

# Orgaaniset liuottimet kapillaarielektroforeesissa

Pro gradu-tutkielma  
Jyväskylän yliopisto  
Kemian laitos  
Epäorgaanisen ja analyttisen  
kemian osasto  
19.8.2007  
Anna Korpelainen

## TIIVISTELMÄ

Orgaanisia liuottimia käytettiin ensimmäisen kerran kapillaarielektroforeesissa 1980-luvun puolessa välissä. Siitä lähtien kiinnostus niitä kohtaan on noussut valtavasti. Yhä edelleen vedettömän kapillaarielektroforeesin (NACE) käyttöä kuitenkin rajaa vähäinen tieto liuottimien ominaisuuksista ja analyyttien käyttäytymisestä niissä. Tähän tutkimukseen on koottu tietoa yleisimmistä käytetyistä liuottimista (asetonitriili, metanoli, etanoli, propanoli, butanoli formamidi, N-metyyliformamidi, N,N-dimetyyliformamidi, N,N-dimetyyliasetamidi) sekä muutamasta harvinaisemmasta liuottimesta (dimetyylisulfoksidi, nitrometaani, propyleenikloridi ja tetrahydrofuraani) sekä niiden vaikutuksesta erottumiseen. Lisäksi NACE:a on verrattu vedelliseen kapillaarielektroforeesiin.

Liuottimen ominaisuuksista hyvinä ominaisuuksina mainittiin korkea dielektrisyysvakio (formamidi), alhainen viskositeetti (asetonitriili) sekä luovuttaja- ja vastaanottajaluvut (N-metyyliformamidilla hyvä luovuttajaluku ja metanolilla vastaanottajaluku). Liuottimet jaettiin niiden ominaisuuksien perusteella joko amfiproottisiin (pystyvät autoprotolyysiin) tai aproottisiin (pystyvät vain luovuttamaan elektroneja). Liuottimien ominaisuuksia pystyttiin parantamaan erilaisilla elektrolyyttilisillä, joista karboksyylihapot ja niiden suolat olivat yleisimpiä toimien liuoksen puskurina. Myös ioninesteiden käyttö elektrolyyttilisinä todettiin mahdolliseksi. Kiraalisten yhdisteiden erottaminen mahdollistettiin erilaisilla kiraalisilla selektoreilla (syklodekstriinit). Sovelluksia selvitettiin varauksellisille, neutraaleille ja kiraalisille yhdisteille.

Liuoksen pH-arvon selvittäminen on ongelmallista orgaanisissa liuottimissa, kun pH-mittauksissa käytetään yleisesti vesiliuoksellisia lasielektrodeja ja puskureita. Kuitenkin näin mitattuja  $pH_{app}$ -arvoja on käytetty yleisesti NACE:ssa. Tutkimuksessa tutustuttiin uuteen hyväksi havaittuun menetelmään, jossa pH lasketaan hapon ja sen suolan avulla.

Vertailtaessa vedellisiä ja vedettömiä olosuhteita NACE:n huomattiin kasvattavan analyttien emäsvahvuutta sekä pH-mittausaluetta. Myös veteen liukenemattomien yhdisteiden erottuminen mahdollistui. Muutoin vedellisissä olosuhteissa saatettiin jopa saada parempia tuloksia varsinkin teoreettisin perustein, ja NACE:n ylivoimaisuuteen vedellisiä olosuhteita kohtaan kannattaakin suhtautua kriittisesti.

## ESIPUHE

Kirjallisuustutkimus tehtiin 2006 syksyn sekä 2007 kevään ja kesän aikana Jyväskylän yliopistossa Kemian laitoksella Epäorgaanisen ja analyttisen kemian osastolla. Kirjallisuus työhön etsittiin SciFinder Scholar –hakuohjelman, internetistä Google-hakuohjelman sekä erillisten lehtien hakujen avulla. Hakusanoina käytettiin mm. aqueous capillary electrophoresis, nonaqueous capillary electrophoresis, buffers, ionic fluids ja organic solvents.

Työn ohjaajana toimi Rose Matilainen, jota haluan mitä nöyrimmin kiittää tuesta, kannustuksesta ja kärsivällisyydestä. Haluan kiittää myös toista pro gradun tarkastajaa Pirkko-Leena Laamasta, joka ohjasi myös erikoistyöni. Hänen panostuksensa loppuvaiheen opintoihini oli korvaamatonta.

Kaikille ystäväilleni kuuluu kiitos kannustamisesta kerta toisensa jälkeen. Te saitte minut jaksamaan. Haluan kiittää vanhempiani mittaamattomasta kärsivällisyydestä. Ilman äitiäni, joka käytti kesälomansa Alvarin hoitamiseen sekä minun patistamiseen gradun valmistumiseksi, en olisi tässä nyt. Ennen kaikkea haluan kuitenkin kiittää aviomiestäni Jarkkoa sekä lastani Alvaria. Te olette parasta maailmassa.

Jyväskylässä 19.8.2007

Anna Korpelainen

# SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ.....	i
ESIPUHE .....	ii
SISÄLLYSLUETTELO .....	iii
KÄYTETYT LYHENTEET.....	v
<b>1. JOHDANTO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LIUOTTIMIEN OMINAISUUKSIA .....</b>	<b>2</b>
2.1 PINTAJÄNNITYS.....	2
2.2 AUTOPROTOLYYSIVAKIO.....	3
2.3 VISKOSITEETTI .....	3
2.4 DIELEKTRISYYSVAKIO.....	3
2.5 LUOVUTTAJA- JA VASTAANOTTAJALUVUT .....	4
2.6 POLAARISUUS.....	4
2.7 DIPOLIMOMENTTI.....	4
<b>3. LIUOTTIMET.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1 APROOTTISET LIUOTTIMET .....</b>	<b>5</b>
3.1.1 Asetonitrili.....	5
3.1.2 Propyleenikarbonaatti .....	5
3.1.3 Dimetyylisulfoksidi .....	6
3.1.4 Tetrahydrofuraani.....	6
3.1.5 N,N-dimetyyliformamidi ja N,N-dimetyyliasetamidi.....	6
3.1.6 Nitrometaani.....	6
<b>3.2 AMFIPROOTTISET LIUOTTIMET .....</b>	<b>7</b>
3.2.1 Alkoholit.....	7
3.2.1.1 Metanoli.....	7
3.2.1.2 Muita liuottimena käytettyjä alkoholeja.....	7
3.2.2 Formamidi ja N-metyyliformamidi .....	8
3.2.2.1 Formamidi.....	8
3.2.2.2 N-metyyliformamidi .....	8
<b>3.3 INERTIT LIUOTTIMET .....</b>	<b>9</b>
<b>3.4 SEOKSET .....</b>	<b>9</b>
3.4.1 Seossuunnittelu .....	9
<b>4. ELEKTROLYYTTILISÄT.....</b>	<b>12</b>
4.1 PERKLOORIHAPPO .....	12
4.2 KARBOKSYyliHAPOT .....	12
4.3 NATRIUMDODEKYyliSULFAATTI .....	13
4.4 IONINESTEET .....	14
4.4.1 1,3-alkyyli-imidatsoliumsuolat .....	14
4.4.2 Kvaternäriset ammoniumsuolat.....	15
4.5 KIRAALISET SELEKTORIT .....	16
4.6 ELEKTROLYYTTILISIEN VERTAILUA .....	17
<b>5. LIUKSEN pH JA ANALYYTTIEN HAPPO-EMÄS-KÄYTTÄYTYMINEN SEKÄ IONISAATIOVAKIOT .....</b>	<b>20</b>
5.1 LIUKSEN PH .....	20
5.2 ANALYYTTIEN HAPPO-EMÄS-KÄYTTÄYTYMINEN SEKÄ IONISAATIOVAKIOT.....	21
<b>6. LIKKUVUDET .....</b>	<b>23</b>
6.1 ELEKTROFOREETTINEN JA ELEKTRO-OSMOOTTINEN LIKKUVUUS.....	25
6.2 TODELLINEN JA EFEKTIIVINEN LIKKUVUUS .....	27
<b>7. LIUOTTIMIEN VERTAILUA .....</b>	<b>30</b>
7.1 POHJALUKU.....	31
7.2 JOULEN LÄMPÖ .....	31
<b>8. SOVELLUKSET .....</b>	<b>33</b>

<b>8.1 VARAUKSELLINEN EROTTAMINEN .....</b>	<b>33</b>
<b>8.2 NEUTRAALIEN YHDISTEIDEN EROTTAMINEN.....</b>	<b>34</b>
<b>8.3 KIRAALINEN EROTTAMINEN.....</b>	<b>35</b>
<b>9. VEDELLISTEN JA VEDETTÖMIEN OLOSUHTEIDEN VERTAUSTA.....</b>	<b>37</b>
<b>10. YHTEENVETO.....</b>	<b>43</b>
<b>KIRJALLISUUSVIITTEET .....</b>	<b>47</b>
<b>LIIITTEET.....</b>	<b>52</b>

## KÄYTETYT LYHENTEET

ACE	Vedellinen kapillaarielektroforeesi
ACN	Asetonitriili
AN	Vastaanottajaluku
BGE	Taustaelektrolyytti
BuOH	Butanoli
CD	Syklodekstriini
CE	Kapillaarielektroforeesi
CZE	Kapillaarivyöhyke-elektroforeesi
DHO	Debye-Hückel-Onsager-teoria
DMA	N,N-dimetyyliasetamidi
DMDDAB	Dimetyylididekyyliammoniumbromidi
DMDHAB	Dimetyylidiheksyyliammoniumbromidi
DMDHeAB	Dimetyylidiheptyyliammoniumbromidi
DMDNAB	Dimetyylidinonyyliammoniumbromidi
DMDOAB	Dimetyylidioktyyliammoniumbromidi
DMF	N,N-dimetyyliformamidi
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
DN	Luovuttajaluku
EOF	Elektro-osmoottinen virtaus
EtOH	Etanoli
FA	Formamidi
HDAS- $\beta$ -CD	Heptakis(2,3-di- <i>O</i> -asetyyli-6- <i>O</i> -sulfaatti)- $\beta$ -syklodekstriini
HDMS- $\beta$ -CD	Heptakis(2,3-di- <i>O</i> -metyyli-6- <i>O</i> -sulfaatti)- $\beta$ -syklodekstriini
HxDAS- $\alpha$ -CD	Heksakis(2,3-diasetyyli-6- <i>O</i> -sulfaatti)- $\alpha$ -syklodekstriini
IL	Ioninesteet
IDA	Iminodiasetaattihappo
MeOH	Metanoli
NACE	Vedetön kapillaarielektroforeesi
NM	Nitrometaani
NMF	N-metyyliformamidi
NSAH	2-naftaleenisulfonihappo
ODAS- $\gamma$ -CD	Oktakis(2,3-diasetyyli-6- <i>O</i> -sulfaatti)- $\gamma$ -syklodekstriini
PAGE	Polyakryyliamidigeelielektroforeesi

PC	Propyleenikarbonaatti
PrOH	Propanoli
RMSE	Keskivirhe
SDS	Natriumdodekyylisulfaatti
THF	Tetrahydrofuraani
TRIS	Tris(hydroksimetyyli)aminometaani
TTAB	Tetradekyyli(trimetyyli)ammoniumbromidi

## 1. JOHDANTO

Kiinnostus kapillaarielektroforeesiin vedettömissä olosuhteissa (NACE) on viimeisen kahdenkymmenen vuoden aikana lisääntynyt valtavasti. Vuonna 1984 julkaistiin ensimmäinen artikkeli kapillaarivyöhyke-elektroforeesissa (CZE) käytetystä puhtaasta orgaanisesta liuottimesta.<sup>1</sup> Kuitenkin vasta 1990-luvun puolella kiinnostus aihetta kohtaan lisääntyi merkittävästi.

Tämän kirjallisuustutkielman tarkoituksena on paneutua hiukan syvemmin NACE:ssa käytettyihin orgaanisiin liuottimiin ja yleisesti käytettyihin taustaelektrolyytteihin (BGE). Erityisesti selvitetään liuottimen valinnan vaikutusta erilaisiin liikkuvuuksiin ja analyyttien happo-emäs -käyttäytymiseen. Lisäksi tutkitaan myös pH-arvon vaikutusta analyysiin sekä tutustutaan hiukan Joulen lämmön vaikutukseen vedettömissä systeemeissä. Tavoitteena on saada tarkempi tuntemus vedettömien liuottimien fysikokemiallisista ominaisuuksista ja selvittää erilaisissa analyyseissä (varaukselliset, neutraalit ja kiraaliset yhdisteet) käyttökelpoisia BGE-kokonaisuuksia. Lopuksi vielä vertaillaan vedellisten ja vedettömien kapillaarielektroforeesiliuotinsysteemien eroja sekä niiden vaikutusta analyyttien erottumiseen.



## 2. LIUOTTIMIEN OMINAISUUKSIA

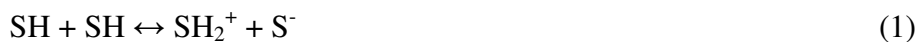
Liuottimien fysikaalisilla ja kemiallisilla ominaisuuksilla on suuri vaikutus NACE-analyyseihin. Niiden pitäisi myös pystyä liuottamaan analyytit, lisäksi ne eivät saisi olla palavia, myrkyllisiä tai reaktiivisia, niitä pitäisi saada puhtaina yhdisteinä alhaisin kustannuksin ja niiden olisi hyvä olla nestemäisiä huoneenlämmössä. Liuottimien ominaisuuksia tutkimalla ja valitsemalla sopivimmat liuottimet uskotaan NACE:ssa pystyttävän hyvin erilaisiin ja monipuolisiin analyyseihin. Liuottimen valinta voi muodostua myös ongelmaksi, koska tutkijan on tunnettava tarkkaan sen fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet, ja niiden avulla ennustettava liuottimen käyttäytyminen erilaisten analyyttien kanssa. Jos esitutkimusta ei tehdä kunnolla, analyysi ei välttämättä onnistu tai analyysin tulokset eivät vastaa todellisia tuloksia. Siksi varsinkin NACE:ssa tarkka ja yksityiskohtainen liuottimen ominaisuuksien kartoitus sitä valittaessa tuottaa parhaan mahdollisen lopputuloksen. Liuottimen huomioonotettavia ominaisuuksia ovat mm. viskositeetti, dielektrisyysvakio, dipolimomentti, happo-emäs –käyttäytyminen, sähköinen konduktiivisuus, polaarisuus, kiehumispiste ja UV-katkoalue.<sup>1</sup> Liitteessä 1 olevassa taulukossa on lueteltu yleisimpien NACE:ssa käytettyjen liuottimien ominaisuuksia.<sup>2-7</sup>

### 2.1 Pintajännitys

Nesteen sisällä jokaiseen molekyyliin vaikuttavat ympäröivät molekyylit joka suunnasta yhtä suurella voimalla, mutta nesteen pinnalla oleviin molekyyliin vaikuttavat vain alapuolella olevien molekyylien vetovoimat, eikä nesteen ulkopuolella ole molekyyliä tasaamassa näitä voimia.<sup>8</sup> Tätä pintamolekyylien nesteeseen päin vetävää voimaa kutsutaan pintajännitykseksi. Pintajännitys riippuu myös nesteestä: esimerkiksi veden ja dimetyyliasetamidin (DMA) pintajännitys on suuri, koska polaaristen molekyylien väliset vetysidokset ovat voimakkaita. Pintajännitys vaikuttaa siis liuoksen liuotin ominaisuuksiin. Pinta-aktiivisilla aineilla saadaan alennettua pintajännitystä ja lisättyä yhdisteen liuotin ominaisuuksia.

## 2.2 Autoprotolyysivakio

Autoprotolyysissä kahden saman yhdisteen molekyylien välillä tapahtuu vetyionin (protonin) siirto kaavan (1) mukaisesti.



, missä SH on liuotinmolekyyli.

Autoprotolyysivakio kertoo liuottimen kyvystä sekä vastaanottaa että luovuttaa protonia (l. happo-emäs -ominaisuuksista).<sup>7</sup> Amfiproottisilla liuottimilla on molempia ominaisuuksia ja inertillä ei kumpaakaan. Aproottiset liuottimet eivät yleensä pysty varsinaisesti autoprotolyysiin, mutta pystyvät vastaanottamaan protonin.<sup>2</sup>

## 2.3 Viskositeetti

Viskositeetti kuvaa liuottimen vastustusta laminaarivirtaukseen, ja se vaihtelee huomattavasti lämpötilan mukana.<sup>4</sup> Viskositeetti vaikuttaa lähinnä analyyttien liikkuvuuteen elektro-osmoottisen virtauksen kautta. Liikkuvuus on suoraan verrannollinen dielektrisyysvakioon ja kääntäen verrannollinen viskositeettiin, joten mitä alhaisempi viskositeetti on, sitä parempi on yleensä myös liikkuvuus. Alhainen viskositeetti takaa siis alhaiset analyysiajat, jonka vuoksi analyytti vyöhykkeet pysyvät kapeina eikä häntimistä tapahdu. Asetonitriili (ACN) voisi olla hyvä liuotin mm. juuri alhaisen viskositeettinsa takia.

## 2.4 Dielektrisyysvakio

Ionin ja liuottimen välisten vuorovaikutusten voimakkuuksista kertoo dielektrisyysvakio ( $\epsilon$ ).<sup>4</sup> Hyvällä liuottimella  $\epsilon \geq 30$ . Tällöin voidaan sanoa elektrolyytin ionidissosiaation tapahtuvan kokonaan. Myös pienen dielektrisyysvakion ( $\epsilon \leq 10$ ) omaavia liuottimia voidaan käyttää NACE:ssa liuotinseoksissa. Tällöin täytyy vain ottaa huomioon mahdollinen ionipariutuminen.

## 2.5 Luovuttaja- ja vastaanottajaluvut

Luovuttajaluku (DN) kertoo määrällisen arvon [kJ / mol] yhdisteen kyvystä luovuttaa elektroneja eli sitoa protoneja.<sup>6,7</sup> Elektronien luovuttajat ovat yhdisteitä, joilla on vapaa elektronipari (yleensä happi-, typpi-, tai rikkiatomi). Korkea DN kertoo yhdisteen suu-  
resta emäsvahvuudesta (esim. N-metyyliformamidi (NMF)). DN pystyttiin selvittämään ensimmäisen kerran SbCl<sub>5</sub>-liuotinkompleksin muodostumisentalpiasta sekä myöhemmin epäsuorasti mitattuna liuosseoksista ottaen huomioon niiden molekyylien sisäiset vuorovaikutukset.

Vastaanottajaluku (AN) taas kertoo yhdisteen kyvystä vastaanottaa elektroneja.<sup>6,7</sup> Vety-  
sidoksen luovuttajilla (esim. vesi, metanoli (MeOH) ja formamidi (FA)) arvo on korkea, kun taas tähän pystymättömillä liuottimilla (mm. dimetyylisulfoksidi (DMSO), N,N-dimetyyliformamidi (DMF) ja ACN) se on alhainen. Arvo on dimensioton toisin kuin DN. AN-skaala on saatu määritettyä vertaamalla trietyylifosfiinioksidin <sup>31</sup>P-NMR-siirtymiä, kun se sitoutuu liuotinmolekyyleihin.

## 2.6 Polaarisuus

Polaarisuus kertoo kemiallisen sidoksen luonteen.<sup>9</sup> Se riippuu molekyylin varausjakaumasta sekä sen symmetriasta. Kapillaarielektroforeesissa (CE) kaikki liuottimet ovat polaarisia, joista veden jälkeen FA:lla on suurin polaarisuus.

## 2.7 Dipolimomentti

Dipolimomenttia on vain polaarisella molekyyllillä, ja se aiheutuu atomien osittaisvarauksista.<sup>9</sup> Se kertoo molekyylin varausjakauman symmetrian, ja sen perusteella voidaan arvioida sidoksen luonnetta ja elektronien jakautumista sidoksessa.

### 3. LIUOTTIMET

#### 3.1 Aproottiset liuottimet

Aproottiset liuottimet voivat vastaanottaa protonin, mutta eivät yleensä luovuttaa sitä.<sup>2</sup> Tällaisiin heikon autoprotolyysivakion omaaviin liuottimiin kuuluu mm. ACN, jota on käytetty hyvin paljon NACE:ssa.

##### 3.1.1 Asetonitriili

ACN:llä on alhainen viskositeetti ja kohtuullinen dielektrisyysvakio, joiden vuoksi ACN:ssä liikkuvuudet ovat yleisesti suurempia kuin muissa liuottimissa.<sup>10</sup> Tällöin myös BGE-ionien liikkuvuudet ovat suuret, ja käytettävä sähkövirta voi olla korkea. ACN vaikuttaa happojen ionisaatioon. ACN solvatoi huonosti happojen ionimuotoja, jolloin hapot ovat heikompia ACN:ssä kuin vedessä. Tällöin yhdisteet, joiden happovahvuudet ovat hyvinkin lähellä toisiaan vedessä, eikä niitä pystytä niissä olosuhteissa erottamaan, erottaminen on mahdollista. Luovuttajaluvusta nähdään, ettei ACN pysty luovuttamaan elektroneja, mutta se pystyy jonkin verran vastaanottamaan niitä. Se ei kuitenkaan pysty autoprotolyysiin, josta kertoo korkea  $pK_{\text{auto}}$ .

##### 3.1.2 Propyleenikarbonaatti

Aproottinen propyleenikarbonaatti (PC) tarjoaa vaihtoehdon yleisimmille liuottimille. PC:n paras ominaisuus verrattuna muihin orgaanisiin liuottimiin on sen korkea suhteellinen permittiivisyys (N-metyyliamidit poikkeus).<sup>11</sup> Tässä suhteessa PC muistuttaa vettä liuottimena, ja MeOH ja ACN muodostavat näille vastakohtaan muodostamalla yllättävän suuren määrän ionipareja. PC mahdollistaa työskentelyn normaalissa lämpötilassa, ja sen tiheys,  $d = 1,198 \text{ g/cm}^3$ , on suurempi kuin monilla muilla orgaanisilla liuottimilla. Lisäksi sen viskositeetti on verrattavasti korkeampi kuin vedellä, alkoholeilla ja ACN:llä, mutta alhaisempi kuin FA:lla. Korkea viskositeetti johtaa suhteellisen alhaisiin ioniin liikkuvuuksiin verrattuna veteen ja useisiin muihin orgaanisiin liuottimiin. Vielä mielenkiintoisena huomiona se saattaa ACN:n tavoin vaikuttaa liuotettavien aineiden happo-emäs -tasapainoon.

### 3.1.3 Dimetyylisulfoksidi

DMSO on voimakkaasti polaarinen yhdiste, jonka protonien vastaanottokyky on kohtalainen (viite 1, taulukko 1). Sillä on suhteellisen korkea viskositeetti, joka mahdollistaa alhaisemmat analyyttien ioniset liikkuvuudet, jolloin erottumistehokkuuden pitäisi parantua. Sen permittiivisyys on tarpeeksi hyvä täydelliseen tai ainakin hyvin mittavaan ionidissosiaatioon.

### 3.1.4 Tetrahydrofuraani

Tetrahydrofuraanilla (THF) on alhainen viskositeetti ja suhteellisen alhainen polaariisuus. Tämän mukaan se voisi toimia hyvänä liuottimena NACE:ssa. Kuitenkin sen dielektrisyysvakio on hyvin alhainen, jolloin ionidissosiaatiota tapahtuu hyvin vähän liuoksessa, joten se tuskin pystyy toimimaan liuottimena yksin. Sitä onkin käytetty jonkin verran pieninä pitoisuuksina liuotinkompositiossa parantamaan erottumista.<sup>12</sup> THF:a käytetään suhteellisen harvoin NACE:ssa, koska sen liiallinen määrä liuotin seoksessa on haitallista tavalliselle CE-laitteistolle.<sup>6</sup>

### 3.1.5 N,N-dimetyyliformamidi ja N,N-dimetyyliasetamidi

DMF:lla ja N,N-dietyyliasetamidilla (DMA) on samankaltaiset ominaisuudet (viite 1, taulukko 1), ja niiden vaikutuksesta erottumiseen onkin nähtävissä yhtenevyyksiä.<sup>13</sup> Molempien autoprotolyysivakio on kohtuullisen heikko, eivätkä ne AN:n mukaan pysykään luovuttamaan protonia. Sen sijaan niiden DN on kohtuullinen, ja ne pystyvätkin vastaanottamaan protoneja. Ionidissosiaatiota pitäisi pystyä tapahtumaan näissä liuottimissa, koska dielektriivisyysvakio on tarpeeksi korkea.

### 3.1.6 Nitrometaani

Myös nitrometaania (NM) on kokeiltu onnistuneesti liuottimena NACE:ssa.<sup>14</sup> Sen dielektrisyysvakio on keskinkertainen, mutta kuitenkin tarpeeksi hyvä ionidissosiaatioon, ja sen viskositeetti on alhainen, jolloin liikkuvuuksien pitäisi olla NM:ssa muita liuotti-

mia suuremmat (poikkeuksena ACN). Lisäksi NM:n suhteellisen korkea autoprotolyysivakion pitäisi taata laaja pH-mittausalue.

### 3.2 Amfiproottiset liuottimet

Amfiproottiset liuottimet ovat yhdisteitä, jotka pystyvät sekä vastaanottamaan että luovuttamaan protonin, ja niitä kutsutaan usein myös veden kaltaisiksi yhdisteiksi.<sup>1,15</sup> Amfiproottiseksi liuottimeksi luokitellaan mm. metanoli.

#### 3.2.1 Alkoholit

##### 3.2.1.1 Metanoli

MeOH on paljon käytetty liuotin CE:ssä. Sen liuotusominaisuudet perustuvat vetysidoksiin, sillä on hyvä dielektrisyysvakio, ja se pystyy sekä luovuttamaan että vastaanottamaan protoneita.<sup>1,15</sup> Yleensäkin MeOH on hyvin vedenkaltainen yhdiste, joten se on luonnollisesti saavuttanut suuren suosion NACE:ssä. Se lisää rasvaliukoisten aineiden liukenevuutta mutta myös vaikuttaa sekä happojen että emästen ionisaatioominaisuuksiin veteen verrattuna. MeOH:a on myös käytetty onnistuneesti korkeilla pH-arvoilla diproottisten karboksyylihappojen kanssa heikkojen happojen analyysiin.<sup>16</sup> Lisäksi analyyteillä on todettu nopea erottuminen korkeilla sähkökenttävoimakkuuksilla MeOH:a käytettäessä liuottimena.<sup>17</sup> Kun tiedetään elektrolyyttiä pK<sub>a</sub>-arvot metanolisessa liuoksessa, pystytään helposti määrittämään haluttuun pH-arvoon tarvittavat oikeat määrät happoa ja sen suolaa.<sup>16</sup>

##### 3.2.1.2 Muita liuottimena käytettyjä alkoholeja

MeOH:n lisäksi liuottimina on käytetty mm. etanolia<sup>17</sup> (EtOH), 1-propanolia<sup>17</sup> (1-PrOH), 2-propanolia<sup>7</sup> (2-PrOH) ja 1-butanolia<sup>17</sup> (1-BuOH). Näillä kaikilla on kohtuulliset autoprotolyysivakiot, hyvät DN:t (varsinkin 2-PrOH) ja kohtuulliset AN:t (DN- ja AN-arvoja ei löydetty kirjallisuudesta 1-PrOH:lle), joten ne pystyvät sekä vastaanottamaan että luovuttamaan protoneja. Dielektrisyysvakio on kaikilla alle 30, joten ionipariutumisen on hallitseva tapahtuma alkoholien liuotinsysteemeissä, vaikkakin ionidis-

sosiaatiota tapahtuu jonkin verran. Dielektrisyysvakion ja viskositeetin suhde laskee järjestyksessä EtOH > 1-PrOH > 2-PrOH > 1-BuOH ollen kaikilla pieni. Suuret viskositeetit (lukuun ottamatta EtOH) saattavat vaikuttaa analyysiaikojen pitenemiseen, tosin korkea viskositeetti vähentää myös puskuri-ionien liikkuvuutta ja mahdollistaa näin korkeampien sähkökenttävoimakkuuksien käytön (virta pysyy pienenä).<sup>17</sup>

### 3.2.2 Formamidi ja N-metyyliformamidi

#### 3.2.2.1 Formamidi

Autoprotolyysivakio on FA:lla veden luokkaa, ja sen sanotaankin siinä mielessä olevan veden kaltainen liuotin. Sillä on hyvä DN ja AN, ja se pystyykin sekä luovuttamaan että vastaanottamaan protoneita. FA:n korkea viskositeetti vähentää puskuri-ionien liikkuvuutta pienentäen sähkövirtaa korkeammilla sähkökenttävoimakkuuksilla (vedellä korkeat sähkökenttävoimakkuudet eivät yleensä mahdollisia).<sup>18</sup> Tämän vuoksi systeemissä muodostuu vähemmän lämpöä ja Joulen lämmön vaikutukset pienenevät. FA:lla on myös erittäin suuri dielektrisyysvakio (109,5), joten ionipariutumisen ei pitäisi häiritä analyyttien erottumista.

#### 3.2.3.2 N-metyyliformamidi

Vaikka NMF:lla onkin hiukan huonompi AN kuin FA:lla tai vedellä, sen kyky liuottaa anioneja on silti vertailukelpoinen.<sup>19</sup> Tämän lisäksi korkean DN:n ansiosta sillä on parempi emäsvahvuus, ja tätä kautta se pystyy muodostamaan katodisen EOF:n sekä negatiivisen varauksen kapillaarin silikakerrokseen. NMF läpi käy intensiivisemmän autoprotolyysin kuin vesi, ja se hydrolysoituu hitaasti. Tästä johtuen se omaa korkean ionivahvuuden. NMF:lla on liuottimista kaikkein suurin dielektrisyysvakio, ja ionidissosiaatio on lähellä täydellisyyttä. Dielektrisyysvakion ja viskositeetin suhteen mukaan sillä pitäisi myös olla suhteellisen korkeat tehokkuudet.

### 3.3 Inertit liuottimet

Koska inertit liuottimet (kuten heksaani ja kloroformi) eivät pysty autoprotolyysiin, ja niiden protonien luovutus ja vastaanotto on suhteellisen heikkoa, sekä niillä on alhainen kiehumispiste, ne eivät ole soveltuvia CE:iin, ellei niitä käytetä jonkin muun liuottimen kanssa.<sup>2</sup>

### 3.4 Seokset

Seoksia käytetään, kun halutaan parantaa analyyttien erottumisominaisuuksia, eikä puhtailla liuottimilla saada erottumista aikaan. Yleisimpien liuottimien ominaisuuksia on parannettu lisäämällä niihin jotain muuta liuotinta, joko toista yleisesti käytettyä liuotinta, kuten ACN:ä tai FA:a tai harvinaisempaa liuotinta kuten THF:a. Kirjallisuutta löytyy paljon myös veden ja orgaanisen liuottimen seoksista, mutta tässä tutkielmassa niihin kiinnitettiin vähemmän huomiota ja perehdyttiin enemmän puhtaisiin orgaanisiin liuottimiin tai niiden seoksiin. Huomattava on kuitenkin, että orgaanisissakin liuotinseoksissa on hyvin usein pieniä määriä vettä epäpuhtautena, ja se saattaa vaikuttaa huomattavasti analyyttien erottumiseen.<sup>10</sup>

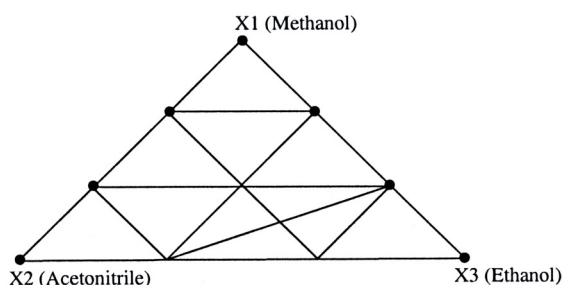
ACN:n ja MeOH:n seoksia on tutkittu paljon NACE:ssa.<sup>15,20-22</sup> Lisäksi mm. EtOH:a<sup>23</sup> ja FA:a<sup>24</sup> on käytetty seoksissa. ACN:llä saadaan nostettua analyyttien  $pK_a$ -arvoja, jolloin matalan  $pK_a$ -arvon omaavat analyytit on mahdollista erottaa.<sup>20</sup> Myös analyyttien liikkuvuuksien on todettu nousevan ACN-pitoisuuden kasvaessa MeOH-ACN-seoksissa.<sup>15</sup> MeOH taas pienentää elektro-osmoottisen virtauksen nopeutta, jolloin analyyttien erottumistehokkuus nousee.<sup>21</sup>

#### 3.4.1 Seossuunnittelu

Demir ja Yücel<sup>23</sup> käyttivät orgaanisen liuotinkomposition selvittämiseen NACE:ssa seossuunnittelua. Seossuunnittelussa selvitetään useamman liuottimen eri kombinaatioiden avulla paras mahdollinen liuotinkokonaisuus. Tässä tutkimuksessa selvitettiin MeOH:n, ACN:n ja EtOH:n erilaisten seosten vaikutuksia metalli-ionien erottumiselektiivisyyteen. Optimikomposition selvittämiseen käytettiin tutkimuksessa yksinker-



taista ristikkosuunnittelua (kuva 1). Suunnittelun tarkoituksena oli mallintaa seoskompositio polynomisin yhtälöin siten, että jokaisen seoksen tulos voitaisiin ennustaa.



Kuva 1. Ristikkosuunnittelun malli metanolille, asetonitriilille ja etanolille.<sup>23</sup>

Kahden eri mallin avulla (Scheffén ja sen työstetty malli) selvitettiin laskennallisesti elektroforeettisten liikkuvuuksien kannalta parasta mahdollista liuoskompositiota. Lisäksi näitä kahta mallia verrattiin keskenään keskivirheen (RMSE) sekä F-testin avulla. Ristikkosuunnittelussa korkeimmat elektroforeettiset liikkuvuudet saavutettiin seoksissa, joissa toisessa oli 2/3 metanolia ja 1/3 asetonitriiliä sekä toisessa 1/3 asetonitriiliä ja 2/3 etanolia. Scheffén mallin mukaiset liuottimien optimikompositiot kullekin metallille on taulukoituna taulukossa 1. Lisäksi on vielä ilmoitettu taulukossa 2 optimikompositioiden avulla lasketut sekä kyseisellä kahdella testatulla seoskomponentilla saavutettujen elektroforeettisten liikkuvuuksien arvot.

Taulukko 1. Liuottimien optimikompositiot metalleille<sup>23</sup>

Solvent (%)	Ag	Fe	Cr	Mn	Cd	Co	Ni	Zn	Pb	Cu
$x_1$ (methanol)	11.38	11.06	7.06	18.21	7.44	10.55	28.68	6.93	24.19	24.07
$x_2$ (acetonitrile)	68.14	65.98	71.58	50.95	46.51	62.25	60.77	68.31	64.51	47.03
$x_3$ (ethanol)	20.48	22.96	21.36	30.84	46.04	27.20	10.56	24.76	11.29	28.90

Taulukko 2. Metallien elektroforeettiset liikkuvuudet kahdella mitatulla menetelmällä sekä lasketulla optimimenetelmällä<sup>23</sup>

seos	Elektroforeettiset liikkuvuudet [ $\times 1,10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]									
	Ag	Fe	Cr	Mn	Cd	Co	Ni	Zn	Pb	Cu
2/3 MeOH- 1/3 ACN	5,679	5,372	4,755	4,622	4,265	3,975	2,923	2,807	3,206	2,730
2/3 EtOH - 1/3 ACN	5,490	5,096	4,755	4,340	3,627	3,475	2,923	2,529	3,206	2,430
optimi	5,031	4,784	4,252	3,437	3,097	3,095	2,416	2,440	2,682	2,088

Scheffén mallin avulla pystyttiin kohtuullisen hyvin ennustamaan analyyttien liikkuvuudet halutulla liuotinseoksella, mutta ristikkosuunnitelun mittauksissa saatiin suurempia liikkuvuuksia kuin laskennallisella optimikompositiolla.

## 4. ELEKTROLYYTTILISÄT

Usein pelkkä liuotin ei riitä elektroforeettiseen analyyttien erottamiseen, vaan BGE:n ominaisuuksia parannetaan erilaisilla elektrolyyttilisillä. Ongelmaksi saattaa muodostua analyytin varaaminen, oikean pH-mittausalueen saavuttaminen ja analyyttien happo-emäs -käyttäytyminen erilaisissa BGE:issä. Yleensä BGE:hin tarvitaan puskuri, jolla pH pystytään pitämään suhteellisen tasaisena. pH-arvon pitäminen ”haluttuna” on yleensä ehdoton edellytys analyysin toimivuudelle, vaikka pH-arvo tuskin pysyy täysin kohdillaan (mm. liuoksen epäpuhtaudet vaikuttavat selvästi<sup>10</sup>). Puskureita valmistetaan usein karboksyylihappoista ja niiden suoloista. Elektrolyyttilisinä on käytetty onnistuneesti mm. perkloorihappoa, karboksyylihappoja ja tetra-alkyyliamideja. Vastikään on alettu osoittaa kiinnostusta myös ioninesteiden (IL) käytölle NACE:ssa.

### 4.1 Perkloorihappo

Perkloorihappo on vahva happo vedellisissä liuksissa sekä PC:ssa.<sup>11</sup> ACN:ssä se taas on suhteellisen heikko happo, mutta sen happovoimakkuuden on todettu kasvavan, kun liuokseen lisätään etikkahappoa.<sup>25</sup> Porraksen tutkimuksessa<sup>26</sup> ACN:iin lisättiin perkloorihappoa (valmistettu etikkahappoon), jotta saatiin tarpeeksi alhainen pH erittäin heikkojen emästen analyysiin. Vaikka perkloorihappo mahdollistaa BGE:n alhaisen pH-arvon, sen heikkoutena on puskuroimattomuus. Niinpä liuoksen pH saattaa vaihdella riippuen liuoksessa läsnä olevista epäpuhtauksista (mm. vesi). Jo pieni määrä vettä taustaelektrolyytissä, jossa on perkloorihappoa, johtaa  $\text{H}_3\text{OCIO}_4$ -yhdisteen läsnäoloon liuoksessa, mutta ainakin PC:ssa se on täysin dissosioituneena eikä häiritse analyysiä.<sup>11</sup> Lisäksi veden läsnäolo saattaa laskea analyyttien elektroforeettista liikkuvuutta, johon kyseinen ioniassoiaatio ( $\text{H}_3\text{OCIO}_4$ ) saattaa olla syynä.<sup>26</sup>

### 4.2 Karboksyylihapot

Karboksyylihapot ja varsinkin niiden suolat ovat hyvin yleisiä käytettyjä elektrolyyttejä NACE:ssa. Suosituimpia ovat asetaatti ja formiaatti. Descroix *et al.*<sup>22</sup> tutkivatkin näiden analyyttien vaikutusta amfetamiinien erottamiseen ACN:MeOH-seoksessa (80:20 v/v). Tutkijat totesivat sekä asetaatti- että formiaatti-BGE:en protonoivan amfetamiinit koko-

naan. Erottumistehokkuuteen vaikuttivat asetaatilla niin ionivahvuus kuin ionipariutumisenkin, formaatilla taas ionipariutumista ei pystytty todistamaan. Porras *et al.*<sup>1</sup> taas totesivat alkalimetalliasetaattien vaikuttavan elektro-osmoottiseen virtaukseen (EOF) laskevasti metallikationin koon kasvaessa. Peng *et al.*<sup>27</sup> huomasivat erottaessa organometalleja toisistaan, että isot pitoisuudet etikkahappoa pienensivät EOF:a ja analyyttien liikkuvuuksia, mutta myös hyvin pienet pitoisuudet heikensivät erottumista.

Karboksyylihappojen välille ei aina saada selkeitä eroja parasta elektrolyyttiliuosta valitessa, ja tutkija valitsee käytettävän hapon ilman tieteellisiä faktoja. Erilaisia karboksyylihappoja vertailtiin EtOH:ssa Herrero-Martínezin *et al.*<sup>28</sup> tutkimuksissa, mutta niiden välille ei löydetty merkittäviä eroja, ja etikkahappo valittiin käytettäväksi tässä menetelmässä.

Porras *et al.*<sup>10,16</sup> ovat tutkineet fenolien käyttäytymistä korkeilla pH-arvoilla erilaisilla BGE-liuoksilla. Diproottiset karboksyylihapot tarjoavat mahdollisuuden yhdisteiden erottumiseen korkeilla pH-arvoilla. Karboksyylihapon  $pK_{a,2}$ -arvon ollessa  $> -2$  yksikköä analyytin dissosiaatiokertoimesta kyseisessä liuotuksessa ainakin osittaista dissosiaatiota pitäisi tapahtua.<sup>10,16</sup> Maleaatti (malonihapon suola) oli hyvä taustaelektrolyytti ja omai loistavan toistotarkkuuden metyyli-fenolien<sup>10</sup> ja fenolien<sup>16</sup> erottamiseen ACN:ssä. Oksaalihapon suolan todettiin muodostavan heterokonjugaatteja analyytin kanssa, eikä erottuminen perustunut dissosiaatioon, kuten pitäisi korkeilla pH-arvoilla.<sup>10</sup>

### 4.3 Natriumdodekyylisulfaatti

Natriumdodekyylisulfaatti (SDS) on pinta-aktiivinen aine<sup>29</sup>, jota käytetään muun muassa proteiinien erotteluun polyakryyliamidigeelielektroforeesissa (SDS-PAGE)<sup>30</sup> sekä CE:ssä kapillaarin päällystysmateriaalina<sup>31</sup>. Vedellisessä kapillaarielektroforeesissa (ACE) SDS-molekyylit ryhmittyvät yhteen muodostaen negatiivisesti varautuneita misellejä.<sup>29</sup> SDS ei kuitenkaan pysty muodostamaan misellejä suurimmassa osassa orgaanisia liuottimia, vaan analyyttien erottuminen perustuu negatiivisesti varautuneiden pinta-aktiivisten molekyyliden ja varautumattomien analyyttien välisiin vuorovaikutuksiin.<sup>2</sup>

Sokoließ *et al.*<sup>32</sup> käyttivät SDS:a erottaessaan neuroleptien ja masennuslääkkeiden (Z)- ja (E)-isomeerejä metanolissa. Resorsinareenin (res) käyttö elektrolyyttinä liuoksessa vaatii korkean pitoisuuden SDS:a, jolloin elektroforeettinen liikkuvuus saatiin käännettyä anodiseksi. Virtauksen kääntymisen ehdotettiin selittyvän kompleksinmuodostumisella.

#### 4.4 Ioninesteet

Ioninesteet ovat yleisesti alhaisen sulamispisteen (mielellään < 100 °C) omaavia puoliksi orgaanisia suoloja tai suolojen seoksia, joilla on laaja nestemäinen toiminta-alue.<sup>33</sup> Myös pelkästään ioneista koostuvat klassisten sulatettujen suolojen (molten salts, kuten NaCl) johdannaiset alhaisella sulamispisteellä luokitellaan ioninesteiksi. Ne sisältävät selvästi erotettavan anionin ja kationin, jotka molemmat pystyvät toimimaan erottumismekanismeeissa ainutlaatuisina, mutta toisistaan riippuvina ioneina liuottimissa.<sup>34</sup>

Ioninesteitä kutsutaan kemiassa yleisesti ns. ”vihreiksi” yhdisteiksi (i. ympäristöystävällisiksi), koska ne omaavat alhaisen höyrynpaineen. Tämän vuoksi yhdisteet on helppo hävittää, kierrättää sekä tuotteen uudelleen käyttöönnotto helpottuu.<sup>33</sup> Muita hyviä ominaisuuksia ovat mm. korkea ioninen konduktiivisuus, palamattomuus, laaja nestemäinen toiminta-alue, terminen ja oksidatiivinen pysyvyys, loistavat lämmönkuljetusominaisuudet sekä laaja elektrokemiallinen toiminta-alue (yleensä > 5 V).

Ioninesteet koostuvat suuresta orgaanisesta kationista, joka sisältää yleensä tyypeä (esim. 1,3-alkyyli-imidatsoliumioni) sekä epäorgaanisista anioneista, kuten kloridi, bromidi tai tetrafluoroboraatti.<sup>34</sup> Mahdollisuus valita erilaisten kationien väliltä, sekä minkä tahansa lukemattomien anionien joukosta, luo tutkijalle mahdollisuuden valikoida juuri kyseiseen analyysiin sopivan ioninesteen.<sup>33</sup> Silti on joitakin paljon käytettyjä ioninesteitä, kuten kvaternääriset ammonium- sekä 1,3-alkyyli-imidatsoliumsuolat.

##### 4.4.1 1,3-alkyyli-imidatsoliumsuolat

1,3-alkyyli-imidatsoliumsuolat tarjoavat lupaavia ehdokkaita virtauksen muokkaajiin. Alkyyli-imidatsoliumsuolat liukenevat tai sekoittuvat hyvin useisiin NACE:ssa käytet-

tyihin orgaanisiin liuottimiin, jolloin heterokonjugaattien muodostus on mahdollista.<sup>35</sup> Tällöin voidaan käyttää suhteellisen yksinkertaista elektrolyyttisysteemiä, lisätään vain sopivaa suolaa puhtaaseen liuottimeen. Vaher ja Koel<sup>35</sup> saivatkin erotettua Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-, Ca<sup>2+</sup>- ja Mg<sup>2+</sup>-ionit mineraalivesistä käyttäen 1-butyyl-3-metyyli-imidatsoliumheptafluoributanaattia elektrolyytinä metanolissa, eikä erottumiseen tarvittu kompleksinmuodostajia.

Ioninesteen anionilla pitäisi yleensä olla suurempi vaikutus ioninesteen vetysidoksen emäksisyyteen kuin kationilla.<sup>33</sup> Käyttäessään 1-butyyl-3-metyyli-imidatsoliumisuolaa (anionina PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup> tai CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>) elektrolyytinä ACN:ssä saivat Vaher *et al.*<sup>36</sup> erotettua viisi huonosti veteen liukenevaa väriainetta toisistaan sekä paljastettua väreistä tulevia useita pieniä epäpuhtauksia. Anionin vaihto vaikutti yllättävän paljon analyytin migraatioaikoihin. Tätä metodologiaa laajentamalla tutkijat pystyivät erottelemaan lisäksi useita karboksyylihappoja sekä fenoleita.<sup>37</sup> He selittivät erottumisen johtuvan analyytin ja ioninesteen anionin välillä tapahtuvasta heterokonjugaatiosta.

Vaherin ja Koelin<sup>35</sup> tutkimus antoi selkeän tuloksen, ettei ACN yksin pysty varaamaan fenoliyhdisteitä, vaan taustaelektrolyytin lisäys oli välttämätöntä. Tutkimuksessa elektrolyytteinä käytettiin tetrabutyyliammoniumasettaattia, 1-butyyl-3-metyyli-imidatsoliumfluoriasetaattia ja 1-butyyl-3-metyyli-imidatsoliumheptafluoributanaattia. Imidatsoliumsuolojen eri anionit eivät vaikuttaneet juurikaan liikkuvuuksiin, mikä kertoo suolan kationin merkitsevyydestä kapillaarin pinnan muokkaamisessa. Vaikka elektrolyytit muuttavat EOF:sta merkitsevästi jo alhaisilla pitoisuuksilla (eivät silti pysty muuttamaan EOF:n suuntaa), erilaisilla orgaanisilla kationisilla taustaelektrolyyttisäilyksillä (imidatsolium ja ammonium) ei ollut suurtakaan merkitystä EOF:een.

#### 4.4.2 Kvaternääriset ammoniumsuolat

Kvaternäärisiä ammoniumsuoloja on käytetty BGE-liuoksissa kohtalaisen paljon, mm. Tjørnelund ja Hansen<sup>38</sup> tutkivat niiden vaikutuksia neutraalien yhdisteiden erottumiseen. Kuitenkin hyvin vähän on tutkimuksissa puhuttu juuri ioninesteistä. Laamanen *et al.*<sup>19,39</sup> ovat tutkimuksissaan valmistaneet kyseisiä ioninesteitä. Erottaessaan useita kuparikelaatteja NMF:ssä, he käyttivät elektrolyyttinä kahta valmistamaansa ioninestettä, dimetyylidiodioktyyliammoniumbromidia (DMDOAB) ja dimetyylidinonyyliammo-

niumbromidia (DMDNAB).<sup>19</sup> Näistä DMDNAB reagoi paremmin analyytin kanssa tuottaen korkeammat resoluutiot. Tutkimuksessa testattiin myös kolmea muuta kvaternääristä ammoniumbromidia (dimetyyliidiheksyyli- (DMDHAB), dimetyyliidiheptyyli- (DMDHeAB) ja dimetyylididekyyliammoniumbromidia (DMDDAB), jotka kaikki osoittautuivat käyttökelpoisiksi elektrolyyteiksi kuparikelaattien erottamisessa, mutta mielenkiintoisesti DMDNAB oli paras analyytin vyöhykkeiden resoluutioiden sekä tehokkuuksien perusteella. Kyseisellä elektrolyyttisäyksellä saatiin myös jo noin 5 min lyhyempi analyysiaika kuin edellisessä NACE-tutkimuksessa<sup>40</sup>, jossa elektrolyyttinä käytettiin kaliumbromidia.

#### 4.5 Kiraaliset selektorit

Kiraalisia selektoreita käytetään yhdisteiden optisten isomeerien erotteluun. Syklodekstriinit (CD) ja sen johdannaiset kuuluvat suosituimpiin käytettäviin selektoreihin NACE:ssä.<sup>24,41</sup> Ne ovat D(+)-glukopyranoosiyksiköistä valmistettuja oligosakkarideja, joilla on alhainen UV-absorbanssi sekä liukoisuus veteen.<sup>42</sup> NACE:ssä käytettyjä CD:tä ovat mm. kuusi ( $\alpha$ -CD), seitsemän ( $\beta$ -CD) tai kahdeksan ( $\gamma$ -CD) glukopyranoosiyksikköä sisältävät yhdisteet. Enantiomeerien erottelu perustuu kiraalisen analyytin ja CD:n välillä muodostuvaan kompleksiin.

Servais *et al.*<sup>41</sup> käyttivät heptakis(2,3-di-*O*-metyyli-6-*O*-sulfaatti)- $\beta$ -syklodekstriiniä (HDMS- $\beta$ -CD) kiraalisena selektorina metanolisessa taustaelektrolyytissä emäksisten lääkeaineiden erottelussa, Bitar *et al.*<sup>43</sup> taas totesivat proteaasi-inhibiittoreiden aziridiinien isomeerien erottelussa heptakis(2,3-di-*O*-asetyyli-6-*O*-sulfaatti)- $\beta$ -syklodekstriinin (HDAS- $\beta$ -CD) antavan paremman resoluution sekä lyhyemmän migraatioajan kuin HDMS- $\beta$ -CD. Lisäksi he huomasivat MeOH:n ollessa liuottimena kiraalista selektoria tarvittavan huomattavan määrän erottumisen onnistumiseen.  $\beta$ -CD liukeneekin heikosti MeOH:iin ja muiden liuottimien käyttö voisi olla suositeltavaa sen käytössä.<sup>44</sup> Emäksisten lääkeaineiden enantiomeerien erottumista MeOH:ssa vertailtiin kamferisulfonaatin, alkaanisulfonaattien sekä erilaisten anionisten  $\beta$ -CD:ien johdannaisten tai HDMS- $\beta$ -CD:n toimiessa elektrolyyttisinä.<sup>45</sup> Parhaaksi BGE:ksi valittiin HDMS- $\beta$ -CD:n ja kamferisulfonaatin seos. Li ja Vigh<sup>46</sup> erottelivat uudella yksittäisellä isomeerillä heptakis(2,3-diasetyyli-6-*O*-sulfaatti)- $\alpha$ -syklodekstriinillä (HxDAS- $\alpha$ -CD) heikkoja emäksiä vaihtelevalla menestyksellä. Emästen ja HxDAS:n väliset vuorovaikutukset olivat hei-

komppia kuin HDAS- $\beta$ -CD:llä tai oktakis(2,3-diasetyyli-6-*O*-sulfaatti)- $\gamma$ -syklodekstriinillä (ODAS-  $\gamma$ -CD).

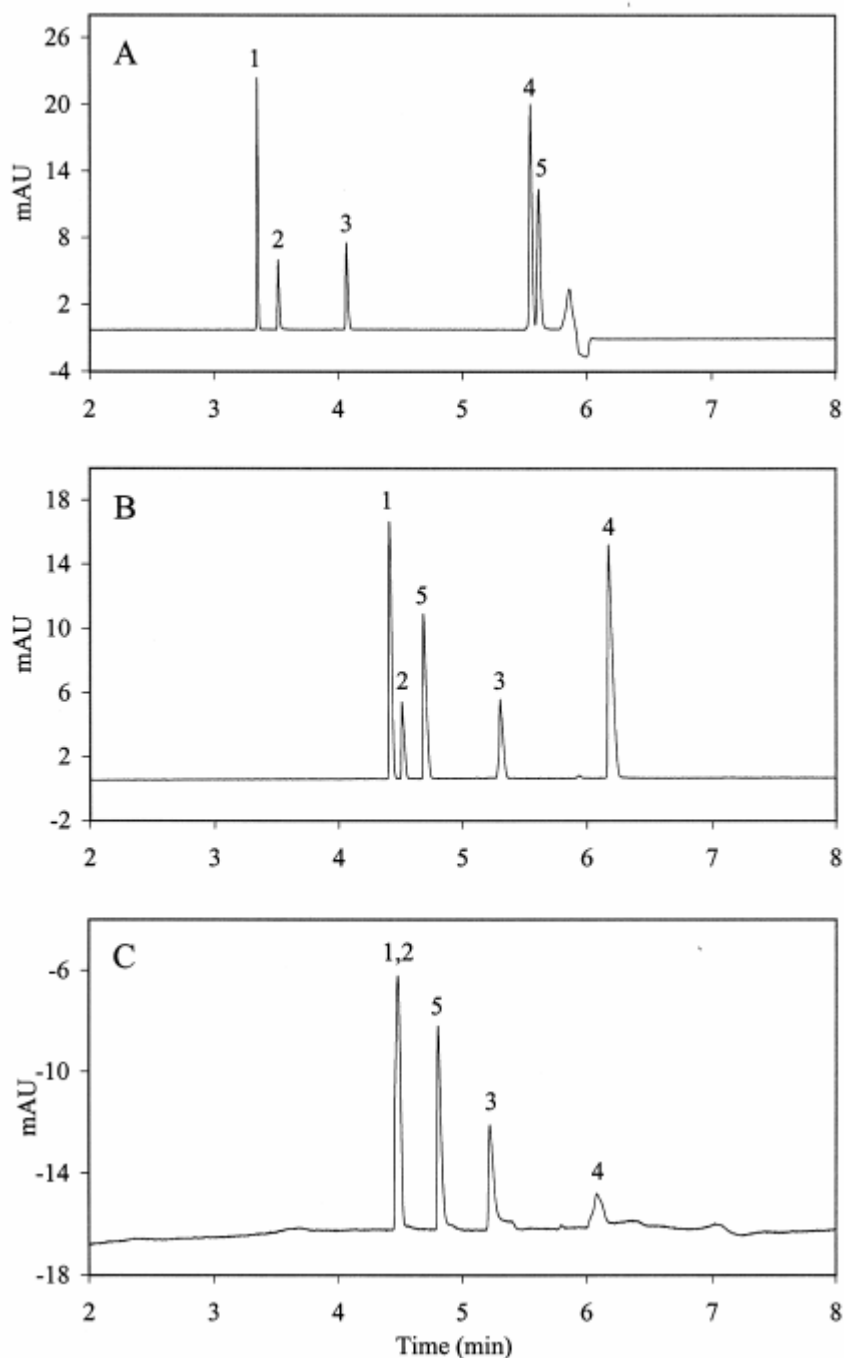
#### 4.6 Elektrolyyttiä vertailua

BGE:iin lisättävillä kationeilla ja anioneilla voi olla suurikin vaikutus analyttien erottumiskäyttäytymiseen. Sekä neutraalien fenolien erottamisessa heterokonjugaatiolla<sup>10</sup> (liuottimena ACN) että kationisten lääkeaineiden erottamisessa<sup>1</sup> (liuottimena MeOH /ACN-seos 50:50 (v/v)) elektrolyytin anioneista asetaatilla saatiin paras erottuminen verrattuna Cl- ja Br-anioneihin, joskin lääkeaineiden erottelussa Cl-anioni voisi myös olla varteenotettava vaihtoehto (kuva 2, s.18). Lisäksi fenolien erottamisessa perklooraatti- ja dimalonaattianioneilla (tetrabutyyliammoniumsuoloja) ACN:ssä heterokonjugaattien muodostuminen onnistui mutta erottumista ei saatu aikaan.<sup>10</sup> Porras *et al.*<sup>1</sup> totesivat myös, että alkalimetallikationin koon kasvaessa elektro-osmoottinen virtaus väheni sekä analyysi-aika kasvoi huomattavasti.

Suolojen lisäykset vähensivät odotetusti liuottimien liikkuvuutta totesivat Vaher ja Koel<sup>35</sup> tutkiessaan erilaisten elektrolyyttiä vaikutuksia. ACN:llä liikkuvuuden väheneminen suolaa lisättäessä oli selkeästi suurin, kun taas MeOH:lla ja PC:lla muutos oli vähäisempää. Tutkimuksessa elektrolyytteinä käytettiin tetrabutyyliammoniumasettaattia, 1-butyyl-3-metyyli-imidatsoliumfluoriasetaattia ja 1-butyyl-3-metyyli-imidatsoliumheptafluoributanaattia.

Elektrolyyttiä valitessa tulee ottaa huomioon, että liuoksessa tapahtuu hyvin usein ioniassoosiaatioita, jotka eivät ole haluttuja. Carabias-Martínez *et al.*<sup>20</sup> huomasivat tutkimuksessaan triatsiinien käyttäytymistä MeOH-ACN-liuoksessa, johon lisättiin SDS:a ja perkloorihappoa, että elektrolyytti-ionien (Na<sup>+</sup> reagoi dodekyylisulfaatti- sekä perklooraatti-anionien kanssa) välillä tapahtuu ioniassoosiaatiota, ja ACN:n tilavuutta kasvatettaessa assosiaatiot lisääntyivät. Tutkimuksessaan he totesivat ioniparien muodostumista analyysiliuoksessa tapahtuvan myös analyttien ja elektrolyyttiä välillä; todelliset liikkuvuudet olivat korkeampia kuin efektiiviset liikkuvuudet ionivahvuuden funktiona. Nämä analyttien ja elektrolyyttien väliset assosiaatiot todettiin olevan voimakkaampia dodekyylisulfaatti-ionin kanssa.





Kuva 2. Ammonium(A)asetaatin, -(B)kloridin ja -(C)bromidin vaikutus positiivisesti varautuneiden lääkeaineiden erotteluun MeOH/ACN-liuoksessa (50:50 v/v).<sup>1</sup>

Descroix *et al.*<sup>22</sup> tutkivat erottaessaan amfetamiineja ACN-MeOH-seoksessa (80:20 v/v) asetaatti- ja formiaatti-ionin vaikutuksia erottumiskäyttäytymiseen. Molemmilla amfetamiineilla olivat täysin protonoituneita, jolloin ei tarvinnut välittää erilaisten efektiivisten varausten vaikutuksesta selektiivisyydenmuutoksiin. Molemmilla ioneilla ionivahvuus vaikutti selektiivisyyteen, mutta tutkimukset antoivat olettaa, että myös jokin muu ilmiö vaikuttaa siihen. Mitä todennäköisimmin kyseessä on ioniparien muodostuminen, mikä asetaatin kohdalla todettiin olevan hyvin todennäköistä. Formiaatin kohdalla ionipari-

tumista ei kuitenkaan pystytty todistamaan, ja tutkijat epäilivät selektiivisyystutkimuksissa esille tulleiden erojen johtuvan solvaatiovaikutuksista.

Syklodekstriinien lisäksi kiraalisten yhdisteiden erottumiseen vaikuttaa suuresti myös muut elektrolyyttilisät; kationiset BGE-komponentit tuntuvat kilpailevan analyttien kanssa CD-kompleksien muodostuksesta ja anioniset BGE-komponentit emäksisten analyttien kanssa ionipariutumisesta.<sup>41</sup> Yksistään kamferisulfonaatissa tai neutraalissa CD:ssä ei saatu enantiomeerejä erottumaan ollenkaan. HDMS- $\beta$ -CD:ssä ei saatu kaikkia enantiomeerejä eroteltua, mutta sen ja kamferisulfonaatin sekoituksessa saatiin, ja vain yhden yhdisteen enantiomeerien erottuminen oli tehokkaampaa pelkästään HDMS- $\beta$ -CD:ssä.<sup>45</sup> HDMS- $\beta$ -CD:n ja kamferisulfonaatin seoksen jatkotutkimuksissa tutkijat huomasivat kamferisulfonaatin pitoisuuden lisäämisen vaikuttavan kolmella viidestä analyttistä nousevasti resoluutioon. Kovin suuriin pitoisuuksiin (max 40 mM) ei voitu kuitenkaan mennä liuotusominaisuuksien heikentymisen vuoksi. Myös Servais *et al.*<sup>41</sup> totesivat kamferisulfonaatin olevan potentiaalinen komponentti kiraalisten yhdisteiden BGE:ssä. Lisäksi he totesivat Na-suolojen heikentävän erottelua huomattavasti paikallisuudutteen sekä  $\beta$ -salpaajien enantiomeerien erottelussa jopa saaden erottumisen täysin katoamaan.

## 5. LIUKSEN pH JA ANALYYTTIEN HAPPO-EMÄS-KÄYTTÄYTYMINEN SEKÄ IONISAATIOVAKIOT

### 5.1 Liuoksen pH

NACE:ssa liuoksen pH toimii tärkeänä muuttujana erottumisen onnistumiselle. Ideaalinen analyysi-pH olisi suurempi kuin analyytin  $pK_a - 2$ .<sup>16</sup> Tällöin analyytin dissosioitumisen voitaisiin katsoa tapahtuvan ainakin osittain. pH-arvoa on kuitenkin hankalampi mitata orgaanisissa liuottimissa, varsinkin kun pH-mittauksissa käytettävät kalibrointi-liuokset ja elektrodin sisällä olevat nesteet ovat vesipohjaisia. Useasti NACE:ssa, mm. Laamasen *et al.* tutkimukset<sup>19,40</sup> käytetäänkin arvoa  $pH_{app}$  (apparent = näennäinen), joka on saatu käyttäen vesipohjaisia kalibrointi- ja elektrodiliuoksia. Tämä arvo ei kuitenkaan ole realistinen, ja todelliset arvot saattavat olla hyvinkin erilaiset.

Elektrolyyttilisät vaikuttavat paljon pH-arvoon, ja näiden avulla on joissakin tapauksissa mahdollista laskea BGE-liuoksen pH.<sup>47</sup> Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää Henderson-Hasselbachin yhtälöä. pH-arvoja ei siis tarvitse mitata millään laitteella, vaan yhdistetään oikeat määrät kyseistä happoa ja sen suolaa. BGE-liuoksessa ei saa kuitenkaan tapahtua muita reaktioita kuin protolyysiä (esim. ionipariutumisen väärinä arvoja), ja lisäksi yhtälön käyttöön tarvitsee tietää kyseisen hapon  $pK_a$ -arvo käytetyssä liuottimessa. Tämä ominaisuus rajaa selvästi käytettävien liuottimien ja happojen määrää. Porras *et al.*<sup>47</sup> on esitellyt tällaisen vaihtoehtoisen pH-asteikon. Se saatiin käyttämällä tunnettuja happoja ja niiden kirjallisuus- $pK^*_a$ -arvoja metanolissa. Kyseisiksi hapoiksi valittiin etikka-, kloorietikka -, diklooriaetikka -, ja trikloorietikkahappo. Hapot eivät juuri absorboi CE:n normaaleilla detektointiaallonpituuksilla ja ovat myös siksi käyttökelpoisia. Näitä happoja ja niiden suoloja otettiin yhtä paljon, ja tällöin  $pH_{app}$ -arvojen täytyisi korreloida  $pK^*_a$ -arvoja. MeOH:ssa kuitenkin huomattiin, että  $pH_{app}$ -arvot olivat noin 2,7 yksikköä alhaisemmat kuin  $pK^*_a$ -arvot, kuten taulukosta 3 näkyy. Tämä johtuu hyvin todennäköisesti pH-mittarin vedellisestä lasielektrodista ja vesipohjaisista kalibrointi-liuoksista. Olisi siis suositeltavampaa käyttää tätä vaihtoehtoista menetelmää, jos vain BGE-olosuhteet sen sallivat.

Taulukko 3. Erilaisten taustaelektrolyytteinä käytettyjen etikkahappojen  $pK_a$ - ja pH arvot vedessä ja MeOH:ssa<sup>47</sup>

Acid	Water		Methanol	
	$pK_a$	pH	$pK_a^*$	pH
Acetic	4.756 [41]	4.73	9.7 [21]	6.99
Chloroacetic	2.87 [41]	2.92	7.8 [21]	5.10
Dichloroacetic	1.35 [41]	2.23 <sup>b</sup>	6.3 [21]	3.72
Trichloroacetic	0.63 [42], 0.70 [19,20]	2.16 <sup>b</sup>	4.90 [19,20]	2.26

<sup>a</sup> The pH was measured with a combined all aqueous glass electrode, calibrated with aqueous buffers. Temperature, 25°C.

<sup>b</sup> Note that these solutions are composed from a strong acid (in aqueous media) and its salt; it does not follow the Henderson–Hasselbalch equation, and its pH is not equal to the  $pK_a$  of the acid.

Porras *et al.*<sup>47,48</sup> ovat käyttäneet Henderson–Hasselbachin yhtälön avulla laskettuja pH-arvoja metanolisessa liuoksessa, koska MeOH on amfiproottisena korkean dielektrisyysvakioiden omaavana yhdisteenä luotettava (joskin myös haitallisia reaktioita voi tapahtua) liuotin tähän käyttötarkoitukseen.  $pH_{app}$ -arvot kuitenkin erosivat selvästi  $pK_a^*$ -arvoista Porraksen tutkimuksessa<sup>47</sup>, ja ero oli selkeästi suurempi orgaanisessa liuotimessa kuin vedessä. Myös mm. Sirén *et al.*<sup>49</sup> käyttivät kyseistä tapaa tutkiessaan kationisia ja anionisia lääkkeitä MeOH:ssa. Psurek ja Scriba<sup>50</sup> vertasivat kahta pH-mittausmenetelmää erottaessaan pieniä peptidejä MeOH:ssa ja huomasivat analyyttien  $pK_a$ -arvojen olevan 2,7 yksikköä alhaisemmat liuoksen  $pH_{app}$ -arvolla kuin Porraksen pH-skaalan antamalla arvolla.

Porras *et al.*<sup>10</sup> erottivat neutraaleja metyyli-substituoituja fenoleita ACN:ssä korkeilla pH-arvoilla. Mahdolliset epäpuhtaudet ACN:ssä (esim. vesi tai MeOH) saattavat vaikuttaa liuoksen pH-arvoon ja tätä kautta analyyttien erottumiseen. Korkean pH-arvon saavuttamiseksi puskurina käytettiin joko oksaali- tai malonihappoa (molemmat diproottisia karboksyylihappoja, joiden  $pK_{a,2}$ -arvot tarpeeksi korkeat), jotta edes analyyttien osittainen dissosiaatio saavutettaisiin. Näistä malonihappo todettiin käyttökelpoiseksi. Oksaalihapossa, koska liuotinseos sisälsi MeOH:a, pH todennäköisesti laski teoreettisesta sen verran, että erottuminen ei perustunut dissosiaatioon vaan heterokonjugaattien muodostumiseen analyytin ja oksalaatti-ionin välillä.

## 5.2 Analyyttien happo-emäs-käyttäytyminen sekä ionisaatiovakiot

Tutkittaessa substituoituja bentsoehappoja metanolissa huomattiin, että tutkimuksessa saadut  $pK_a^*$ -arvot vastasivat hyvin kirjallisuuden arvoja (taulukko 4).<sup>48</sup> Tulokset saatiin

käyttämällä epälineaarisen suoran sovitusta käyrään efektiivinen elektroforeettinen liikkuvuus pH-arvojen funktiona.

Taulukko 4. Bentsoehappojen mittauksissa saadut  $pK_a^*$ -arvot sekä kirjallisuusarvot metanolissa<sup>48</sup>

Symbol	Analyte	$pK_a^*$ (Eq. 8)	$pK_a$ (Ref.)
a	2,4-Dichlorobenzoic acid	7.89	7.80 [20]
b	2,6-Dichlorobenzoic acid	7.04	7.05 [20]
c	2-Hydroxybenzoic acid	7.90	7.85 [21]
d	2,4-Dihydroxybenzoic acid	8.48	–
e	2,5-Dihydroxybenzoic acid	8.04	–
f	2,4,6-Trihydroxybenzoic acid	5.98	–

Analyyttien  $pK_a$ -arvojen on usealta taholta todettu nousevan verrattuna veteen. Syyinä tähän on yleensä analyyttien erilaiset vuorovaikutukset orgaanisen liuottimen kanssa. Mm. Muzikarin *et al.*<sup>11</sup> tutkiessa PC:a vedettömänä liuottimena he huomasivat alifaattisten amiinien  $pK_a$ -arvojen nousevan keskimäärin 7-8 yksikköä verrattuna veteen. Tämä nousu johtui protonin epästabiloitumisesta PC:ssa, kationihapon  $HB^+$ :n stabilisatiosta PC:ssa sekä molekulaarisen emäksen B:n stabilisoitumisesta PC:ssa. Näiden kolmen yksittäisen tekijän yhteenlasketuksi eroksi saatiin laskennallisesti  $pK_a$ -arvojen nousuminen noin kahdeksalla yksiköllä, joka siis vastaa hyvin tutkimuksessa saatua nousua. Kationisten happojen  $pK_a$ -arvojen nousun perimmäinen syy on kuitenkin PC:n huomattavasti alhaisempi emäksisyys verrattuna veteen.  $pK_a$ -arvojen muuttuminen B:n paremmasta liukoisuudesta orgaaniseen liuottimeen ja  $HB^+$ :n stabiloitumisen seurauksena näyttäisivät kumoavan toisensa. Porras ja Kennndler<sup>51</sup> taas huomasivat kloori- ja typpi-substituoitujen fenolaattien  $pK_a$ -arvojen nousevan 3-4,4 yksikköä DMF:ssa verrattuna veteen. Myös tämän nousun aiheutti analyyttianionien epästabiloituminen sekä molekulaarisen analyyttihapon parempi liukoisuus DMF:iin. Lisäksi Sirén *et al.*<sup>49</sup> totesivat  $pK_a$ -arvojen nousevan tutkiessaan happamia ja emäksisiä lääkeaineita 5-6 yksikköä happamat ominaisuudet omaavilla anionisilla analyyteillä ja emäksiset ominaisuudet omaavilla kationisilla analyteillä 2 yksikköä MeOH:ssa verrattuna veteen.

## 6. LIIKKUVUUDET

Analyyttien erottuminen perustuu niiden erilaisiin liikkuvuuksiin sähkökentässä elektrolyyttiliuoksella täytetyssä kapillaarissa.<sup>52</sup> Erilaisten liikkuvuuksien avulla pystytään paremmin ennustamaan analyyttien käyttäytymistä kapillaarin sisällä sekä valitsemaan sopivimmat liuottimet eri analyysitarkoituksiin. Liuoksessa ioni saavuttaa lähes välittömästi vakionopeuden, kun työntävä voima ja kitkavoima ovat yhtä suuret. Tästä saadaan elektroforeettinen liikkuvuus, joka on suoraan verrannollinen ionin varaukseen sekä kääntäen verrannollinen kitkakertoimeen. Elektroforeettisen liikkuvuuden kaava on esitetty alla (2).

$$u_{ep} = q E / f \equiv \mu_{ep} E \quad (2)$$

, missä  $u_{ep}$  = ionin elektroforeettinen nopeus,  $q$  = ionin varaus,  $E$  = sähkökentän voimakkuus,  $f$  = kitkakerroin ja  $\mu_{ep}$  = elektroforeettinen liikkuvuus.

Myös koko liuoksella on oma liikkuvuutensa kapillaarin sisällä.<sup>52</sup> Silikakapillaarin sisälle muodostuu sähköinen kaksoiskerros, kun negatiiviset silanoliryhmät vetävät kapillaarin seinämän lähelle kationeita tiiviisti kiinni, jotka osittain myös neutraloivat negatiivista varausta. Loput negatiivisesta varauksesta neutraloituu kaksoiskerroksen diffuusio-osan kationeilla. Sähkökentässä anionit liikkuvat kohti anodia ja kationit kohti katodia. Kaksoiskerroksen diffuusio-osassa olevan kationiylimäärän johdosta nettovirtaus kapillaarin sisällä liikkuu yleensä kohti katodia. Tätä kapillaarin sisällä tapahtuvaa pumppaustapahtumaa kutsutaan elektro-osmoosiksi, ja se muodostaa elektro-osmoottisen virtauksen. Elektro-osmoottinen liikkuvuus (3) on elektro-osmoottisen nopeuden (4) ja sähkökentän voimakkuuden suhde.

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta} \quad (3)$$

, missä  $\varepsilon$  = dielektrisyysvakio,  $\zeta$  = Zeta-potentiaali ja  $\eta$  = viskositeetti.

$$u_{eo} = \mu_{eo} E \quad (4)$$

, missä  $u_{eo}$  = ionin elektro-osmoottinen nopeus,  $E$  = sähkökentän voimakkuus ja  $\mu_{eo}$  = ionin elektro-osmoottinen liikkuvuus

Teoreettisesti on mahdollista laskea ionin absoluuttinen liikkuvuus, joka saadaan, kun ionivahvuus on nolla.<sup>3</sup> Sen kaava on esitetty alla (5).

$$\mu_{abs} = \frac{z_i e}{6\pi\eta r_{s,i}} \quad (5)$$

, missä  $z_i$  = ionin varausnumero,  $e$  = elementaarinen varaus (elektronin varaus) ja  $r_{s,i}$  = ionin Stokesin säde.

NACE:ssa käytetään absoluuttista liikkuvuutta enemmän todellisen liikkuvuuden käsitettä.<sup>3</sup> Todellinen liikkuvuus kuvaa täysin varautuneen ionin liikkuvuutta nollaa suuremmalla ionivahvuudella. Sen kaava (6) voidaan johtaa Kohlrauschin konduktiivisuuden kaavasta.

$$\mu_{act} = \mu_{abs} - \left[ \frac{8,204 * 10^5}{(\epsilon T)^{3/2}} \mu_{abs} + \frac{4,275}{\eta(\epsilon T)^{1/2}} \right] \sqrt{I} \quad (6)$$

, missä  $T$  = absoluuttinen lämpötila Kelvineinä sekä  $I$  = ionivahvuus =  $0,5 \sum c_i z_i^2$ , jossa  $c$  = molaarinen konsentraatio.

Efektiivisestä liikkuvuudesta puhuttaessa tarkoitetaan heikkojen elektrolyyttien liikkuvuuksia, jotka ovat riippuvaisia niiden dissosiaatioasteesta ( $\alpha$ ).<sup>3</sup> Alla (7 ja 8) on esitettyinä happoanionin sekä happokationin efektiivisen liikkuvuuden kaavat.

$$\mu_{eff} = \alpha \mu_{act} = \frac{\mu_{act}}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (7)$$

$$\mu_{eff} = \alpha \mu_{act} = \frac{\mu_{act}}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad (8)$$

Havaittu (apparent) liikkuvuus (9) saadaan ionin elektroforeettisen ja liuoksen elektroosmoottisen liikkuvuuden summasta.<sup>52</sup>

$$\mu_{app} = \mu_{ep} + \mu_{eo} \quad (9)$$

Kationeille  $\mu_{app}$  on suurempi kuin  $\mu_{ep}$ , koska kationit liikkuvat samaan suuntaan kuin elektro-osmoottinen virtaus, ja  $\mu_{ep}$  ja  $\mu_{eo}$  ovat samanmerkkiset. Anioneita elektroforeesi taas kuljettaa eri suuntaan kuin elektro-osmoosi, joten anionien liikkumissuunta riippuu liuoksen pH-arvosta. Neutraali tai korkea pH liikuttaa anioneita kohti katodia, kun taas alhaisilla pH-arvoilla ne liikkuvat kohti anodia, mutta koska elektro-osmoosi on heikko, anionit eivät ehkä koskaan saavuta detektoria.

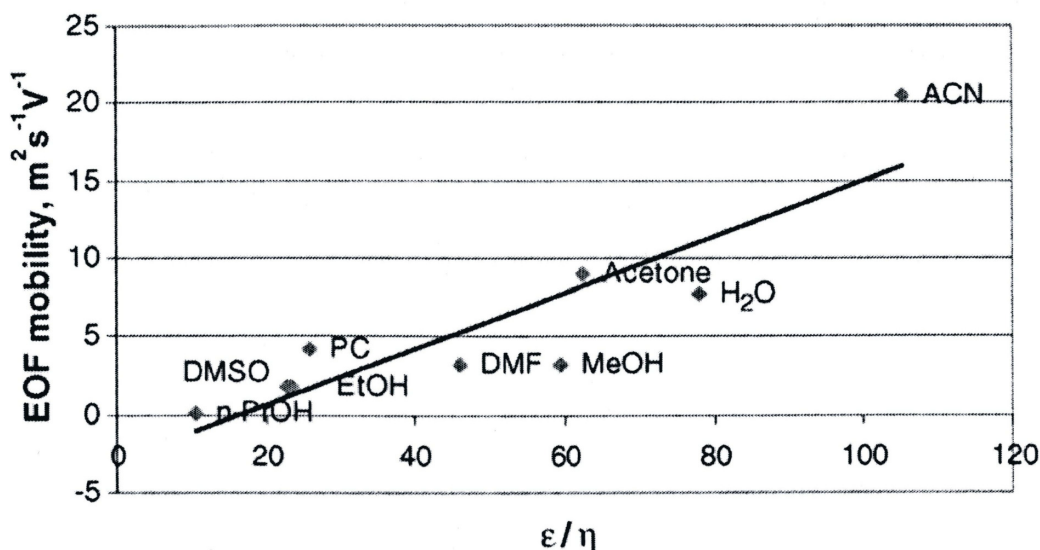
### 6.1 Elektroforeettinen ja elektro-osmoottinen liikkuvuus

Elektroforeettiseen liikkuvuuteen vaikuttaa ioniassoosiaatio, lähinnä sen ennustamaton voimakkuus, ja ioniparien muodostuminen.<sup>11</sup> Se on suoraan verrannollinen sekä  $\varepsilon/\eta$ -suhteeseen että efektiiviseen liuottimen varaus-liuotussäde suhteeseen, ja tämän vuoksi liuenneiden analyyttien säde kasvaa tai efektiiviset varaukset vähenevät ACN:ä lisättäessä.<sup>1</sup> On myös mahdollista, että positiivisesti varautuneet analyytit ja asetaatti-ioni vuorovaikuttavat toistensa kanssa enemmän korkeammilla asetonitriilipitoisuuksilla. Kolmen erilaisen seoksen (MeOH:PC, MeOH:ACN, ja PC:ACN) elektroforeettisen liikkuvuuden tutkimuksissa huomattiin, että MeOH:PC-seoksen suhde ei juuri vaikuttanut liikkuvuuteen, mutta ACN-seoksissa sen sijaan ACN:n väheneminen pienensi liikkuvuutta huomattavasti.<sup>35</sup> Tämä johtuu MEOH:n ja PC:n  $\varepsilon/\eta$ -suhteiden samanarvoisuudesta, kun taas ACN:lla on selkeästi korkein zeta-potentiaali. Myös Porras *et al.*<sup>1</sup> totesivat ACN:n lisäävän analyyttien elektroforeettista liikkuvuutta aina 50 % (v/v) asti, kun taas viskositeetti laski suuresti lisäyksien johdosta (eli paikat vaihtuivat). Erotusikunan laajuutta sekä resoluutiota että migraatioaikoja pystyttiin vaihtelemaan muuttamalla elektrolyyttianionia tai -kationia.

Vaher ja Koel<sup>35</sup> tutkivat eri liuottimien sekä liuotinseosten vaikutusta elektro-osmoottiseen liikkuvuuteen. Elektro-osmoottinen liikkuvuus vaihteli paljon eri liuottimilla (kuva 3), ja elektro-osmoottisen liikkuvuuden ja  $\varepsilon/\eta$ -suhde erosi kuitenkin selvästi lineaarisesta riippuvuudesta puhtailta liuottimilla. Tämä voi johtua mm. liuottimien erilaisista vuorovaikutuksista kapillaarin silikaseinämään tai liuottimien erilaisesta polaarisuudesta, joka vaikuttaa kapillaarin sähköiseen kaksoiskerrokseen. Vertailemalla  $\varepsilon/\eta$ -suhdetta pystytään kuitenkin hyvin arvioimaan liuottimen elektro-osmoottista liikkuvuutta. Kun vertailussa otetaan lisäksi vielä huomioon DN ja AN, saadaan vielä parempi arvio halutun liuottimen käyttäytymiselle. Geiser *et al.*<sup>7</sup> todistivat tämän tutkiessaan



27 erilaista liuotinkompositiota. Porraksen *et al.*<sup>1</sup> tutkimuksessa, jossa selvitettiin elektrolyytin ja liuotinkomposition vaikutuksia muutamien lääkeaineiden erottumiseen, saatiin selville, että asetonitriilin lisäys vähentää viskositeettiä huomattavasti. Tämä nostaa liuoksen elektro-osmoottista liikkuvuutta. Lisäksi zeta-potentiaalin nousu lisää liikkuvuutta, ja Valkó *et al.*<sup>53</sup> ovat todistaneet, että ACN:ssä ilman ionisia lisättäviä zeta-potentiaali on korkeampi kuin MeOH:ssa.



Kuva 3. Elektro-osmoottinen liikkuvuus eri liuottimilla  $\epsilon/\eta$  -suhteen funktiona.<sup>35</sup>

Orgaaninen liuotinkompositio vaikuttaa merkittävästi EOF:een. Negatiivinen varaus kapillaarin sisäseinämässä (ja normaalisti katodinen EOF) johtuu pääosin silanoliryhmien dissosioitumisesta ( $\text{Si-O-H} \rightarrow \text{Si-O}^-$ ). Vahvan emäsvahvuuden omaavilla liuottimilla, joilla siis suuri DN, EOF on katodinen, kuten Grob ja Steiner<sup>54</sup> tutkiessaan seitsemän erilaisen liuottimen (vesi, MeOH, ACN, FA, NMF, DMF ja DMSO) vaikutusta EOF:een todistivat. Negatiivinen varaus kapillaarin silikaseinämässä, ja täten katodinen EOF, aiheutuukin juuri silanoliryhmien dissosioitumisesta.

Käyttäessään 2-naftaleenisulfonihappoa (NSAH) elektrolyyttinä pinta-aktiivisten aineiden erottelussa Grob ja Steiner<sup>54</sup> huomasivat MeOH:n ja DMSO:n vaihtavan EOF:n anodiseksi. Tutkijat arvelivat heikompien emäsvahvuuden omaavien liuottimien (pienempi DN kuin vedellä) aiheuttavan positiivisen varauksen kapillaarin silikaseinämään NSAH:n protoninluovutus reaktiolla. Liuoksessa NSAH pystyy luovuttamaan protonin silikaseinämään aiheuttaen kyseisen positiivisen varauksen ja täten anodisen EOF:n. Porrax *et al.*<sup>1</sup> taas totesivat EOF:n vähenevän elektrolyytin (metalliasetaatti)

alkalimetallikationin koon kasvaessa. Vaikutus ei voi johtua viskositeetistä, koska elektrolyyttiä oli hyvin pieni määrä, mutta se voi johtua suurempien kationien voimakkaammasta adsorboitumisesta kapillaarin silikaseinään. Tällä tavalla kationi pystyy vaihtelevaan varaustaan ja vaikuttamaan EOF:een. Grobin ja Steinerin tutkimuksessa<sup>54</sup> todettiin vielä, että ACN:n ja DMF:n toimiessa liuottimina EOF kuitenkin pysyi katodisena toisin kuin MeOH:n ja DMSO:n tapauksesta voisi päätellä. Tutkijat ehdottivat, että liuottimet ovat sen verran heikkoja emäksiä, etteivät pysty kunnolla solvatoimaan NSA<sup>-</sup> ionia. Tämä aiheuttaa ionin epästabiilisuuden liuoksessa, ja tästä johtuen ioni konsentroituu silikakerroksen ja liuoksen väliin tukien silikakerroksen anioniassosiaatiota. Näin EOF säilyy katodisena.

Grob ja Steiner<sup>54</sup> huomasivat emäksisen elektrolyyttiä (trietyyliamiini) läsnä ollessa (liuoksessa myös NSAH) MeOH:n EOF:n muuttuvan katodiseksi. Tämä johtuu liuoksen kasvaneesta emäsvahvuudesta, joka tukee silanoliryhmien dissosiaatiota. Aproottisella DMSO:lla oli havaittavissa samankaltainen reaktio tarpeeksi suurilla trietyyliamiinipitoisuuksilla. Muilla aproottisilla liuottimilla (ACN ja DMF) EOF säilyi katodisena myös trietyyliamiinin läsnä ollessa. Katodinen EOF aiheutuu todennäköisesti korkean emäsvahvuuden saavuttaneilla liuoksilla myös silanoliryhmien dissosiaatiosta. Etikkahappoa lisättäessä EOF säilyi myös kyseisillä aproottisilla liuottimilla katodisena, mutta tällä kertaa sen aiheutti todennäköisesti sekä silanoliryhmien dissosiaatio että anioniassosiaatiot.

## 6.2 Todellinen ja efektiivinen liikkuvuus

Todellinen liikkuvuus tarkoittaa ionin liikkuvuutta tietyllä ionivahvuudella (>0) silloin, kun se on täysin varautunut. Efektiivisessä liikkuvuudessa taas on otettu huomioon ionin osittainen dissosiaatioaste. Se saadaan siis todellisesta nopeudesta, jossa on otettu huomioon analyytin ionisaatioaste (ks. s.24, kaavat 7 ja 8). Sirén *et al.*<sup>49</sup> totesivat migraatioaikojan vastaavan hyvin efektiivisiä liikkuvuuksia tutkiessaan kationisten ja anionisten lääkeaineiden erottumista MeOH:ssa. Tutkijat osoittivat, että tutkittavan liuoksen yhdisteiden pK<sub>a</sub>-arvojen ja todellisten liikkuvuuksien selvittäminen ennen mittauksia helpottaa valitsemaan sopivimmat koeolosuhteet sekä lyhentämään menetelmän optimointiaikaa.

Myös todellisten liikkuvuuksien on huomattu kasvavan ACN-pitoisuuden lisääntyessä MeOH-ACN-seoksessa.<sup>15</sup> Alla on taulukoituna (taulukko 5) Porraksen *et al.*<sup>15</sup> saamat aniliini-ionien todelliset liikkuvuudet vedessä, MeOH:ssa, ACN:ssä sekä MeOH-ACN-seoksissa.

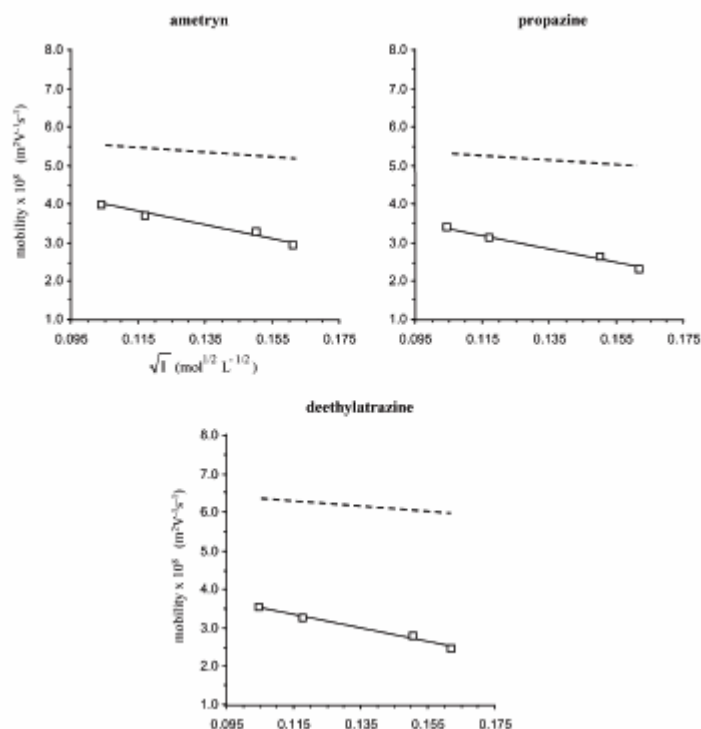
Taulukko 5. Aniliini-ionien todelliset liikkuvuudet liuksissa, joissa eri määrät MeOH ja ACN. Liikkuvuudet vedessä on esitetty vertailun vuoksi.<sup>15</sup>

Analyte	Abbreviation	$\mu_{\text{act},i}$ ( $\cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )					
		Water	MeOH-ACN (100:0)	MeOH-ACN (75:25)	MeOH-ACN (50:50)	MeOH-ACN (25:75)	MeOH-ACN (0:100)
Aniliniun	An	34.24	39.93	48.63	55.59	60.08	59.93
2-Methylanilinium	2MeAn	31.19	37.48	46.35	53.36	58.1	57.99
3-Methylanilinium	3MeAn	31.51	38.54	47.09	53.82	58.31	57.82
4-Methylanilinium	4MeAn	31.19	37.85	46.34	53.1	57.54	56.97
2,6-Dimethylanilinium	2,6diMeAn	28.87 <sup>a</sup>	36.69	45.51	52.61	57.66	57.44
<i>N</i> -Isopropylanilinium	<i>N</i> -iPrAn	26.33	36.48	45.85	53.33	58.18	55.45

The solvent compositions are given in % (v/v). BGE in MeOH-ACN: 9 mmol/l TPAP, 1 mmol/l perchloric acid. BGE in water: 5 mmol/l TEAP, 5 mmol/l perchloric acid. Temperature 25°C.

<sup>a</sup> Effective mobility of the ion with 0.973 as degree of protonation ( $\text{p}K_{\text{a}}$  value in water is 3.89, pH 2.34).

Ionipariassosiaatio analyytin ja elektrolyyttilisien välillä laskee efektiivistä liikkuvuutta verrattuna todelliseen liikkuvuuteen. Carabias-Martínez *et al.*<sup>20</sup> totesivat tämän tutkiesaan triatsiinien käyttäytymistä MeOH-ACN-liuksessa (eri tilavuussuhteita kokeiltiin), johon lisättiin SDS:a ja perkloorihappoa. He totesivat klooritriatsiineilla muutoksen johtuvan myös, vaikkakin vähemmän, happo-emäs -tasapainosta. Lisäksi he huomasivat todellisen liikkuvuuden olevan suurempi kuin efektiivisen liikkuvuuden (kuva 4), vaikka molemmat laskivatkin SDS:n konsentraation kasvaessa l. ionivahvuuden kasvaessa. Tämän huomion avulla he pystyivät todistamaan ioniparien muodostumisen tapahtuvan pelkästään analyyttien ja perklooraatti- tai dodekyylisulfaatti-anionien välillä eikä elektrolyttilisien ionien välillä. Nämä analyyttien ja elektrolyyttien väliset assosiaatiot todettiin olevan voimakkaampia SDS:n kanssa. Analyyttien ioniparien vuorovaikutukset laskivat MeOH:n lisääntyessä seoksessa



Kuva 4. Analyyttien todelliset (katkoviiva) ja efektiiviset (yhtenäinen viiva) liikkuvuudet SDS:n pitoisuuden ( $\sqrt{I}$ ) funktiona (liuosolosuhteet:  $5\text{--}40 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$  SDS,  $7,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$   $\text{HClO}_4$  50 % v/v MeOH/ACN-seoksessa).<sup>20</sup>

Eroavuudet efektiivisen ja todellisen liikkuvuuden välillä saattavat johtua useista eri tekijöistä, ja tiettyä syytä voi olla hyvinkin vaikea lähteä ennustamaan, mutta alla on muutamia varteenotettavia mahdollisuuksia:

- 1) pH-arvoa laskettaessa Hendersson-Hasselbach-yhtälön avulla elektrolyyttilisä ei välttämättä käyttäydykään kuten yhtälö ennustaa.<sup>16</sup> Pienet muutokset pH-arvossa aiheuttavat suuria muutoksia liikkuvuuksissa.
- 2) Yleensä oletetaan BGE-komponenttien dissosioituvan täysin ja tällöin ionivahvuuden pitäisi pysyä muuttumattomana. Kuitenkin dissosiaation ollessa epätäydellistä ionivahvuus muuttuu<sup>54</sup>, ja tämä voi vaikuttaa huomattavasti liikkuvuuksiin.
- 3) Ioniparien muodostuminen analyytin ja BGE-vastaionin kanssa voi vaikuttaa jonkin verran liikkuvuuksiin, joskin vaikutus on vähäistä.<sup>20</sup>
- 4) Analyytit saattavat vaikuttaa paikallisiin pH-arvoihin ajon aikana.<sup>16</sup> Analyyttien ionisaatioaste voi muuttua ja täten myös liikkuvuudet kasvaa tai vähetä.

## 7. LIUOTTIMIEN VERTAILUA

MeOH:n ja ACN:n hyviin ominaisuuksiin kuuluvat mm. saatavuus korkeina puhtausasteina, alhainen myrkyllisyys ja yhteensopivuus UV-detektorin kanssa.<sup>11</sup> ACN:ä ja MeOH:a onkin käytetty hyvin paljon NACE:ssa liuottimina sekä yksin että seoksissa.<sup>1,10,23</sup> Aina ei kuitenkaan yleisimpien liuottimien ominaisuudet riitä, vaan on valittava joku muu liuotin. Tähän lopputulokseen tulivat Laamanen *et al.*<sup>40</sup> tutkiessaan useita erittäin polaaristen kompleksinmuodostajien sekä kuparin komplekseja. MeOH:sta, FA:sta, ACN:stä ja NMF:sta vain NMF oli liuottimista käyttökelpoinen näiden tutkimiseen.

Palonen *et al.*<sup>55</sup> vertasivat alkoholeja (MeOH, EtOH, PrOH ja BuOH) liuottimina erittäin korkeilla sähkökenttävoimakkuuksilla. PrOH:lla saavutettiin yleisesti parhaimmat tulokset, mutta myös MeOH:lla erottuminen oli erittäin nopeaa. Lisäksi MeOH:a sisältävässä liuottimessa korkeilla pH-arvoilla<sup>16,49</sup> on huomattu heikkojen happojen liikkuvuuden kasvavan, mutta ainakaan Porraksen *et al.*<sup>16</sup> tutkimuksessa fenoleja ja metyyli-fenoleja käytettäessä analyytteinä liikkuvuuden kasvu ei vaikuttanut analyyttien migraatiojärjestykseen.

Tutkiessaan viiden eri liuottimen (MeOH, ACN, PC, DMF ja DMA) vaikutusta suurten orgaanisten ionien (tetrafenyylifosfonium ja tetrafenyyliboraatti) liikkuvuuteen, Muzikar *et al.*<sup>13</sup> totesivat analyyttien liikkuvuuksien noudattavan Debyen, Hückelin ja Onsagerin teoriaa (DHO-teoriaa) kaikilla liuottimilla. MeOH:lla saatiin korkeimmat liikkuvuudet ja PC:lla pienimmät. Lisäksi näillä kahdella analytyillä oli selvästi erilaiset liikkuvuudet DMF:ssa ja DMA:ssa anionin aina saavuttaessa korkeamman liikkuvuuden kuin kationi. MeOH:ssa ja ACN:ssa liikkuvuuksien erot kahdella analytyillä olivat virherajojen sisällä, ja PC:ssa ero oli, vaikkakin merkitsevä, vain muutaman prosentin. Ionivahvuuden riippuvuus liikkuvuuteen oli kaikkein suurin ACN:llä, jonka jälkeen liuottimien riippuvuus laski järjestyksessä MeOH, DMF ja DMA. PC:lla liikkuvuuden vähenemisen todettiin olevan marginaalista.

ACN:n on todettu nostavan analyyttien  $pK_a$ -arvoja l. lisäävän niiden emäsvahvuutta.<sup>26</sup> Lisäksi Carabias-Martínez *et al.*<sup>20</sup> huomasivat ACN:n tilavuuden kasvaessa MeOH-ACN-seoksessa elektrolyyttilisten ionien väliset ioniassoiaatioiden lisääntyvän tutkies-

saan triatsiinien käyttäytymistä MeOH-ACN-liuoksessa (eri tilavuussuhteita kokeiltiin), johon lisättiin SDS:a ja perkloorihappoa.

## 7.1 Pohjaluku

Pohjaluku on erotuskykyä mittaava määre, ja teoreettisesti sen pitäisi laskea ionivahvuuden kasvaessa. Muzikar *et al.*<sup>56</sup> todistivat tämän käyttäessään vettä, MeOH:a ja ACN:ä liuottimena. He myös totesivat pohjaluvun alentumisen vedessä olevan vähäisintä. Tutkimustulokset noudattavat DHO-teoriaa pohjaluvun laskemisesta. Määritelmän pohjaluvun laskemisesta ionivahvuuden kasvaessa pitäisi parantaa tehokkuuden arviointia CE:ssa sekä vedellisissä että vedettömissä olosuhteissa.

PC muistuttaa vettä ominaisuuksiltaan, ja sen pohjaluku on verrattavissa veden pohjalukuihin.<sup>11</sup> Se onkin huomattavasti otollisempi liuotin kuin usein käytetyt MeOH ja ACN ainakin tältä näkökannalta. Alkoholeista (MeOH, EtOH, PrOH ja BuOH) taas korkeimmat pohjaluvut saavutettiin PrOH:lla ilmeisestikin johtuen sen sopivasta (ei liian korkea) viskositeetistä sekä alhaisesta konduktiivisuudesta.<sup>17</sup>

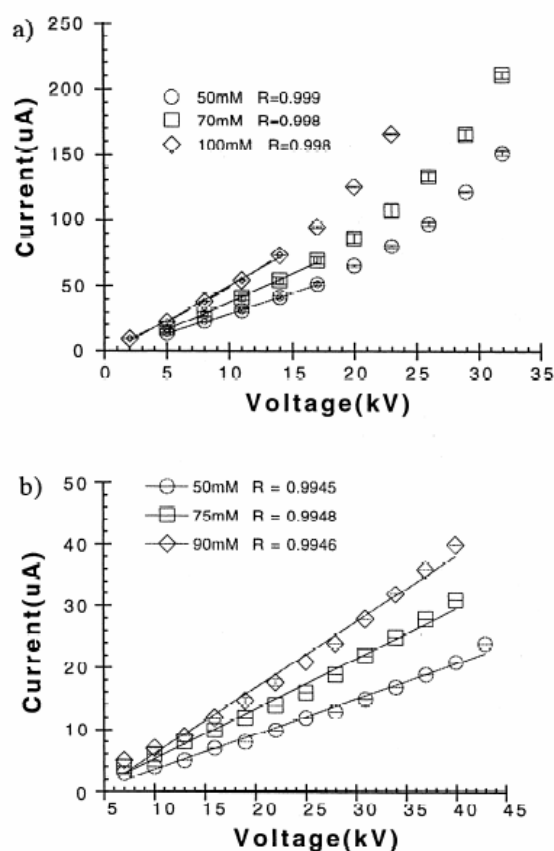
## 7.2 Joulen lämpö

Kun kapillaarin sisällä olevaa lämpöä ei pystytä enää tehokkaasti haihduttamaan, aiheutuu Joulen lämpöä.<sup>18</sup> Tehokkaita haihdutustapoja ovat mm. lämmön johtaminen kapillaarin seinien läpi ja siitä edelleen ympäröivään ilmaan esim. tuulettimen avulla tai käyttämällä termостоitua laitteistoa. Joulen lämpö vähentää erottumistehokkuutta aiheuttaen parabolisen virtauksen kapillaarin sisällä laminaarisen sijasta. Alhainen konduktiivisuus vähentää Joulen lämmön vaikutusta.

Jännitettä nostamalla l. sähkökentän voimakkuutta lisäämällä parannetaan erottumistehokkuutta, kunnes Joulen lämpöä alkaa syntyä. Erittäin korkeita sähkökenttävoimakkuuksia käyttäessään Palonen *et al.*<sup>17</sup> huomasivat MeOH:n, EtOH:n, PrOH:n ja BuOH:n ollessa liuottimina, että MeOH:lla ja EtOH:lla oli huomattavissa jonkin verran Joulen lämpöä. PrOH:n ollessa liuottimena sähkökentän voimakkuuden vaikutukset olivat kaikkein vähäisimmät, esim. Joulen lämpöä ei oikeastaan esiintynyt ollenkaan. Myös

BuOH:lla Joulen lämmön vaikutukset olivat vähäiset, ja kapillaarin lämpötila oli matala jopa korkeimmilla sähkökentän voimakkuuksilla. Kuitenkin, vaikka erottumistehokkuus kärsi MeOH:lla, erottuminen tapahtui erittäin nopeasti korkeilla jännitteillä, joten jos erottumistehokkuudesta voidaan yhtään tinkiä, korkeita sähkökenttävoimakkuuksia kannattaisi käyttää MeOH:n ollessa liuottimena. Yleisestikin, mitä korkeampi jännite oli, sitä lyhyempi oli myös analyysiaika.

Joulen lämpöä ei esiintynyt juuri lainkaan kokeillulla jännitealueella (5-45 kV) FA:ssa (lisätty Na-fosfaattia), eli Ohmin lain mukaan virta jännitteen funktiona-kuvaajasta nähdään riippuvuuden olevan lineaarinen (kuva 5), Wardin ja Khaledin<sup>18</sup> optimoidessa menetelmää oligosakkaridien tehokkaaseen erottamiseen. Lisäksi virta pysyi koko ajan alhaisena, jolloin sähkökenttävoimakkuus oli korkea ja erottuminen tehokasta. Myös viskositeetillä pystytään tutkimaan Joulen lämmön vaikutusta. Kun mittauksissa muodostuu Joulen lämpöä, liuoksen viskositeetti pienenee ja elektro-osmoottinen liikkuvuus kasvaa.



Kuva 5. Virta jännitteen funktiona erilaisilla Na-fosfaattipitoisuuksilla a) vedessä ja b) FA:ssa.<sup>18</sup>

## 8. SOVELLUKSET

### 8.1 Varauksellinen erottaminen

Yhdisteiden varauksellinen erottaminen perustuu niiden muodostamien anionien ja/tai kationien erilaisiin migraatioaikoihin. Sopivalla taustaelektrolyytillä on tärkeä osa erottumisessa, ja jo pienikin taustaelektrolyytin epäpuhtaus tai väärä kationin tai anionin valinta saattaa vaikuttaa erottumiseen selvästi. Tällöin liuoksessa saattaa tapahtua mm. BGE-ionien sekä analyyttien välistä ionipariutumista, jolloin yhdisteiden erottumiskyky heikkenee tai jopa katoaa kokonaan.<sup>22</sup> Lisäksi elektrolyyttilisät saattavat reagoida keskenään heikentäen BGE:n toimivuutta.

Cottet *et al.*<sup>21</sup> saivat onnistuneesti erotettua varaukseen perustuen veteen liukenemattomia orgaanisia polymeerejä käyttäen taustaelektrolyytinä MeOH-ACN-seosta (87,5:12,5 v/v), jossa oli lisättyä etikkahappoa sekä ammoniumasetaattia. Elävillä polymeereillä on toisessa päässä ketjua neutraali ryhmä (tässä tapauksessa heksyyli) ja toisessa päässä amiiniryhmä, jotka reagoivat keskenään kasvattaen polymeeriketjua. Tätä kasvatusreaktiota voivat häiritä erilaiset sivureaktiot, joissa polymeerin toiseen päähän (heksyyli) muodostuukin karboksyyli-ryhmä, eikä polymeeri pysty enää jatkaamaan kasvamistaan. Tällaista karboksyyli-ryhmäpääteistä ketjua kutsutaan kuolleeksi polymeeriksi. Näissä olosuhteissa tutkijat onnistuivat protonoimaan elävät polymeerit täysin, koska etikkahapon lisäys ei aiheuttanut elektroforeettisten liikkuvuuksien kasvua. Lisäksi kuolleet polymeerit saatiin osittain deprotonoitua todennäköisesti niiden karboksyylihappomaisen rakenteen takia. Tutkijat kuitenkin mainitsivat liuoksessa saatavan tapahtua ionipariutumista, mutta sitä ei tutkittu tarkemmin.

Porras *et al.*<sup>1</sup> saivat erotettua negatiivisesti varautuneet analyytit käytettäessä MeOH:n ja ACN:n seosliuotuksessa (50:50 (v/v)) erilaisia kationisia alkalimetalliasetaatteja. Analyyttien migraatioajat kasvoivat selvästi metallikationin koon kasvaessa. Lisäämällä ACN:ä saatiin migraatioaikoja lyhennettyä, mutta myös analyyttien paikat vaihtuivat. Bentstiasidi oli analyyteistä ainoa, jonka migraatioaika vaihteli suuresti eri elektrolyytikompositioiden välillä. Tämän epäiltiin johtuvan sen vahvemmassa kompleksinmuodostuskyvystä metallikationien kanssa ACN:n määrän lisääntyessä. Lisäksi elektrolyytin korkeampi pH enemmän ACN:ä sisältävässä elektrolyyttiliuoksessa voi vaikuttaa erotukseen. Kationisten alkalimetallien läsnä ollessa positiivisen varauksen omaavista



analyyteistä, morfiini ja dekstromoramidi eivät protonoituneet ollenkaan (johtuen korkeasta pH-arvosta), ja metadonin ja efedriinin migraatioajat erosivat ammoniumasetaatilla saaduista ajoista (johtuen taaskin pH-arvosta).

Anionit (asetaatit, kloridi ja bromidi) vaikuttivat kationisten analyyttien migraatioaikoihin.<sup>1</sup> Elektro-osmoottinen liikkuvuus oli selvästi heikompaa kloridi- ja bromidiliuoksissa verrattuna asetaattiliuokseen, vaikkakin analyyttien näennäiset migraatioajat olivat kohtuullisen lähellä toisiaan eri elektrolyyttiliuoksista huolimatta. Tämä johtui osittain varmasti siitä, että elektroforeettinen liikkuvuus taas on vahvempaa kloridi- ja bromidiliuoksissa. Migraatiojärjestyksen vaihtelun katsottiin johtuvan pH-arvojen eroista sekä ionivuorovaikutusten eroista. Negatiivisesti varautuneita analyyttejä tutkittiin myös ammoniumkloridi ja ammoniumbromidi-elektrolyyttisäyksissä, mutta erottumisia ei saatu aikaan pitkien migraatioaikojen sekä epästabiilin virran takia.

Herrero-Martínez *et al.*<sup>28</sup> kehittivät menetelmän lineaaristen alkyylibentseenisulfoonaattien homologien erotteluun NACE:lla. Neutraalit hydrofobiset analyytit saatiin liuotettua, kun BGE:iin lisättiin sopivaa elektrolyyttisäyä. BGE:nä käytettiin EtOH:a, jossa oli pieniä pitoisuuksia etikkahappoa ja hydrofobista alkyyliamiinia (dipentyyliamiini) hiukan ylimäärin. Alkyyliamineja vertailtaessa huomattiin migraatioaikojen kasvu mitä pidemmäksi alkyyliketju kasvoi.

## 8.2 Neutraalien yhdisteiden erottaminen

Neutraaleja yhdisteitä pystytään NACE:ssa erottamaan heterokonjugaation avulla. Organisten liuottimien tapauksissa neutraalien analyyttien on huomattu muodostavan negatiivisesti varautuneita heterokonjugaatteja elektrolyyttianionien kanssa. Porras *et al.*<sup>10</sup> erottelivat metyyliifenoleja ACN:ssä käyttäen hyväksi heterokonjugaattien muodostumista. Heterokonjugaatioon käytettyjä BGE-anioneja olivat kloridi, bromidi, asetaatti, perklooraatti ja dimalonaatti, joissa heterokonjugaattien muodostuminen oli tehokkainta asetaatissa, bromidissa ja kloridissa. ACN:ssä sekä vesi että MeOH vaikuttivat fenolien BGE-anionien heterokonjugaatioon kilpaillessaan vetysidoksen luovuttajan roolista. Kuitenkin MeOH:n läsnä ollessa liikkuvuuksilla oli loistava toistotarkkuus, vaikka BGE:ä ei edes vaihdettu joka ajon jälkeen.

Porras ja Kenndler<sup>51</sup> testasivat heterokonjugaation avulla tapahtuvaa erotusta DMF:ssa onnistuneesti. Analyytteinä toimivat erilaiset fenolit, ja puskurina käytetty salisyylihappo omasi heterokonjugaation muodostamiseen tarvittavan karboksyyli ryhmän, jolloin ylimääräisiltä BGE-lisiltä säästyttiin. Myös Subirats *et al.*<sup>14</sup> onnistuivat useiden neutraalien analyyttien erottamisessa NM:ssa käyttäen heterokonjugaatiota. Analyytteinä käytettiin mm. naftaleenia, bentseeniä ja aniliinia ja BGE-anionina kloridia.

### 8.3 Kiraalinen erottaminen

Karbaum ja Jira<sup>24</sup> selvittivät tutkimuksessaan sopivaa taustaelektrolyyttikompositiota kahdelletoista 1,3,4-thia- ja 1,3,4-selenadiatsiinille käyttäen liuottimina MeOH:a, FA:a sekä FA:n ja ACN:n seosta. Erilaisia elektrolyyttejä kokeiltiin (ammoniumasetatti/etikkahappo ja sitruunahappo/tris(hydroksimetyyli)aminometaani (TRIS)). Kiraalisina selektoreina toimivat kolme syklodekstriiniä: hydroksyylietyyli(HE)-, hydroksyylipropyyli(HP)- ja metyyli- $\beta$ -syklodekstriini. Tutkijat saivat eri analyytille hyvin erilaisia erottumistekijöitä, mutta lopulta he päätyivät yhteen taustaelektrolyyttiliuokseen, joka heidän tutkimuksessaan osoittautui parhaaksi suurimmalle osalle analyyteistä. Tämä elektrolyyttiliuos sisälsi 25mM sitruunahappoa ja 12,5mM TRIS:a MeOH:ssa sekä kiraalisena erottajana joko HE- tai HP-  $\beta$ -syklodekstriini.

Emäksisten lääkeaineiden enantiomeerien erottelu on saatu onnistumaan HDMS- $\beta$ -CD:n avulla Servaisin *et al.*<sup>41</sup> toimesta. He tutkivat erilaisten kationisten (Na, NH<sub>3</sub> tai K) ja anionisten (Cl, muurahaishapon suola, metaanisulfonaatti sekä kamferisulfonaatti) elektrolyyttilisten vaikutusta enantiomeerien erotteluun, ja huomasivat niiden vaikuttavan selvästi erotteluun, joidenkin jopa poistaen erottumiskyvyn kokonaan. Tutkijat arvelivat tähän olevan syynä BGE-komponenttien kilpailun joko kompleksin muodostamisesta HDMS- $\beta$ -CD:n kanssa (BGE:n kationit) tai emäsanalyyttien kanssa ionipariutumuksesta (BGE:n anionit). Pääasiassa suurimmat vaikutukset erottumiseen kuitenkin oli nähtävissä kationeilla, joista mm. natriumilla ei saatu yhden lääkeaineen enantiomeerejä eroteltua ollenkaan, ja kahden muun lääkeaineen resoluutiot olivat huonoimmat kyseisellä kationilla. He kuitenkin saivat optimoitua kaksi tehokkaasti ja nopeasti emäksisten lääkeaineiden enantiomeerejä erottelevaa käyttökelpoista menetelmää, jotka olivat ammoniumformiaatti tai kamferisulfonaatti muurahaishapolla happamoidussa metanolisessa liuoksessa, jossa kiraalisena selektorina käytettiin HDMS- $\beta$ -CD:a. Bitar *et*

*al.*<sup>43</sup> totesivat taas proteaasi-inhibiittoreiden aziridiinien isomeerien erottelussa HDAS- $\beta$ -CD:n antavan paremman resoluution sekä lyhyemmän migraatioajan. Samassa tutkimuksessa kuitenkin todettiin, että MeOH:n ollessa liuottimena kiraalista selektoria tarvitaan valtava määrä onnistuneeseen erottumiseen.

Huang *et al.*<sup>44</sup> totesivat (R)-isomeerin efektiivisen liikkuvuuden olevan aina suurempi kuin (S)-isomeerien riippumatta käytetystä liuottimesta (vesi, MeOH tai FA) 3,4-metyleenidioksimeta-amfetamiineilla sekä sen sukuisilla yhdisteillä. Sokoließ *et al.*<sup>32</sup> taas saivat optimoitua tioksanteeneille sekä doksepiineille taustaelektrolyytin, joka sisälsi ammoniumasetaattia MeOH:ssa, pH-arvon ollessa 5,0, ja liuokseen lisättiin vielä kaliksareenia ss-a1. Hyvä selektiivisyys ja alhaiset toteamisrajat saavutettiin kaikille analyteille käyttämällä ss-a1:a valikoijana. Hyvät tulokset johtuivat korkeasta elektroforeettisesta liikkuvuudesta sekä kaliksareenien hydrofobisista ja elektrostaattisista vuorovaikutuksista isomeerien kanssa. Selektiivisyyttä pystyttiin muuttamaan kaliksareenin pitoisuudella, pH-arvoilla sekä orgaanisella modifioijalla.

## 9. VEDELLISTEN JA VEDETTÖMIEN OLOSUHTEIDEN VERTAUSTA

NACE:n huonoihin puoliin kuuluvat rajattu saatavilla oleva tieto protolyysistä, molekulaarisista vuorovaikutuksista sekä orgaanisissa liuottimissa tapahtuvista liuotusilmiöistä.<sup>50</sup> Lisäksi NACE:ssa on raportoitu pidempiä analyysiaikoja kuin vedellä, varsinkin MeOH:n toimiessa liuottimena.<sup>43,57</sup> Kuitenkin myös päinvastaisia tuloksia on saatu, kuten mm. Peng *et al.*<sup>27</sup> erottaessaan organometalleja toisistaan MeOH:ssa ja vedessä. Tutkimuksessa analyyttien liikkuvuudet laskivat selkeästi veden määrän saavuttaessa 65 %. Suuremmilla vesipitoisuuksilla liikkuvuudet lähtivät lievään nousuun, mutta silti parhaat liikkuvuudet saatiin kiistatta puhtaalla MeOH:lla. Yhtenä selkeänä NACE:n etuna kuitenkin katsotaan olevan niiden ominaisuus liuottaa veteen liukenemattomia yhdisteitä.

Porraksen tutkimuksessa<sup>47</sup> selvitettiin 21 emäksen varsinaisia liikkuvuuksia ja  $pK_a$ -arvoja vedessä ja MeOH:ssa. Kaikille tutkimuksen analyyteille saatiin korkeampi  $pK_a$ -arvo MeOH:ssa kuin vedessä, vaikka teoreettisesti sen pitäisi mennä juuri päinvastoin. Analyyttien todellisten liikkuvuuksien huomattiin olevan korkeampia MeOH:ssa kuin vedessä, ja lisäksi ero todellisten liikkuvuuksien välillä oli sitä suurempi mitä pienempi oli liikkuvuus. Tutkimuksessa kävi lisäksi ilmi, että vedessä vahvempien happojen, di- ja trikloorietikkahappojen,  $pK_a$ -arvot erosivat toisistaan selvästi, mutta hapot ovatkin liian vahvoja vesiolosuhteisiin. Ero  $pH_{app}$ - ja  $pK_a$ -arvojen välillä oli huomattavasti suurempi vedettömissä olosuhteissa kuin vedellisissä. Carabias-Martínezin *et al.*<sup>20</sup> tutkimuksessa analyyttien  $pK_a$ -arvot nousivat ACN:ssä 6 yksikköä ja MeOH:ssa 1-1,5 yksikköä verrattuna veteen. Myös kationisten ja anionisten lääkeaineiden  $pK_a$ -arvot kasvoivat pH-arvojen laskiessa (l. liuoksen happamoituessa) MeOH:ssa verrattuna arvoihin vedessä.<sup>50</sup> Anioneille kasvu oli 5-6 yksikön ja kationeille 2 yksikön luokkaa. PC:ssa taas on huomattu liikkuvuuksien laskemista ja  $pK_a$ -arvojen nousua 7-8 yksiköllä verrattuna veteen.<sup>11</sup>

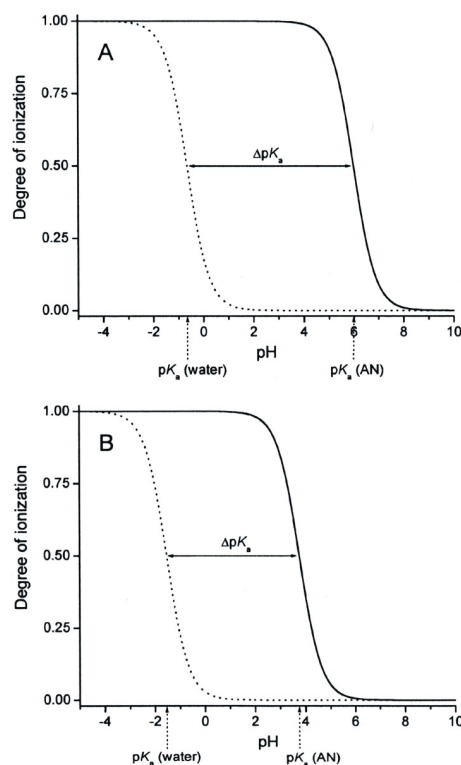
Psurek *et al.*<sup>57</sup> saivat ACN:llä alhaisempia liikkuvuuksia kuin MeOH:lla tai vedellä. He tutkivat  $\alpha$ -kierteisten polypeptidien erottelua NACE:ssa (orgaanisina liuottimina MeOH ja ACN sekä niiden seokset) ja ACE:ssa. NACE:lla erottuminen oli yleisesti parempaa, lukuun ottamatta ACN:ä, jossa analyyttien liikkuvuudet olivat alhaiset, eikä komponenttien erottelua pystytty saamaan aikaan. Lisäksi MeOH:ssa analyysiaika oli selkeästi

vedellisiä olosuhteita pidempi. Aziridiini-isomeerien erottumisessa<sup>43</sup> saatiin taas MeOH:ssa sekä paremmat resoluutiot että lyhyemmät migraatioajat, toisin kuin edellä mainitussa tutkimuksessa. Vedessä kiraalisen selektorin HDMS- $\beta$ -CD:n kanssa, kun käytettiin HDAS- $\beta$ -CD:ä, saatiin resoluutiota parannettua, mutta migraatioajat pysyivät yhä edelleen pitkinä. Myös Huang *et al.*<sup>44</sup> totesivat NACE:n (MeOH tai FA liuottimena) tarjoavan nopeamman ja tehokkaamman analyysin 3,4-metyleenidioksimeta-amfetamiinin sekä sen sukuisten yhdisteiden raseemiselle seokselle.

Porras *et al.*<sup>15</sup> tutkivat veden, MeOH:n ja ACN:n sekä MeOH:n ja ACN:n seosten vaikutusta kationisten analyyttien erotukseen. Tutkimuksissa selvisi, että parhaat analyyttien todelliset liikkuvuudet saatiin MeOH:ACN- seoksella 25:75 (v/v) (taulukko 5, s. 28). Lisäksi MeOH:ACN-seoksissa eri analyyttien liikkuvuudet olivat hyvin lähellä toisiaan, kun taas vedellä nämä arvot vaihtelivat huomattavasti enemmän. Orgaaniset liuottimet siis läpikäyvät ilmeisesti jonkin näköisen tasoittumisvaikutuksen. Todelliset liikkuvuudet korreloivat hyvin viskositeetin kanssa sekä puhtaissa orgaanisissa liuottimissa että seoksissa.

NACE:ssa on pystytty käyttämään selkeästi suurempia sähkökenttävoimakkuuksia kuin vedellisessä CE:ssa, koska virrat ovat yleensä pysyneet kohtuullisen alhaalla suurista jännitteistä huolimatta.<sup>17,55</sup> Virran pitäisi kasvaa lineaarisesti samassa suhteessa jännitteen kanssa. Tällöin myös Joulen lämmön vaikutus vähenee erottumisessa, koska laitteisto pystyy poistamaan lämmön tehokkaasti erotussysteemistä, ja täten erottumistehokkuudet paranevat. FA:lla saatiin korkeampi erottumistehokkuus kuin vedellä Wardin ja Khaledin<sup>18</sup> kehittäessä optimimenetelmää oligosakkaridien erotteluun, vaikka  $\epsilon/\eta$ -suhteen mukaan FA:n pitäisi olla huonompi liuotin. Syynä on Joulen lämpö, jota ei FA:ssa Na-fosfaattia käytettäessä elektrolyyttinä muodostunut juuri lainkaan, vaikka sähkökenttävoimakkuudet olivatkin korkeat toisin kuin vedellä (kuva 5, s. 32).

ACN lisää heikkojen emästen emäsvahvuutta huomattavasti verrattuna veteen. Tämä käy ilmi Porraksen<sup>26</sup> tekemässä tutkimuksessa, jossa erotettiin tioasetamidi, asetamidi, tiourea, bentsamidi ja 4-nitrobentsamidi kuten myös NMF, DMF, FA ja DMSO käyttäen liuottimena ACN:ä ja taustaelektrolyttinä perkloorihappoa. Kuvasta 6 nähdään kuinka asetamidi ja bentsamidi ovat ainakin osittain protonoituneessa muodossa huomattavasti suuremmilla pH-arvoilla ACN:ssa kuin vedessä. Vesiolosuhteissa näiden emästen erottumista olisi lähes mahdotonta tutkia.



Kuva 6. Asetamidin (A) ja bentsamidin (B) teoreettinen ionisaatioaste vedessä (katkoviiva) ja ACN:ssä (yhtenäinen viiva).<sup>26</sup>

Rajallisen tiedon vuoksi joskus on mahdotonta selittää analyyttien erottumiskäyttäytymistä vedellisissä ja vedettömissä olosuhteissa. Lin ja Vighin<sup>46</sup> tutkimuksessa heikkojen emästen enantiomeerien erottelussa HxDAS:n vuorovaikutus heikkojen emästen kanssa oli heikompaa happamassa MeOH:ssa kuin happamassa vedessä. Joillekin analyyteistä enantiomeerien resoluutio pystyttiin saavuttamaan vain vedessä tai MeOH:ssa, eivätkä tutkijat pystyneet ennustamaan tätä käytäntöä.

Tällä hetkellä löytyy paljon tapauksia, joissa sekä ACE:lla ja NACE:lla löytyy käyttökelpoinen menetelmä analyyttien erottamiseen. Tällöin molemmilla menetelmillä on omat hyvät puolensa, ja joudutaan joko punnitsemaan erojen merkittävyyttä tai käyttämään molempia menetelmiä. Laamanen *et al.*<sup>39,40</sup> toivat kahdessa eri tutkimuksessaan esille uudet menetelmät usean eri kelaatinmuodostajan erottamisen kapillaarielektroforeesilla kuparikomplekseina sekä vedellisissä (2 eri menetelmää) että vedettömissä (1 menetelmä) olosuhteissa. Orgaanisena liuottimena käytettiin NMF:a ja elektrolyyttinä kaliumbromidia. Vedellisissä menetelmissä käytettiin toisessa tetradekyylitrimetyyliammoniumbromidia (TTAB) ja toisessa DMDNAB:a virtauksen kääntäjänä. Tutkimusten vertailussa todettiin vedettömissä olosuhteissa suuremman halkaisijan omaavan kapillaarin käytön olevan mahdollista (i.d. 75  $\mu\text{m}$ ). Vedellisissä olosuhteissa kapillaarin

käyttö olisi aiheuttanut virran nousun yli laitteen maksimikapasiteetin. Lisäksi kelaatinmuodostajien detektoinnissa oli eroja iminodiasetaattihapon (IDA) kohdalla. Vedettömissä olosuhteissa sitä ei pystytty lainkaan detektoimaan, kun taas vedellisissä olosuhteissa detektointi onnistui helposti. Muidenkin piikkien järjestyksessä oli eroja vedellisen ja vedettömän menetelmän välillä. Vedettömissä olosuhteissa mitattujen analyyttien piikit olivat korkeampia ja pinta-alat suurempia kuin vedellisissä olosuhteissa. Myös toteamisrajat olivat pienemmät vedettömissä olosuhteissa, mutta yllättävästi migraatioajat olivat taas pienemmät vedellisissä olosuhteissa. Uusimmassa tutkimuksessa<sup>19</sup> tutkijat saivat kuitenkin myös analyysiaikoja lähemmäksi vedellisissä olosuhteissa saatuja aikoja.

On kuitenkin tapauksia, jolloin NACE ei pysty korvaamaan vedellisen CE:n käyttöä. Tähän tulokseen tulivat Hilder *et al.*<sup>58</sup> erottaessaan penisilliini V:tä ja sen kaltaisia analyyttejä (epäpuhtauksia). Millään NACE-liuottimella (ACN, MeOH, EtOH) ei saatu kaikkia analyyttejä erotettua, mutta niillä saatiin yleisesti 10-20 % korkeampia erottumistehokkuuksia, virta oli selkeästi alhaisempi sekä ACN:ä sisältävissä liuottimissa myös analyysiaika oli lyhyempi. Sen sijaan vedessä oli selkeästi hyvä selektiivisyys, kun jopa pienimmätkin analyytit erottuivat penisilliini V-piikistä. Niinpä tutkittaessa NACE:lla osa epäpuhtauksista ja johdannaisista saattaa jäädä pääanalyytin vyöhykkeeseen, ja näin mittaustulokset vääristyvät.

pH-arvo erosi 0,2 yksikköä ACE:ssa ja NACE:ssa halogenoitujen fenoliyhdisteiden erottamismenetelmissä vedessä ja MeOH:ssa.<sup>59</sup> Tutkimustuloksista ilmeni, että efektiivinen liikkuvuus laskee NACE:ssa aiheuttaen pitemmät migraatioajat. Syynä tähän saattaa olla alhaisempi ionisaatioaste NACE:ssa sekä ioniassoosiaation ja ionipariutumisen tapahtuminen NACE:ssa. NACE:n kuitenkin huomattiin parantavan resoluutiota. Tulosten perusteella molemmat menetelmät ovat käyttökelpoisia, mutta näistä ACE tarjosi paremman erottumisen.

Porras ja Kenndler<sup>60</sup> tarkastelivat kriittisesti erilaisia julkaistuissa tutkimuksissa mainittuja NACE:n etuja kokoama-artikkelissaan, ja tulivat tulokseen, että useimmat näistä eduista olivat yliarvostettuja tai jopa olemattomia. Seuraavalla sivulla on lueteltuna mainitut väitteet sekä tutkijoiden tulokset niiden paikkansapitävyydestä.

- 1) Orgaaniset liuottimet lisäävät erottumisselektiivisyyttä.

Lopullisten liikkuvuuksien suhteen nojalla orgaaniset liuottimet eivät yleisesti lisää erottumisselektiivisyyttä. Kuitenkin mm. heterokonjugaatiolla voidaan yksilöllisesti selektiivisyyteen vaikuttaa.

- 2) Orgaaniset liuottimet lisäävät erottumistehokkuutta.

Kun pitkittäisdifфуusiota käytetään piikkien levenemisen ainoana lähteenä (EOF jätetään huomiotta), tehokkuus on itse asiassa useissa tapauksissa orgaanisissa liuottimissa jopa huonompaa kuin vedessä. Myöskään muut piikin levenemiseen vaikuttavat tekijät eivät puoltaneet orgaanisia liuottimia.

- 3) Korkeita erottumisjännitteitä ja/tai korkeita BGE-ionivahvuuksia voidaan käyttää orgaanisissa liuottimissa alhaisempien virtojen kuin vedessä vuoksi.

Sähköiset konduktiivisuudet ovat orgaanisissa liuottimissa alhaisempia (lukuun ottamatta ACN:ä) kuin vedessä, ja teoriassa korkeampia sähkökenttävoimakkuuksia ja/tai korkeampia ionivahvuuksia olisi mahdollista käyttää NACE:ssa.

- 4) Mahdollisuus korkeampien sähkökenttävoimakkuuksien käyttämiseen lyhentää analyysiaikoja NACE:ssa verrattuna veteen.

Alhaiset virrat takaavat vain pienen mahdollisuuden sähkökenttävoimakkuuksien nousuun, ja tämä nousu tuskin pystyy korvaamaan analyyttien samanaikaista nopeuden vähentymistä. Lisäksi sähkökenttävoimakkuuksien lisäyksissä tulee usein laitteiston rajat vastaan.

- 5) BGE-komponenttien tai analyyttien liukoisuus ja/tai stabiilisuus on korkeampi tai parempi NACE:ssa.

Yleisesti ionisten partikkelien liukoisuus on parempaa vedessä kuin orgaanisessa liuottimessa ja neutraalien (molekulaaristen) partikkelien taas orgaanisessa liuottimessa. Kuitenkin liuoksessa on yleensä molempien kaltaisia partikkeleita, ja niinpä orgaaninen liuotin ei välttämättä takaa parempaa liukoisuutta verrattuna veteen. Sel-



keä etu orgaanisten liuottimien käytössä elektroforeesissa on, että niiden avulla voidaan analysoida sellaisia yhdisteitä, jotka hajoavat vedellisissä olosuhteissa.

## 10. YHTEENVETO

Orgaanisia liuottimia on käytetty kapillaarielektroforeesissa vasta hiukan yli parinkymmenen vuoden ajan, mutta ne lisäävät tutkijoiden kiinnostusta koko ajan valtavan liuotinkompositiomäärän vuoksi. Kuitenkin juuri tämä asettaa NACE:lle myös rajoituksia, kun liuottimien käyttäytymisestä on oltava todella vahvat taustatiedot ennen analyysiä. Valitettavasti erilaisten analyyttien käyttäytymisestä orgaanisissa liuottimissa on ainakin toistaiseksi kohtuullisen vähän tietoa, kun taas vedellisissä olosuhteissa veden käyttäytyminen, sekä eri yhdisteiden käyttäytyminen siinä on taas suhteellisen tarkkaan tiedossa.

Liuottimien ominaisuuksista tärkeimmiksi muodostuvat dielektrisyysvakio, viskositeetti, autoprotolyysivakio sekä luovuttaja- ja vastaanottajaluvut. Niiden avulla pystytään ennustamaan analyyttien liikkuvuuksia sekä niiden liukoisuusominaisuuksia. Kun dielektrisyysvakion arvo on  $\geq 30$ , liuottimen katsotaan pystyvän täydelliseen ionidissosiaatioon. Myös luovuttaja- ja vastaanottajaluvut kertovat liuottimen liukoisuusominaisuuksista kertoen elektronin luovutus- ja vastaanottokyvyistä. Aproottiset yhdisteet eivät yleensä pysty vastaanottamaan elektroneja. Liuottimen  $\epsilon/\eta$ -suhde on verrannollinen elektroforeettiseen ja elektro-osmoottiseen liikkuvuuteen, joka siis kasvaa viskositeetin pienentyessä. Alhaisen viskositeetin siis pitäisi lisätä BGE-liuoksen liikkuvuutta. Amfi-proottisilla yhdisteillä on vedenkaltainen autoprotolyysivakio, kun taas aproottisilla yhdisteillä se on selvästi suurempi. Aproottiset yhdisteet eivät yleensä pystykään protolyysiin, mutta pH-mittausalue on niillä yleensä laaja. Tässä tutkimuksessa mainituilla liuottimilla on yleensä kullakin omat hyvät ominaisuudet (ks. liite 1 taulukko 1), ja ne soveltuvat erilaisiin analyyseihin joko yksin tai seoksissa muiden liuottimien ominaisuuksia parantaen. Tärkeää on, jos ajasta voidaan tinkiä, kokeilla mahdollisesti useampaakin erilaista liuotinta ennen varsinaista analyysiä, jolloin saadaan paras mahdollinen erotuminen.

Yleistä on, ettei liuotin pelkästään pysty analyyttejä erottamaan, vaan BGE-liuokseen täytyy lisätä jotain elektrolyyttiä. Elektrolyytteinä käytetään paljon erilaisia karboksyylihappoja ja niiden suoloja, koska niillä on helppo puskuroida BGE-liuos. Lisäksi perkloorihappoa on käytetty takaamaan tarpeeksi alhainen pH-arvo liuoksessa, vaikka se ei puskurina pystykään toimimaan. Kiinnostusta on viime aikoina herättänyt myös ns. ”vihreät yhdisteet” eli ioninesteet, jotka ovat alhaisen sulamispisteen omaavia puoliksi

orgaanisia suoloja. Näistä mm. 1,3-alkyyli-imidatsoliumsuoloilla ja kvaternäärisillä ammoniumsuoloilla on saatu lupaavia tuloksia NACE:ssa. Vaikka ioninesteitä kutsutaankin vihreiksi yhdisteiksi, niiden ympäristöystävällisyyteen on suhtauduttava tietyllä varauksella, koska tarpeeksi informaatiota ei ole vielä olemassa. Kiraalisia selektoreita käytetään optisten isomeerien erotteluun, ja niistä selkeästi yleisimpiä ovat erilaiset syklodekstriinit. Elektrolyyttilisät vaikuttavat eri tavalla eri analyyseissä, ja sekä BGE-kationien että -anionien on todettu vaikuttavan analyysiin huomattavasti, joten liuoksissa kannattaa välttää ylimääräisiä partikkeleita. Kuitenkin erilaisia BGE-kokonaisuuksia olisi myös hyvä kokeilla liuottimien ohella optimikomposition saavuttamiseksi.

BGE-liuoksen pH-arvoja pystytään muokkaamaan mm. valitsemalla elektrolyytiksi sopiva happo ja sen suola. Onkin kehitetty onnistunut menetelmä liuoksen pH-arvon laskemiseksi suoraan puskurin pH-arvon avulla. Tällöin pH-arvo korreloi paremmin oikeaa tulosta, vaikka tähänkin vaikuttaa mm. ei-halutut ioniassoosiaatiot mm. epäpuhtauksien (vesi yleisin) vuoksi.  $pH_{app}$ -arvo taas antaa systemaattisesti vääriä tuloksia, koska yleisesti pH-elektrodit ja puskuriliuokset ovat vesipohjaisia. Kun tiedetään pH-arvon tärkeys kapillaarielektroforeettisissa analyyseissä, on selvää, että virheellinen pH vaikuttaa huomattavasti analyysin onnistumiseen. Analyyttien  $pK_a$ -arvojen on todettu yleisesti kasvavan orgaanisissa liuoksissa verrattuna veteen. Tämä johtuu orgaanisten liuottimien kyvystä lisätä analyyttien emäsvahvuutta. Tällöin on mahdollista erotella yhdisteet, joihin ACE:ssa tarvittaisiin niin alhaiset pH-arvot, ettei niitä ole mahdollista saada aikaan.

Erottuminen CE:ssa perustuu BGE-liuoksen ja analyyttien erilaisiin liikkuvuuksiin sähkökentässä. Näitä ovat elektroforeettinen, elektro-osmoottinen, efektiivinen, absoluuttinen, todellinen ja havaittu liikkuvuus. Absoluuttisen liikkuvuuden avulla pystytään laskennallisesti ennustamaan analyytin käyttäytymistä liuoksessa, mutta usein todelliset ja havaitut liikkuvuudet eroavat selkeästi siitä. Efektiivinen liikkuvuus ottaa huomioon elektrolyytti-ionien dissosiaatioasteen, ja se pystyy todellisemmin kuvaamaan niiden liikkuvuutta. Elektro-osmoottiseen liikkuvuuteen taas vaikuttaa huomattavasti varaus-tasapaino BGE-liuoksen sisällä. Negatiivisesti varautuneeseen kapillaarin silikaseinään pystytään täten vaikuttamaan selvästi erilaisilla orgaanisilla liuotinkompositioilla. Elektroforeettiseen liikkuvuuteen vaikuttaakin jo edellä mainitut fysikaaliset ominaisuudet; viskositeetti ja dielektrisyysvakio. Niiden avulla pystytään kohtuullisesti arvioimaan ionin liikkuvuutta.

Analyyttien varauksellinen erottuminen perustuu niiden BGE:ssä muodostamien ionien erilaisiin migraatioaikoihin. Taustaelektrolyytissä neutraaleina pysyvien elektrolyyttien erottuminen onnistuu NACE:ssa mm kompleksien muodostamisella tai heterokonjugaatilla. Optisten isomeerien erottamiseen tarvitaan yleensä kiraalinen selektori (CD), jonka lisäksi myös muilla elektrolyyttilisillä on huomattu olevan vaikutusta isomeerien erottumiseen.

Liuottimia vertailtaessa on usein päädytty suosittelemaan yleisimmin käytettyjä liuottimia. mm alkoholeista yhä edelleen MeOH:a suositellaan käytettäväksi liuottimeksi, vaikka PrOH:lla on saatu tutkimuksessa jopa parempia tuloksia. ACN:n taas on todettu nopeuttavan analyysiä sekä lisäävän analyyttien emäsvahvuutta. Myös laaja pH-alue mahdollistaa useiden erilaisten yhdisteiden erottamisen. Löytyy kuitenkin myös positiivisia tutkimustuloksia harvinaisemmin käytetyistä liuottimista kuten PC:sta ja NM:sta.

Tutkimuksessa käytetyistä artikkeleista löytyi sekä NACE:n että ACE:n puoltavia argumentteja. NACE:n selvästi huonoihin puoliin katsottiin kuuluvan vähäinen tieto liuottimien ominaisuuksista sekä analyyttien käyttäytymisestä niissä. Liikkuvuuksista on raportoitu hyvin ristiriitaisia tuloksia; osassa orgaanisissa liuottimissa saadaan kiistatta parempia liikkuvuuksia, kun taas toisissa vedessä.  $pK_a$ -arvojen on selvästi huomattu nousevan orgaanisissa liuottimissa verrattuna veteen. Nousu on kuitenkin saattanut olla hyvin pientä tai joissakin tapauksissa todella suurta. Tutkimuksessa tuli myös ilmi tapauksia, joissa vedellisten ja vedettömien olosuhteiden välille ei pystytty saamaan selvää paremmuusjärjestystä, ja paremman menetelmän valinta ei voitu perustella tutkimuksessa saaduilla tuloksilla. Aina ei myöskään löydetty syytä, miksi jollain analyytillä erottuminen oli parempaa ACE:ssa ja toisella NACE:ssa.

NACE:n paremmuudesta vedellisiin olosuhteisiin verrattuna on viime aikoina käyty paljon keskustelua. Yleisesti alussa NACE:a ylistettiin selkeästi parempana menetelmänä, ja tutkimustulokset antoivat selvän kuvan sen paremmuudesta. Kuitenkin vastikään on julkaistu kokoama-artikkeli, jossa oli teoreettisiin perusteisiin pohjautuen tarkasteltu yleisimpiä NACE:n etuina mainittuja argumentteja. Tutkimuksen lopputulos oli jopa tyrmäävä. Lähes kaikilla väitteillä oli täysin olemattomat teoreettiset pohjat, ja niiden valossa vedelliset olosuhteet jopa näyttivät osittain paremmilta. Erottumistehokkuus ja –selektiivisyys eivät missään nimessä parantuneet orgaanisia liuottimia käytettäessä.

Korkeampien sähkökenttävoimakkuuksien käyttö on teoriassa mahdollista orgaanisella liuottimella, mutta yleensä taas laitteiston rajat tulevat tässä vastaan. Ainoastaan liukoisuudessa NACE tarjoaa paremmat mahdollisuudet analyyttien erottumiselle, mutta vain veteen liukenemattomille yhdisteille. Tulokset kertovat eittämättä tutkijoiden pohjatietojen puutteesta. Niinpä siis, vaikka NACE:n onkin ehdotettu tarjoavan paremman vaihtoehdon ACE:lle, lopputulos saattaakin olla päinvastainen.

Selvää on että NACE tarjoaa laajat mahdollisuudet analyyttien erottumiseen mittavan liuotinmääränsä vuoksi. Haittana on sen uutuus, jolloin yhdisteiden käyttäytymisestä orgaanisissa liuottimissa ei ole saatu tarpeeksi tutkimustuloksia. Vedellisiin olosuhteisiin verrattuna NACE:n paremmuutta ei ainakaan vielä voida katsoa selkeästi paremmaksi. Suositeltavaa olisikin ajan ja rahan puitteissa kokeilla erilaisia orgaanisia liuottimia ja elektrolyyttisiä sekä verrata menetelmää vedelliseen menetelmään. Näin pystyttäisiin paremmin ennustamaan mittaustuloksia, ja saamaan enemmän luotettavaa tietoa NACE:n mahdollisuuksista.

**KIRJALLISUUSVIITTEET**

1. S.P. Porras, I.E. Valkó, P. Jyske, M.-L. Riekkola, Effect of electrolyte and solvent composition on capillary electrophoretic separation of some pharmaceuticals in non-aqueous media, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1999**, 38, 89-102.
2. M.-L. Riekkola, M. Jussila, S.P. Porras, I.E. Valkó, Non-aqueous capillary electrophoresis, Review, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 892, 155-170.
3. S.P. Porras, M.-L. Riekkola, E. Kenndler, The principles of migration and dispersion in capillary zone electrophoresis in nonaqueous solvents, Review, *Electrophoresis*, **2003**, 24, 1485-1498.
4. M.-L. Riekkola, Recent advantages in nonaqueous capillary electrophoresis, Review, *Electrophoresis*, **2002**, 23, 3865-3883.
5. M. Fillet, A.-C. Servais, J. Crommen, Effects of background electrolyte composition and addition of selectors on separation selectivity in nonaqueous capillary electrophoresis, Review, *Electrophoresis*, **2003**, 24, 1499-1507.
6. F. Steiner, M. Hassel, Nonaqueous Capillary electrophoresis: A versatile completion of electrophoretic separation techniques, Review, *Electrophoresis*, **2000**, 21, 3994-4016.
7. L. Geiser, M. Mirgaldi, J.-L. Veuthey, Determination of electroosmotic flow in nonaqueous capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1068, 75-81.
8. Properties of Liquids: Viscosity and Surface Tension, <http://www.mikeblaber.org/oldwine/chm1045/notes/Forces/Liquids/Forces03.htm>, Dr. Michael Blaber, Department of Biomedical Sciences, Florida State University (17.8.2007).
9. P.W. Atkins, *Physical Chemistry*, 6. Painos, Oxford University Press, Oxford, USA, 1998, ss. 650-651.
10. S.P. Porras, R. Kuldvee, S. Palonen, M.-L. Riekkola, Capillary electrophoresis of methyl-substituted phenols in acetonitrile, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 990, 35-44.
11. J. Muzikar, T. van de Goor, E. Kenndler, Propylene carbonate as a nonaqueous solvent for capillary electrophoresis: Mobility and ionization constant of aliphatic amines, *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 428-433.
12. J.-Z. Song, H.-X. Xu, S.-J. Tian, P.P.-H. But, Determination of quinolizidine alkaloids in traditional Chinese herbal drugs by nonaqueous capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 857, 303-311.

13. J. Muzikar, T. van de Goor, B. Gaš, E. Kenndler, Electrophoretic mobilities of large organic ions in nonaqueous solvents: Determination by capillary electrophoresis in propylene carbonate, N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide, acetonitrile and methanol, *Electrophoresis*, **2002**, *23*, 375-382.
14. X. Subirats, S.P. Porras, M. Rosés, E. Kenndler, Nitromethane as solvent in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1079*, 246-253.
15. S.P. Porras, M.-L. Riekkola, E. Kenndler, Electrophoretic mobilities of cationic analytes in non-aqueous methanol, acetonitrile and their mixtures influence of ionic strength and ion-pair formation, *J. Chromatogr. A*, **2001**, *924*, 31-42.
16. S.P. Porras, R. Kuldvee, M. Jussila, S. Palonen, M.-L. Riekkola, Capillary zone electrophoresis of phenol and methylphenols at high pH in methanol, *J. Sep. Sci.*, **2003**, *26*, 857-862.
17. S. Palonen, M. Jussila, S.P. Porras, T. Hyötyläinen, M.-L. Riekkola, Extremely high field strengths in non-aqueous capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **2001**, *916*, 89-99.
18. V.L. Ward, M.G. Khaledi, Efficiency studies in nonaqueous capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **1999**, *859*, 203-219.
19. P.-L. Laamanen, S. Busi, M. Lahtinen, R. Matilainen, Separation of chelating agents as copper complexes by capillary zone electrophoresis using quaternary ammonium bromides as additives in N-methylformamide, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, *580*, 91-98.
20. R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, J. Hernández-Méndez, E.M. Cruz, J. Domínguez-Álvarez, Ion-pair association and acid-base equilibria in nonaqueous capillary electrophoresis of weakly basic compounds, *Electrophoresis*, **2006**, *27*, 423-432.
21. H. Cottet, W. Vayaboury, D. Kirby, O. Giani, J. Taillades and F. Schué, Nonaqueous capillary zone electrophoresis of synthetic organic polypeptides, *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 5554-5560.
22. S. Descroix, A. Varenne, L. Geiser, S. Cherkaoui, J.-L. Veuthey, P. Gareil, Influence of electrolyte nature on the separation selectivity of amphetamines in nonaqueous capillary electrophoresis: Protonation degree versus ion pairing effects, *Electrophoresis*, **2003**, *24*, 1577-1586.

23. C. Demir, Y. Yücel, Optimization of the nonaqueous capillary electrophoresis separation of metal ions using mixture design and response surface methods, *Turk. J. Chem.*, **2006**, *30*, 181-192.
24. A. Karbaum, T. Jira, Chiral Separations of 1,3,4-thia- and 1,3,4-selenadiazine derivatives by use of non-aqueous capillary electrophoresis, *J Biochem. Biophys. Methods*, **2001**, *48*, 155-162.
25. I.M. Kolthoff, M.K.Jr. Chantooni, Basic strength of acetic acid and  $K_{IH+}^f$  values of some Hammet indicators in acetonitrile, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 4768-4769.
26. S.P. Porras, Capillary zone electrophoresis of some extremely weak bases in acetonitrile, *Anal. Chem.*, **2006**, *78*, 5061-5067.
27. Z.-L. Peng, F. Qu, G. Song, J.-M. Lin, Simultaneous separation of organomercury species by nonaqueous capillary electrophoresis using methanol containing acetic acid and imidazole, *Electrophoresis*, **2005**, *26*, 3333-3340.
28. J.M. Herrero-Martínez, E.F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, Separation and determination of homologues of linear alkylbenzenesulfonates by nonaqueous capillary zone electrophoresis using alkylammonium salts in ethanol, *Electrophoresis*, **2001**, *22*, 2017-2024.
29. [http://www.chemsoc.org/chembytes/ezine/2000/altria\\_nov00.htm](http://www.chemsoc.org/chembytes/ezine/2000/altria_nov00.htm), Royal Society of Chemistry, chemical science network (10.7.2007).
30. [http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien\\_sds-page/2/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien_sds-page/2/), Solunetti, Suomen Virtuaaliyliopisto, (18.8.2007).
31. C. Wang, C.A. Lucy, Mixed cationic/anionic surfactants for semipermanent wall coatings in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **2004**, *25*, 825-832.
32. T. Sokoließ, M. Gronau, U. Menyess, U. Roth, T. Jira, Separation of (Z)- and (E)-isomers of thioxanthene and dibenz[b,e]oxepin derivatives with calixarenes and resorcinarenes as additives in nonaqueous capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **2003**, *24*, 1648-1657.
33. G.A. Baker, S.N. Baker, S. Pandey, F.V. Bright, An analytical view of ionic liquids, *Analyst*, **2005**, *130*, 800-808.
34. A.M. Stalcup, B. Cabovska, Ionic liquids in chromatography and capillary electrophoresis, *J. Liq. Chromatogr & Rel. Techn.*, **2004**, *27*, 1443-1459.
35. M. Vaher, M. Koel, Specific background electrolytes for nonaqueous capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1068*, 83-88



36. M. Vaher, M. Koel, M. Kaljurand, Non-aqueous capillary electrophoresis in acetonitrile using ionic-liquid buffer electrolytes, *Chromatographia Suppl.*, **2001**, 53, S-302-S-306.
37. M. Vaher, M. Koel, M. Kaljurand, Ionic liquids as electrolytes for nonaqueous capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **2002**, 23, 426-430.
38. J. Tjørnelund, S.H. Hansen, Separation of neutral substances by non-aqueous capillary electrophoresis through interactions with cationic additives, *J. Chromatogr. A*, **1997**, 792, 475-482.
39. P.-L. Laamanen, S. Busi, M. Lahtinen, R. Matilainen, A new ionic liquid dimethyldinonylammoniumbromide as a flow modifier for the simultaneous determination of eight carboxylates by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1095, 164-171.
40. P.-L. Laamanen, E. Blanco, R. Cela, R. Matilainen, Improving sensitivity in simultaneous determination of copper carboxylates by nonaqueous capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1110, 261-267.
41. A.-C. Servais, M. Fillet, P. Chiap, W. Dewé, P. Hubert, J. Crommen, Influence of the nature of the electrolyte on the chiral separation of basic compounds in nonaqueous capillary electrophoresis using heptakis(2,3-di-O-methyl-6-O-sulfo)- $\beta$ -cyclodextrin, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1068, 143-150.
42. T.K. Natishan, Recent progress in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Techn.*, **2005**, 28, 1115-1160.
43. Y. Bitar, B. Degel, T. Schirmeister, U. Holzgrabe, Comparison of the separation of aziridine isomers applying heptakis(2,3-di-O-methyl-6-sulfato) $\beta$ -CD and heptakis(2,3-O-acetyl-6-sulfato) $\beta$ -CD in aqueous and nonaqueous systems, *Electrophoresis*, **2005**, 26, 3897-3903.
44. Y.-S. Huang, C.-C. Tsai, J.-T. Liu, C.-H. Lin, Comparison of the use of aqueous and nonaqueous buffers in association with cyclodextrin for the chiral separation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and related compounds, *Electrophoresis*, **2005**, 26, 3904-3909.
45. A.-C. Servais, M. Fillet, A.M. Abushoffa, P. Hubert, J. Crommen, Synergistic effects on ion-pairing in the enantiomeric separation of basic compounds with cyclodextrin derivatives in nonaqueous capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **2003**, 24, 363-369.
46. S. Li, G. Vigh, Use of the new, single-isomer, hexakis(2,3-diacetyl-6-O-sulfo)- $\alpha$ -cyclodextrin in acidic methanol background electrolytes for nonaqueous capil-

- lary electrophoretic enantiomer separations, *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1051*, 95-101.
47. S.P. Porras, M.-L. Riekkola, E. Kenndler, Capillary zone electrophoresis of basic analytes in methanol as non-aqueous solvent. Mobility and ionisation constant, *J. Chromatogr. A*, **2001**, *905*, 259-268.
48. S.P. Porras, M.-L. Riekkola, E. Kenndler, Resolution in capillary electrophoresis with nonaqueous methanol as solvent: Theoretical prediction and experimental confirmation, *Electrophoresis*, **2001**, *22*, 3798-3804
49. H. Sirén, R. Kuldvee, T. Karla, T. Ekström, M.-L. Riekkola, Capillary zone electrophoresis of cationic and anionic drugs in methanol, *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1068*, 89-97.
50. A. Psurek, G.K.E. Scriba, Peptide separations and dissociation constants in nonaqueous capillary electrophoresis: Comparison of methanol and aqueous buffers, *Electrophoresis*, **2003**, *24*, 765-773.
51. S.P. Porras, E. Kenndler, Capillary electrophoresis in N,N-dimethylformamide, *Electrophoresis*, **2005**, *26*, 3279-3291.
52. D.C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 5. Painos, W.H. Freeman & Company, New York, USA, 1999, ss. 770-775.
53. I.E. Valkó, H. Sirén, M.-L. Riekkola, Characteristics of the electroosmotic flow in capillary electrophoresis in water and in organic solvents without added ionic species, *J. Microcol. Sep.*, **1999**, *11*, 199-208
54. M. Grob, F. Steiner, Characteristics of the electroosmotic flow of electrolyte systems for nonaqueous capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **2002**, *23*, 1853-1861.
55. S. Palonen, M. Jussila, S.P. Porras, T. Hyötyläinen, M.-L. Riekkola, Nonaqueous capillary electrophoresis with alcoholic background electrolytes: Separation efficiency under high electrical field strengths, *Electrophoresis*, **2002**, *23*, 393-399.
56. J. Muzikar, T. van de Goor, E. Kenndler, The principle cause of lower plate numbers in capillary zone electrophoresis with most organic solvents, *Anal. Chem.*, **2002**, *74*, 434-439.
57. A. Psurek, S. Feuerstein, D. Willbold, G.K.E. Scriba, Nonaqueous versus aqueous capillary electrophoresis of  $\alpha$ -helical polypeptides: Effect of secondary structure separation selectivity, *Electrophoresis*, **2006**, *27*, 1768-1775.

58. E.M. Hilder, C.W. Klampfl, W. Buchberger, P.R. Haddad, Comparison of aqueous and nonaqueous carrier electrolytes for the separation of penicillin V and related substances by capillary electrophoresis with UV and mass spectrometric detection, *Electrophoresis*, **2002**, 23, 414-420.
59. E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, Comparative study of aqueous and non-aqueous capillary electrophoresis in the separation of halogenated phenolic and bisphenolic compounds in water samples, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1068, 189-199.
60. S.P. Porras, E. Kenndler, Are the asserted advantages of organic solvents in capillary electrophoresis real? A critical discussion, *Electrophoresis*, **2005**, 26, 3203-3220.

## **LITTEET**

1. Liuottimien fysikokemiallisia ominaisuuksia (taulukko)

Taulukko 1. Yleisimpien NACE:ssa käytettyjen liuottimien ominaisuuksia 25 °C

Liutin	Lyhenne	T <sub>b</sub> [°C]	pK <sub>auto</sub>	η [mPa s]	ε	μ [D]	polaari- suus	γ [mN m <sup>-1</sup> ]	DN [kJ mol <sup>-1</sup> ]	AN
Vesi	H <sub>2</sub> O	100,0	14,00	0,8903	78,36	1,85	10,2	71,8	138	54,8
Metanoli	MeOH	64,5	16,91	0,551	32,66	2,87	5,1	22,3	126	41,3
Etanoli	EtOH	78,2	19,1	1,083	24,55	1,66	4,3	21,9	134	37,1
1-propanoli	1-PrOH	97,1	19,4	1,943	20,45	3,09		23,1		
2-propanoli	2-PrOH	82,2	21,08	2,044	19,92	1,66		21,2	151	33,5
1-butanoli	1-BuOH	117,6	20,89	2,571	17,51	1,75		24,2	126	36,8
Formamidi	FA	210,5	16,8	3,302	109,5	3,37	9,6	58,2	151	39,8
N-metyyliformamidi	NMF	199,5	10,74	1,65	182,4	3,86	6,0	39,5	205	32,1
N,N-dimetyyliformamidi	DMF	153	23,1	0,802	36,71	3,82	6,4	36,4	111	16,0
N,N-dimetyyliasetamidi	DMA	166,1	23,95	0,927	37,78	3,72			116	13,6
Asetonitriili	ACN	81,6	32,2	0,341	35,94	3,92	5,8	28,3	59	18,9
Propyleenikarbonaatti	PC	241,7		2,53	64,92	4,94		41,4		
Dimetyylisulfoksidi	DMSO	189,0	31,8	1,991	46,45	4,06	7,2	43,0	121	19,3
Nitrometaani	NM	101,2	≥ 24	0,614	36,3					
Tetrahydrofuraani	THF	66		0,460	7,58		4,0	26,4		

T<sub>b</sub> = kiehumispiste, pK<sub>auto</sub> = autoprotolyysivakio, η = dynaaminen viskositeetti, ε = suhteellinen permittiivisyys = dielektrisyysvakio, μ = dipolimomentti ja γ = pintajännitys, DN = luovuttajaluku, AN = vastaanottajaluku