrospray ionization mass spectrometry and phase-distribution methods, *Trends Analyt Chem* 2008; 27(9): p. 738–748