ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

ქიმიური ექსპერტიზის მიმართულება

ნინო ზაქაშვილი

ფუძე ბუნების მქონე სამკურნალწამლო საშუალებათა ენანტიომერების დაყოფა წყალი-მეთანოლი წყალი-აცეტონიტრილის ტიპის მოძრავი ფაზებით მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიაში

ნაშრომი შესრულებულია ქიმიური ექსპერტიზის მაგისტრის ხარისხის მოსაპოვებლად

ხელმძღვანელი: ბეჟან ჭანკვეტაძე

ქიმიის მეცნიერებათა დოქტორი,

საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის აკადემიკოსი,

ფიზიკური და ანალიზური ქიმიის კათედრის სრული პროფესორი.

თბილისი

2017

ანოტაცია

ბეტა-ბლოკატორები ინტენსიურად გამოყენებული ქირალურ სამკურნალწამლო საშუალებათა რიცხვს მიეკუთვნება. ქირალური სამკურნალწამლო საშუალებების ენანტიომერების ანალიზური და პრეპარატული დაყოფა ძალიან მნიშვნელოვანია, რადგანაც ამ ენანტიომერებს, როგორც წესი, განსხვავებული ფარმაკოლოგიური და ტოქსიური თვისებები გააჩნია. ენანტიომერული ნარევების დაყოფის ერთ-ერთ ძირითად მეთოდს წარმოადგენს მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია, ხოლო ამ მეთოდში ყველაზე ფართოდ გამოყენებულ ქირალურ სტაციონარულ ფაზებს პოლისაქარიდების ნაწარმების საფუძველზე მომზადებული მასალები. პოლისაქარიდული მასალების გამოყენება ენანტიომერული ნარევების დასაყოფად შეიძლება განხორციელდეს პოლარულ-ორგანული, ნახშირწყალბადი-სპირტის და ორგანული გამხსნელების წყალხსნარების გამოყენებით. ამ უკანასკნელი მეთოდის მექანიზმები დღეისათვის ნაკლებად შესწავლილია. აქედან გამომდინარე წინამდებარე სამუშაოს მიზანს შეადგენს ქირალური ბეტა-ბლოკატორების ენანტიომერების დაყოფის შესწავლა ახალი ტიპის პოლისაქარიდული ქირალური სტაციონარული ფაზების და ორგანული გამხსნელების წყალხსნარების გამოყენებით. კერძოდ უნდა გაირკვეს საკითხი დაყოფის მექანიზმის (ჰიდროფობური თუ ჰიდროფილური ურთიერთქმედების ქრომატოგრაფია) შესახებ. დაყოფის მექანიზმის გარკვევა საშუალებას მოგვცემს მოვახდინოთ ენანტიომერული ნარევების დაყოფის ოპტიმიზაცია.

Summary

b-Blockers are widely used group of chiral drugs. Separation of enantriomers of chiral drugs is important because the enantiomers commonly exhibit different pharmacological and toxic properties. High-performance liquid chromatography (HPLC) is one of the major methods for separation of enantiomers and polysaccharide derivatives belong to the most successful chiral

selectors for separation of enantiomers in HPLC. These materials can be used for HPLC separation of enantiomers in combination with hydrocarbon-alcohol, polar-organic and aqueous-organic mobile phases. The chiral separation mechanism, especially with aqueous-organic mobile phases is not known yet. Therefore, the aim of the present study was to investigate the separation mechanism (hydrophobic or hydrophilic interaction chromatography) of enantiomers of chiral b-blockers on polysaccharide-based chiral columns in combination with aqueous-organic mobile phases. The understanding of chiral separation mechanism will provide the possibility for further optimization of separation process.

შინაარსი

ანოტაცია 2

1. შესავალი 5

2. ლიტერატურული ნაწილი

2.1 ქრომატოგრაფიული მეთოდები.....6

2.2 ენანტიომერების დაყოფა მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიაში.....7

2.3 შებრუნებულ ფაზიანი სითხური ქრომატოგრაფია.....8

2.4 β-ბლოკატორები და მათი ფარმაკოლოგიური აქტივობა.....10

2.5 პოლისაქარიდების ნაწარმების გამოყენება სითხურ ქრომატოგრაფიაში.....11

3. ექსპერიმენტული ნაწილი

3.1 ექსპერიმენტში გამოყენებული ელუენტები.....12

3.2 გამოყენებული ხელსაწყო.....13

3.3 ანალიზის პირობები.....14

3.4 გამოყენებული ქირალური სტაციონარული ფაზები.....14

3.6 საკვლევი ბეტა-ბლოკატორები.....16

4. შედეგები და განსჯა 18

5. დასკვნები.....31

6. გამოყენებული ლიტერატურა..... 32

1. შესავალი

ქირალური ქიმიური ნივთიერებების ენანტიომერული ნარევების დაყოფა და ენანტიომერული სისუფთავის კონტროლი მნიშვნელოვანია ქიმიის სხვადასხვა დარგებისათვის, განსაკუთრებით კი ფარმაცევტული სფეროსთვის. ენანტიომერული ნარევების ანალიზური დაყოფის ძირითად მეთოდს წარმოადგენს მაღალეფექტური სთხური ქრომატოგრაფია.

ენანტიომერების დაყოფა აქირალურ გარემოში შეუძლებელია მათი ერთმანეთის იდენტური ფიზიკური და ქიმიური თვისებების გამო. მათი ერთადერთი განმასხვავებელი ფიზიკური ფაქტორი არის სინათლის პოლარიზაციის სიბრტყის ბრუნვის უნარი განსხვავებული ნიშნით. ენანტიომერების ერთმანეთისგან განსხვავება შესაძლებელია მხოლოდ ატომთა ან რადიკალთა განსხვავებული ორიენტაციით სივრცეში. მათი ერთნაირი შედგენილობის მიუხედავად მათი ბიოლოგიური მოქმედება მკვეთრად განსხვავებულია, ამიტომ მნიშვნელოვანია მათი ანალიზი სამკურნალო საშუალებებში, საკვებ დანამატებში, სასოფლო-სამეურნეო შხამქიმიკატებში და სხვა ობიექტებში.

პოლისაქარიდების საფუძველზე მომზადებული ქირალური სორბენტები ფართოდ გამოიყენება ენანტიომერული ნარევების დასაყოფად, მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიაში, როგორც ნორმალურ/პირდაპირ ფაზიან ასევე შებრუნებულ ფაზიან და პოლარულ ორგანული მოძრავი ფაზების გამოყენებით.

დღესდღეობით ბოლომდე არ არის გარკვეული საკითხი იმ მოლეკულათაშორისი ძალების შესახებ, რომლებიც განაპირობებს ენანტიომერული ნარევების შეკავებას ქირალურ სელექტორზე და მათ ქირალურ გამოცნობას სხვადასხვა გარემოში. ენანტიომერების ელუირების რიგის ცვლილება ქირალურ გარემოში ნიშნავს ქირალური სელექტორის გამოცნობის შებრუნებას და ქირალური გამოცნობის თვისობრივ ცვლილებას. რადგანაც ქირალურ სელექტორსა და სელექტანდს შორის მოქმედი მოლეკულათაშორისი ძალები დამოკიდებულია გარემო პირობებზე, შესაბამისად

ქირალური გამოცნობის მექანიზმიც განსხვავებულია მოძრავ ფაზაში სხვადასხვა მჟავა ან ფუძე დანამატების არსებობისას.

2.ლიტერატურის მიმოხილვა

2.1 ქრომატოგრაფიული მეთოდები

სითხური ქრომატოგრაფია XX საუკუნის 50-იანი წლებიდან ვითარდება. მოკლე დროში იგი გახდა ორგანულ ნივთიერებათა დაყოფისა და ანალიზის საყოველთაოდ აღიარებული მეთოდი. უფრო მოგვიანებით, განვითარება დაიწყო მაღალეფექტურმა სითხურმა ქრომატოგრაფიამ, რომელმაც გამოყენების ტემპით არა მხოლოდ შეცვალა კლასიკური სვეტური, თხელფენოვანი და ქაღალდზე ქრომატოგრაფია, არამედ საგრძნობლად ჩამოიტოვა უკან გაზური ქრომატოგრაფიაც. მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის სწრაფი განვითარება განაპირობა საკვლევი ნივთიერებების მოლეკულური მასების ფართო სპექტრმა. თუ გაზური ქრომატოგრაფიის გამოყენება შეიძლება 500-600 ნ.ე. მასის მქონე ნივთიერებების ნარევების დასაყოფად, სითხური ქრომატოგრაფიის გამოყენებისას ეს რიცხვი იზრდება რამდენიმე ასეულიდან მილიონამდე. მათ შორისაა პოლიმერების საკმაოდ რთული მაკრომოლეკულები, ცილები, ნუკლეინის მჟავები და სხვა რთული ნაერთები. ამასთანავე თითქმის ყველა დაყოფა შეიძლება ჩატარდეს ოთახის ტემპერატურასთან ახლოს, ჰაერთან კონტაქტის გარეშე, რაც ძალზე მნიშვნელოვანია 11 ლაბილური ნაერთების, კერძოდ, ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების და ბიოპოლიმერების კვლევისას.

აპარატურული გაფორმებისა და გამოყენებული უძრავი ფაზების ბუნების მიხედვით, თხევადი ქრომატოგრაფიული პროცესების კლასიფიკაცია შეიძლება შემდეგნაირად მოვახდინოთ: ერთისმხრივ პლანარული რომელიც მოიცავს თხელფენოვან ქრომატოგრაფიას და ქრომატოგრაფიას ქაღალდზე, ხოლო მეორეს მხრივ სვეტური ქრომატოგრაფია, რომელიც მოიცავს ადსორბციულ, აფინურს, თხევად-თხევად, იონმიმოცვლით და გელ- ქრომატოგრაფიას.

სითხური ქრომატოგრაფია წარმოადგენს ენანტიომერული ანალიზის ერთ-ერთ უძლიერეს მეთოდს, როგორც მათი ანალიზური ასევე პრეპარატული დაყოფის მიზნით. ენანტიომერული ანალიზი ასევე შესაძლებელია გაზურ ქრომატოგრაფიაშიც, მაგრამ სითხურ ქრომატოგრაფიას, გაზურ ქრომატოგრაფიასთან შედარებით გააჩნია უპირატესობა, გაზური ქრომატოგრაფიისგან განსხვავებით მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია არააქროლადი და თერმოლაბილური ნივთიერებების ანალიზის საშუალებას იძლევა. ენანტიომერულ ანალიზში გამოიყენება როგორც ნორმალური/პირდაპირი, ისე შებრუნებულფაზიანი ქრომატოგრაფია და პოლარულ ორგანული მოძრავი ფაზები. დღეისათვის ქირალური უძრავი ფაზების დიდი არჩევანი არსებობს. ლიტერატურაში 200-მდე ასეთი ფაზაა აღწერილი, ამის მიუხედავად ოპტიმალური სტაციონარული ფაზა არ არსებობს და ამა თუ იმ ქირალური ნივთიერების ენანტიომერების ქრომატოგრაფიული დაყოფა მოითხოვს უშუალოდ საკლვლევ კომპონენტზე სელექტორისა და მოძრავი ფაზის „მორგებას“ [1].

2.2 ენანტიომერების დაყოფა მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიაში

მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია ერთ-ერთი ყველაზე მძლავრი მეთოდია ენანტიომერების კვლევაში. ენანტიომერების ელუირების რიგი ქირალური ქრომატოგრაფიული ანალიზის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან საკითხს წარმოადგენს, როგორც თეორიული, ისე პრაქტიკული თვალსაზრისით. ქირალური ნივთიერებების ენანტიომერული სისუფთავის დადგენის დროს სასურველია მინარევის სახით არსებული ენანტიომერი ელუირდეს ძირითად პიკზე ადრე, რათა არ მოხდეს მცირე მინარევის პიკის გადაფარვა ძირითადი პიკით. ენანტიომერული ნარევების პრეპარატული დაყოფების დროს სასურველი ენანტიომერი უნდა ელუირდეს როგორც პირველი პიკი, რათა მოხდეს დაყოფის ციკლის უმოკლესი დროის მიღწევა. იმ ფაქტორების დადგენა, რომლებიც აკონტროლებენ ენანტიომერების ელუირების რიგს საანალიზო სისტემაში, მნიშვნელოვანია აგრეთვე ქირალური გამოცნობის მექანიზმების კვლევის თვალსაზრისით [2].

ფარმაცევტულ მრეწველობაში ქირალური მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია აღიარებულია, როგორც ძირითადი მეთოდი ქირალური სამკურნალწამლო საშუალებების კვლევასა და განვითარებაში: ფარმაკოკინეტიკის, ფიზიოლოგიური, ტოქსიკოლოგიური და მეტაბოლიტური აქტივობის დეტალური გამოკვლევაა საჭირო წამლის გამოყენებამდე. ამ ტენდენციის გამო ფარმაცევტულ ბაზარზე გაიზარდა წამლების რიცხვი, რომლებიც შეიცავენ მხოლოდ ერთ ენანტიომერს. ჯერ კიდევ 1998 წლისთვის ერთი ოპტიკური იზომერის შემცველი სამკურნალო პრეპარატების წლიური გაყიდვები 96,4 მილიარდ აშშ დოლარს შეადგენდა და მისი რაოდენობა დღემდე განუწყვეტლივ იზრდება და გააგრძელებს ზრდას მომავალშიც. დაყოფის ეფექტური და ენანტიომერთა დიდი რაოდენობის მომცველი ქირალური სტაციონარული ფაზების შემუშავება არის ქირალური მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის ერთ-ერთი ძირითადი ამოცანა. ქირალური სტაციონალური ფაზა ძირითადად შედგება ან მცირე ზომის ქირალური მოლეკულების, ან ქირალური პოლიმერებისაგან, რომლებიც მოთავსებულია შემავსებლებზე, როგორც წესი ეს არის მაღალი სისუფთავის სილიკაგელი. პოლიმერები შეიძლება ასევე გამოყენებულ იქნას, როგორც ფორებიანი გელი. პოლისაქარიდ–ბენზოატისა და ფენილკარბამატის ნაწარმებზე 15 დამზადებული ქირალური სტაციონარული ფაზები ყველაზე ფართოდ გამოყენებულია ორგანულ, ბიოორგანულ და ფარმაცევტულ ქიმიაში[3-4].

2.3 შებრუნებულ ფაზიანი სითხური ქრომატოგრაფია

შებრუნებულფაზიანი ქრომატოგრაფია თხევადი ქრომატოგრაფიის ყველაზე უფრო გავრცელებული მეთოდია. ამ მეთოდის ასეთ პოპულარობას განაპირობებს შებრუნებულფაზიანი ქრომატოგრაფიის შემდეგი ძირითადი უპირატესობები: მეთოდი ძლიერ მოქნილია და მისაღებია მრავალი სხვადასხვა ნივთიერებათა ნარევების დასაყოფად. მეთოდი მაღალსელექტიურია ყველა სახის ნივთიერებათა მიმართ, ძლიერ პოლარული ნივთიერებების გარდა. შებრუნებულ ფაზიან რეჟიმში შეიძლება

განხორციელდეს როგორც წყალში ხსნადი,ასევე რიგ ორგანულ გამხსნელებში ხსნად ნივთიერებათა დაყოფა. წყლიანი სისტემის გამოყენება საშუალებას იძლევა მოძრავ ფაზებად გამოყენებულ იქნას ბუფერული სისტემები,რაც აუმჯობესებს სელექტიურობას და ეფექტურობას.

შებრუნებულფაზიან ქრომატოგრაფიაში გამოყენებული სტაციონარული ფაზები (სილიკაგელის საფუძველზე მომზადებული ალკილის ჯგუფებით მოდიფიცირებული სორბენტები) იძლევა მოძრავი ფაზის pH-ის ცვლილების საშუალებას 2-დან 7-მდე ინტერვალში. pH-ის ასეთ ინტერვალში ძლიერი ფუძეები პრაქტიკულად მთლიანად პროტონირებულნი არიან,ამიტომ მათი დაყოფა უნდა მოხდეს იონების სახით იონ-წყვილური ან იონ-გაცვლითი ქრომატოგრაფიის მეთოდით. pH-ის ფართო დიაპაზონსი ვარგისი სტაციონარული ფაზების მიღებას ამის გამო დიდი მნიშვნელობა აქვს.

მოძრავი ფაზა. მოძრავი ფაზა შებრუნებულფაზიან ქრომატოგრაფიაში ჩვეულებრივად არის წყალი ან წყლიანი ბუფერული ხსნარის ნარევი სხვადასხვა წყალთან შერევად გამხსნელებთან. წყალი ძლიერი მაელუირებელი გარემოა ადსორბციულ ქრომატოგრაფიაში. წყალი ძლიერად ურთიერთქმედებს სილიკაგელთან ან ალუმინის ოქსიდის აქტიურ ცენტრებთან,რაც ხელს უშლის ნიმუშის მოლეკულების ადსორბციას და ისინი სწრაფად ელუირდება.სრულიად საწინააღმდეგო როლი ეკისრება წყალს შებრუნებულფაზიან ქრომატოგრაფიაში.წყალს არ შეუძლია დაასველოს არაპოლარული ალკილური ჯგუფები და არ შეუძლია ურთიერთქმედება მათთან. აქედან გამომდინარე, იგი ყველაზე უფრო სუსტი მოძრავი ფაზაა და ნიმუშის ელუირების სიჩქარე ძალიან დაბალია.რაც უფრო მეტია წყლის შემცველობა ელუენტში,მით უფრო ხანგრძლივია შეკავების დრო.

შეკავების დრო მით მეტია, რაც უფრო მეტია ნახშირბადის ატომების რიცხვი მოლეკულაში.ზოგადი წესის მიხედვით,შეკავება იზრდება ნიმუშის მოლეკულებსა და სტაციონარულ ფაზას შორის საკონტაქტო ფართობის გაზრდით,რომელიც გამოთავისუფლდება ნივთიერების ადსორბციის დროს. განტოტვილი ჯაჭვის ნივთიერებები უფრო სწრაფად ელუირდება, ვიდრე მათი შესაბამისი ხაზოვანი იზომერები.

გამხსნელების პოლარობა მცირდება და მაელუირებელი ძალა იზრდება შემდეგი თანმიმდევრობით:

მეთანოლი → აცეტონიტრილი → ეთანოლი → იზოპროპანოლი → დიმეთილფორმამიდი →პროპან-1-ოლი → დიოქსანი → ტეტრაჰიდროფურანი.

შებრუნებულფაზიან ქრომატოგრაფიაში მოძრავი ფაზის შეცვლით შეიძლება შეკავების შეცვლა ძალიან დიდ დიაპაზონში, რადგანაც საანალიზო ნივთიერებების შეკავება ორგანულ გამხსნელებში (მეთანოლი,ეთანოლი,ტეტრაჰიდროფურანი,აცეტონიტრილი) ძალიან მცირეა,ხოლო წყალში კი მეტისმეტად დიდი, ამიტომ იყენებენ წყლისა და ორგანული მოდიფიკატორების ნარევებს.

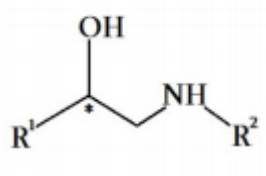
შებრუნებულფაზიანი ქრომატოგრაფია თავსებადია წყლიან ნიმუშებთან, ისეთებთან როგორიცაა გარემოს ნიმუშები,ფარმაცევტული პრეპარატები, სასმელები. რადგანაც წყალი არის ყველაზე სუსტი ელუენტი, წყალხსნარები შეიძლება შევიყვანოთ პირდაპირ წინასწარი დამუშავების გარეშე (თუმცა ფილტრაცია და ცენტრიფუგირება აუცილებელია).[5].

2.4 β-ბლოკატორები და მათი ფარმაკოლოგიური აქტივობა

პირველი ცნობები β-ბლოკატორების შესახებ ვრცელდებოდა მე-XX საუკუნის შუახანებში. 1958 წელს სინთეზირებულ იქნა პირველი β-ბლოკატორი დიქლოროიზოპროტერენოლი (ელაი-ლილის ლაბორატორიაში). 1962 წელს ჯეიმს ბლექი იყო პირველი, ვინც β-ბლოკატორები კლინიკური მნიშვნელობით გამოიყენა. მან შექმნა პროპრანოლოლი და პრონეტალოლი, რამაც რევოლუცია მოახდინა სტენოკარდიის მკურნალობაში. სწორედ პროპრანოლოლის გამოგონებისთვის 1988 წელს ჯეიმს ბლექს მიენიჭა ნობელის პრემია.

β-ბლოკატორების კლინიკური თვალსაზრისით გამოყენებამ მნიშვნელოვანი წვლილი შეიტანა მე-XX ს-ის კლინიკურ მედიცინასა და ფარმაკოლოგიაში.

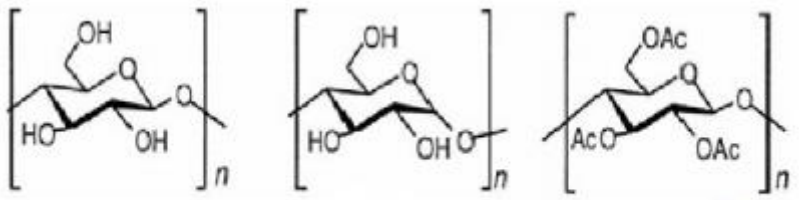
β-ბლოკატორებს აქვთ არილოქსი-ამინო-სპირტების ჩონჩხი, რომელიც ძირითადად განაპირობებს მათ ფარმაკოლოგიურ მოქმედებას. ცნობილია, რომ β-ბლოკატორების უმეტესობის S -ენანტიომერი ფარმაკოლოგიურად უფრო აქტიურია, ვიდრე R-ენანტიომერი.



β-ბლოკატორები ცნობილია ასევე, როგორც ბეტა-ადრენერგული მაბლოკირებელი აგენტები. ისინი არიან წამლები, რომლებიც ურთიერთქმედებენ ადრენალინისა და ნორადრენალინისადმი მგრძნობიარე β-რეცეპტორებთან [6].

2.5 პოლისაქარიდების ნაწარმების გამოყენება სითხურ ქრომატოგრაფიაში

სითხურ ქრომატოგრაფიაში გამოსაყენებლად პოლისაქარიდული ქირალური ფაზები პირველად დასინთეზებულ იყო ჰესესა და ჰაგელის მიერ 1973 წელს მიკროკრისტალური ცელულოზის ტრიაცეტატის სახით. (ცელულოზის ტრიაცეტატი), თუმცა ლიტერატურაში მოხსენიებულია ადრეული მცდელობები ენანტიომერული ნარევების დასაყოფად სვეტური და პლანარული/ქაღალდის ქრომატოგრაფიის მეთოდების გამოყენებით სხვადასხვა ტიპის ბუნებრივ პოლისაქარიდებზე.



ცელულოზა ამილოზა ცელულოზა ტრიაცეტატი

აღნიშნულმა ქირალურმა სტაციონალურმა ფაზამ აჩვენა ენანტიომერების დაყოფის საინტერესო თვისებები, რის გამოც ბევრი არომატული და ალიფატური ენანტიომერების დაყოფა გახდა შესაძლებელი.

ენანტიომერების დასაყოფად პოლისაქარიდებზე დაფუძნებული ქირალური სელექტორების ოპტიმიზაცია, მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიაში პირველად ჩატარდა 1980-იან წლებში. ძირითადი კვლევები მიმდინარეობდა იაპონიაში, ოკამოტოს (Y.Okamoto) ჯგუფის მიერ ოსაკას უნივერსიტეტში და კომპანია დაიცელის მიერ.

3.ექსპერიმენტული ნაწილი

3.1 ექსპერიმენტში გამოყენებული მოძრავი ფაზები

ექსპერიმენტში მოძრავ ფაზებად გამოყენებული გვქონდა სუფთა აცეტონიტრილი და მეთანოლი, ასევე წყალი/მეთანოლი და წყალი აცეტონიტრილი, მოძრავ ფაზებში თანდათან ვზრდიდით წლის შემცველობას.

გარდა ამისა გამხსნელს დამატებული ჰქონდა ფუძე ბუნების მოდიფიკატორი - დიეთილამინი და ამონიუმის აცეტატი.

1. **მეთანოლი**
2. **მეთანოლი/წყალი (95/ 5 → 90/10 → 80/20 → 70/30 → 60/40)**

მოძრავ ფაზას ერთდროულად ჰქონდა დამატებული დიეთილამინი და ამონიუმის აცეტატი.

3. **აცეტონიტრილი**
4. **აცეტონიტრილი/წყალი (95/ 5 → 90/10 → 80/20 → 70/30 → 60/40 → 50/50)**
   მოძრავ ფაზას დამატებული ჰქონდა ფუძე ნივთიერება (დიეთილამინი),ხოლო გარკვეულ ეტაპზე მოძრაც ფაზებს დიეთილამინთან ერთად მცირე დანამატის სახით ვამატებდით ამონიუმის აცეტატს.

3.2 გამოყენებული ხელსაწყო

ექსპერიმენტში გამოყენებული იყო ,,Agilent Technologies" Infinity 1260 მოდელის მაღალეფექტური სითხური ქროტოგრაფი,რომელიც შედგება შემდეგი მოდულებისაგან:

ბინარული ტუმბო

ნიმუშების მიწოდების ავტომატური სისტემა

სვეტების თერმოსტატი

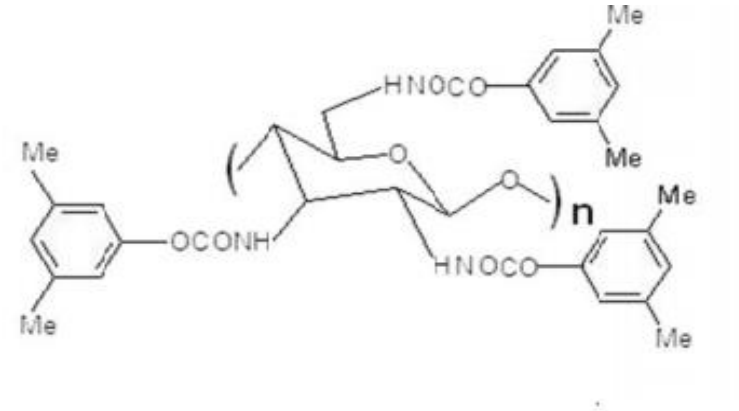
დიოდური დეტექტორი

ხელსაწყოს მართვისა და შედეგების დამუშავების სისტემა, Agilent LC Chemistation B.03.02'' 9(Agilent Inc., Santa Clara, CA, USA)

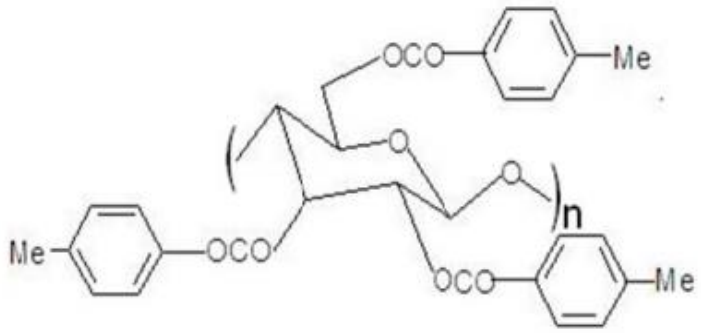
3.3 ანალიზის პირობები

ელუენტის ნაკადი იყო 1 მლ/წთ და აუცილებლობის შემთხვევაში 0,5 მლ/წთ, დეტექტირება ხდებოდა 220 ნმ და 254 ნმ ტალღის სიგრძეზე. ექსპერიმენტები ტარდებოდა ოთახის ტემპერატურაზე.

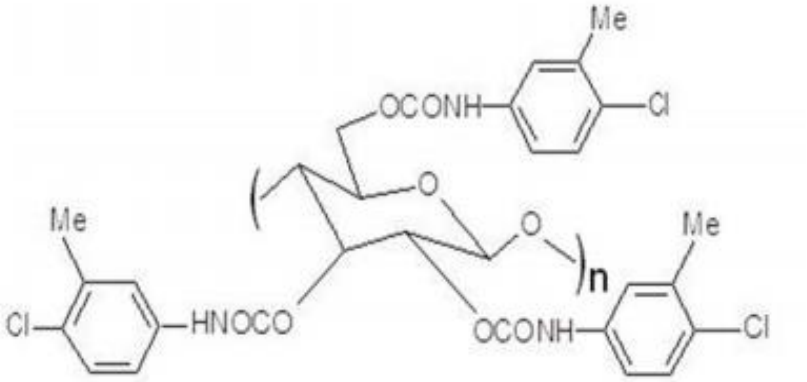
3.4 გამოყენებული ქირალური სტაციონარული ფაზები



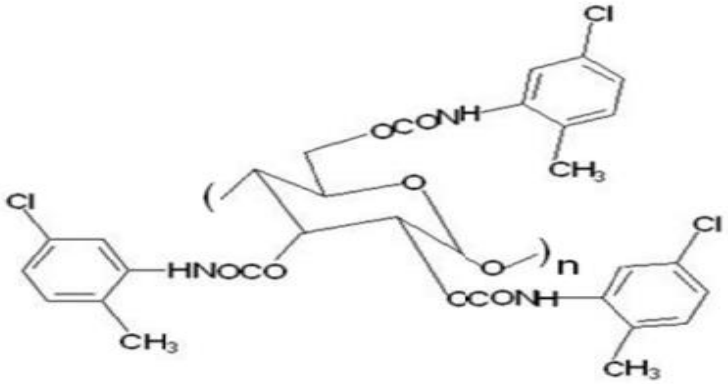
ცელულოზა-1 ცელულოზა ტრის (3,5-დიმეთილფენილკარბამატი



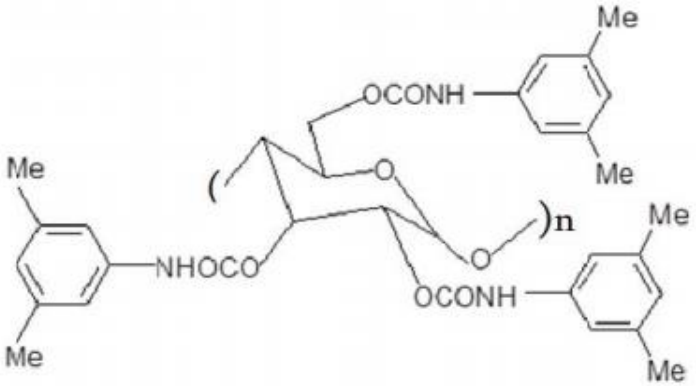
ცელულოზა-3 ცელულოზა ტრის (4-მეთილბენზოატი)



ცელულოზა-4 ცელულოზა ტრის (4-ქლორ-3-მეთილფენილკარბამატი)



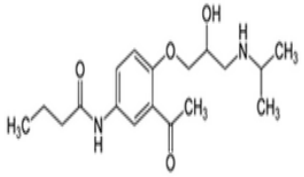
ამილოზა-2 ამილოზა ტრის (2-ქლორ-5-მეთილფენილკარბამატი)



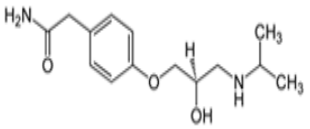
SP-6 ამილოზა ტრის (3,5-დიმეთილფენლიკარბამატი)

3.6 საკვლევი ბეტა-ბლოკატორები

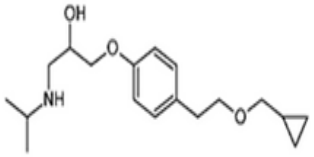
ექსპერიმენტში გამოყენებული იყო 22 ქირალური ბეტა-ბლოკატორი:ატენოლოლი, აცებუტოლოლი, ბეტაქსოლოლი, ბისოპროლოლი, ბოპინდოლოლი, ბუნიტროლოლი, ბუპრანოლოლი, ესმოლოლი, კარაზოლოლი, ლაბეტალოლი, მაბუტეროლი, მეტოპროლოლი, მეტიპრანოლოლი, ნადოლოლი, ნიფენალოლი, ოქსპრენალოლი, პინდოლოლი, პროპრანოლოლი, ცელიპროლოლი, სოტალოლი, ფენეტეროლი, ტერტატოლოლი



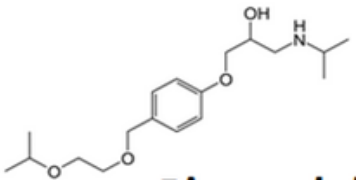
აცებუტოლოლი



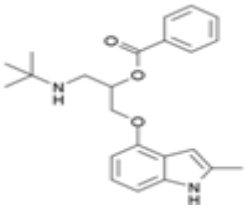
ატენოლოლი



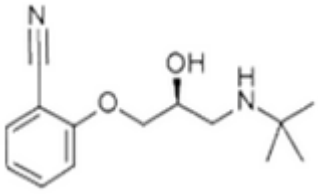
ბეტაქსოლოლი



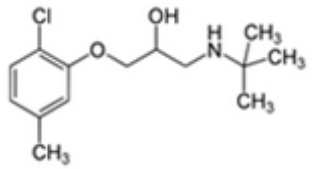
ბისოპროლოლი



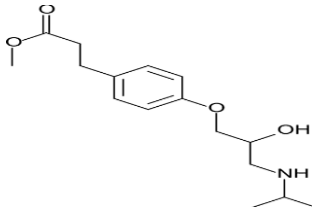
ბოპინდოლოლი



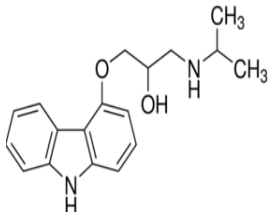
ბუნიტროლოლი



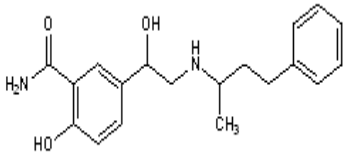
ბუპრანოლოლი

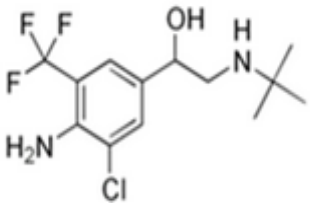


ესმოლოლი

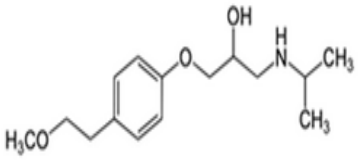


კარაზოლოლი



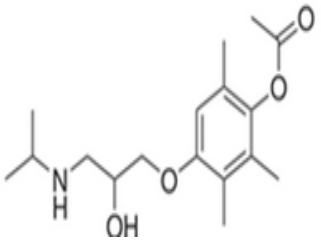


ლაბეტალოლი

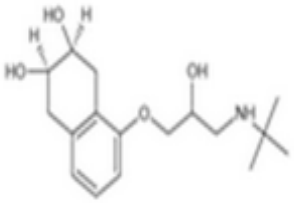


მაბუტეროლი

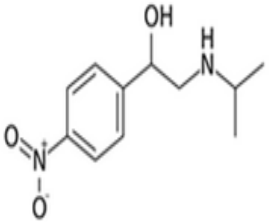
მეტოპროლოლი



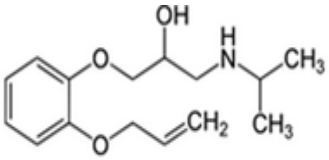
მეტიპრანოლოლი



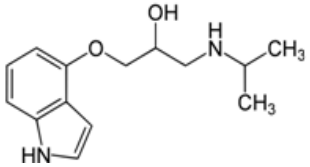
ნადოლოლი



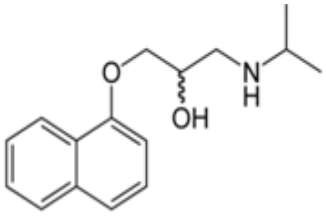
ნიფენალოლი



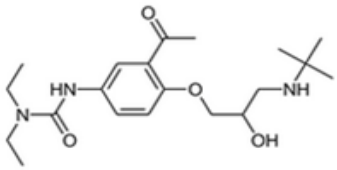
ოქსპრენალოლი

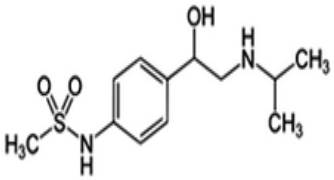


პინდოლოლი

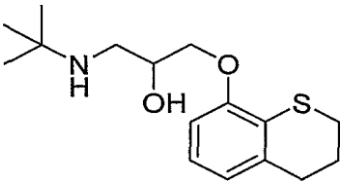


პროპრანოლოლი





ცელიპროლოლი სოტალოლი



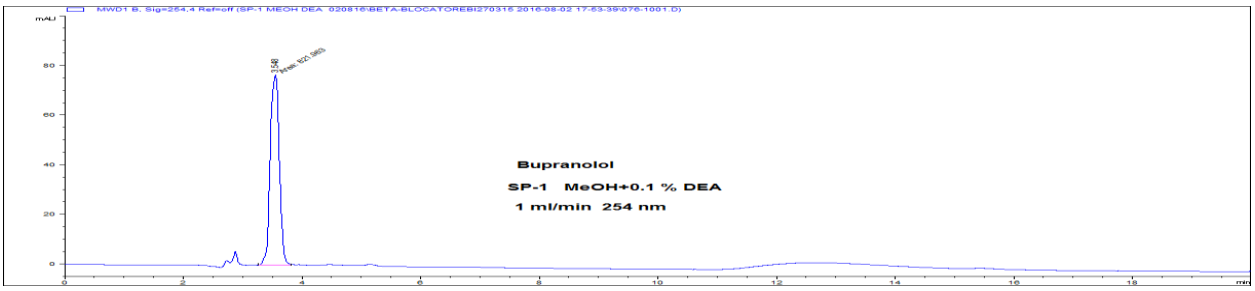
ტერტატოლოლი

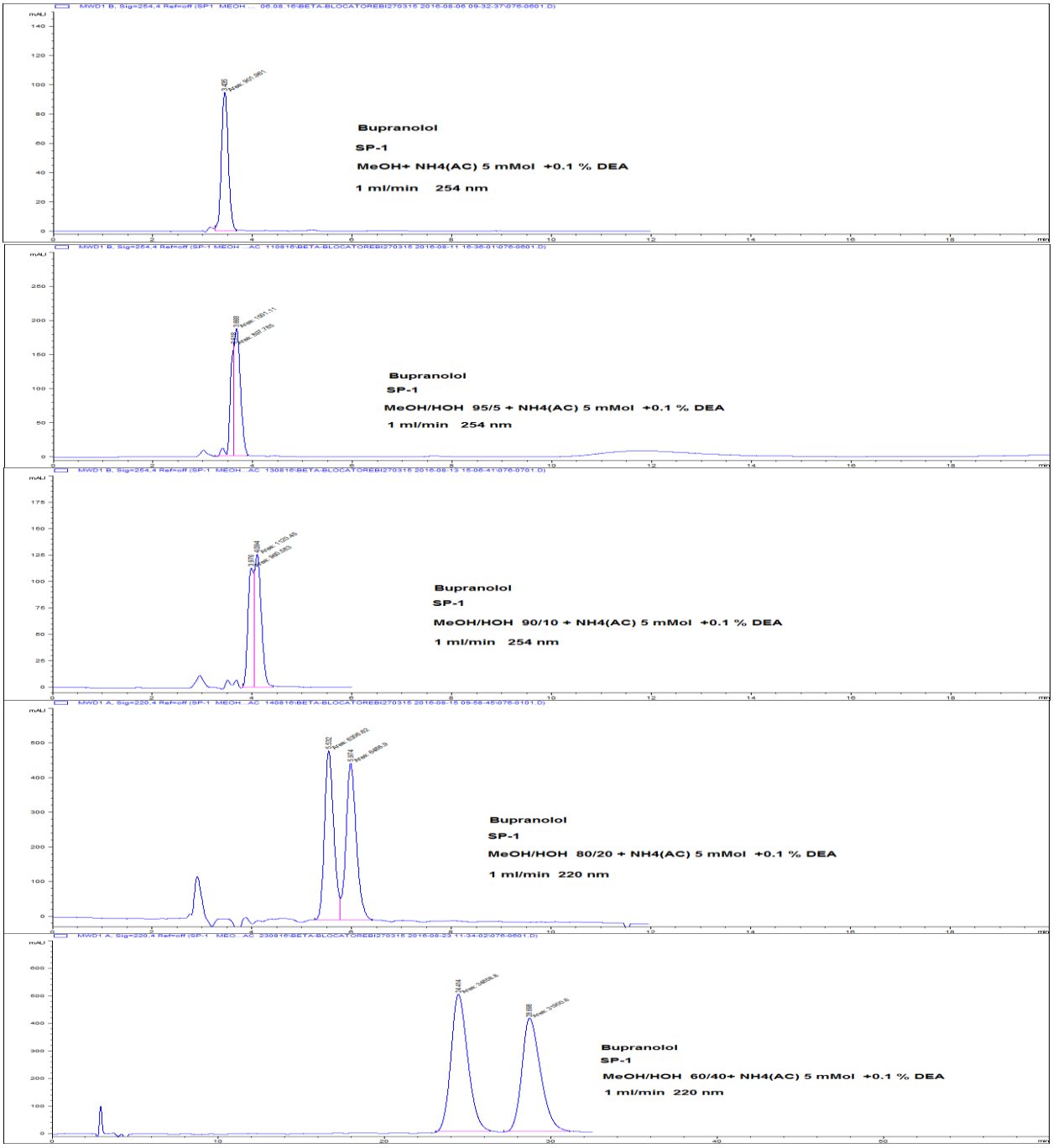
სურ.1

5.შედეგები და განსჯა

თავდაპირველად ექსპერიმენტს ვატარებდით სუფთა მეთანოლიან მოძრავ ფაზაში. შემდეგ კი მოძრავ ფაზაში თანდათან ვზრდიდით წყლის მოცულობას. მოძრავ ფაზას ერთდროულად ვამატებდით დიეთილამინს და ექვივალენტური რაოდენობით ამონიუმის აცეტატს.

1. **მეთანოლი+ 0,1% დეა + NH_4 (AC) 5 mMol**
2. **მეთანოლი/წყალი (95/ 5 → 90/10 → 80/20 → 70/30 → 60/40) + 0,1% დეა + 5 მმოლი ამონიუმის აცეტა**

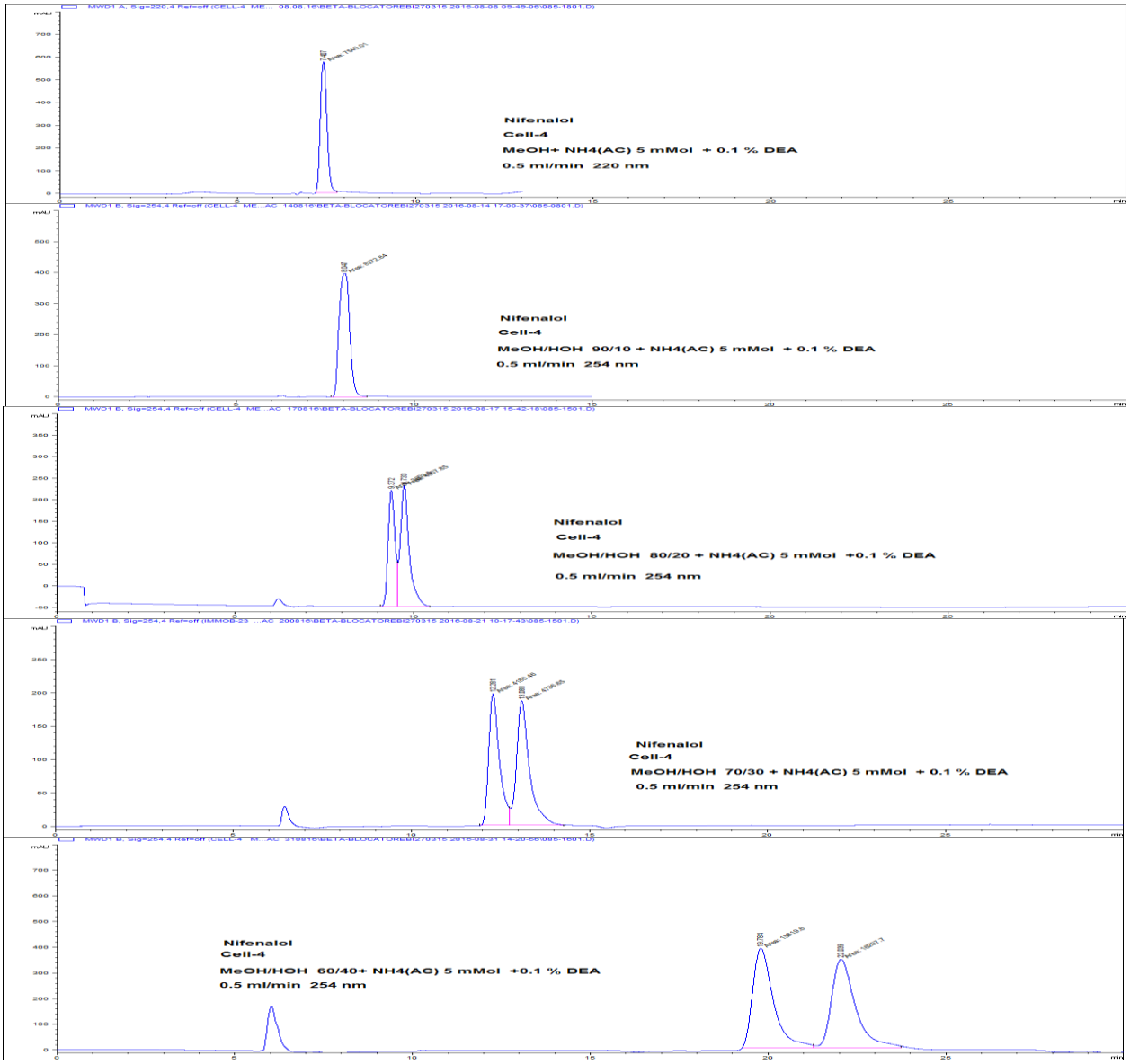




ნახ.1

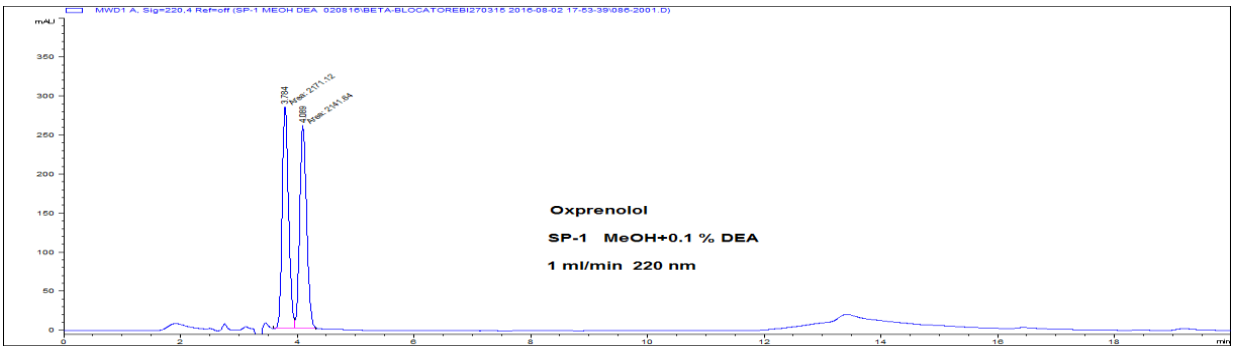
სპ-1 (ცელულოზა-1) სვეტზე ბუპრანოლოლი სუფთა მეთანოლში,როდესაც ფაზას დამატებული აქვს ჯერ მხოლოდ დიეთილამინი შემდეგ კი მასთან ერთად ამონიუმის აცეტატი, არ იყოფა. ხოლო ფაზაში წყლის შემცველობის ეტაპობრივი ზრდით ნივთიერება იწყებს ენანტიომერულ დაყოფას, ფუძისეული დაყოფა მიიღწევა მეთანოლი/წყალი 60/40 თანაფარდობაზე

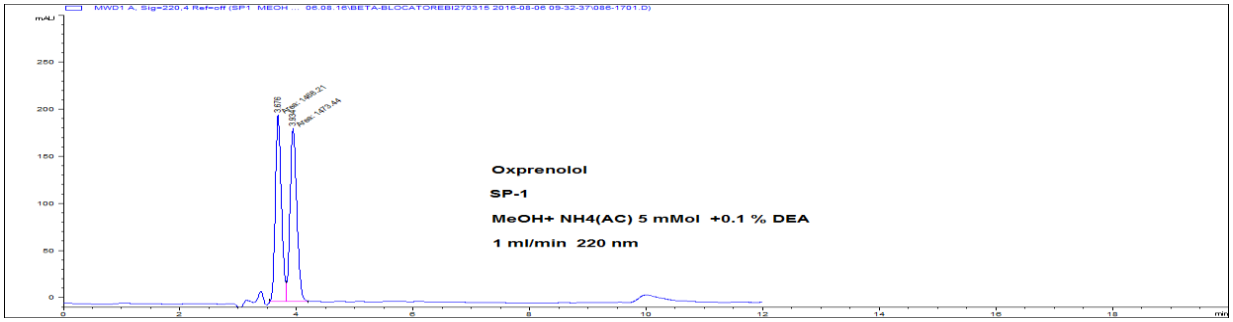
იგივე ეფექტი გვაქვს სხვა სვეტებზეც:



ნახ.2

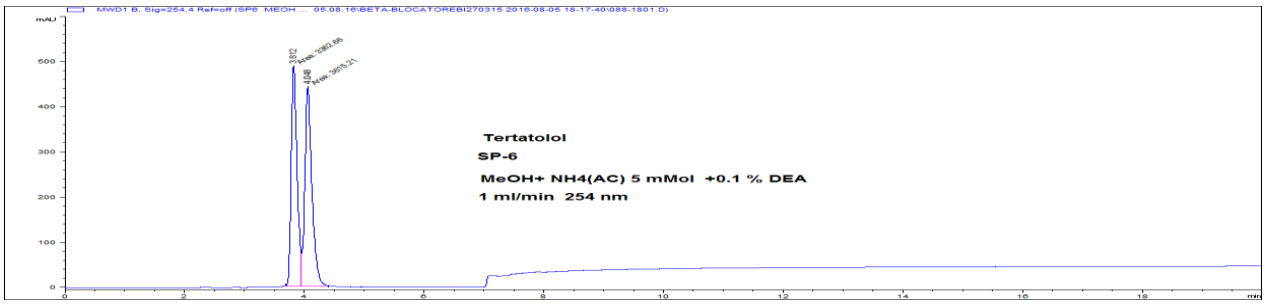
მეორე ეტაპზე შევადარეთ **MeOH +0.1% DEA** -სა და **MeOH+0.1% DEA + NH4(AC) 5 mMol** მოძრავი ფაზები.





ნახ .3

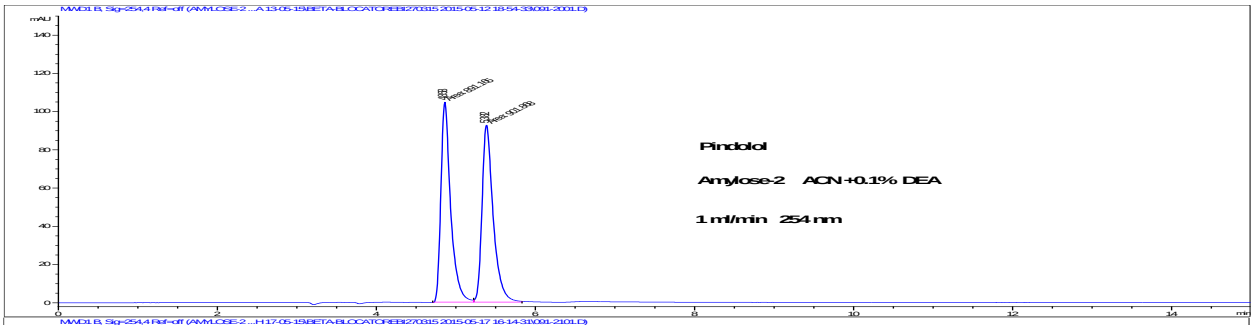
ნოლოლი SP-1 (ცელულოზა-1) სვეტზე **MeOH +0.1% DEA** -სა და **MeOH+0.1% DEA + NH4(AC) 5 mMol** მოძრავ ფაზებში.

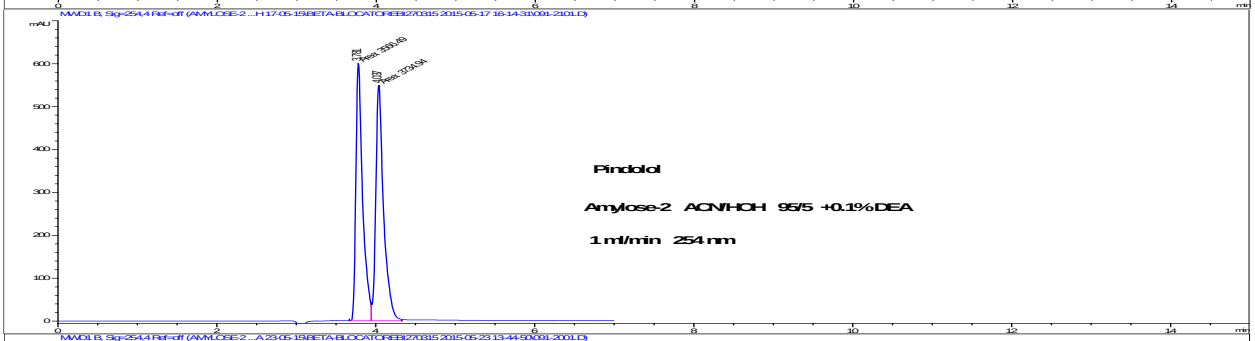


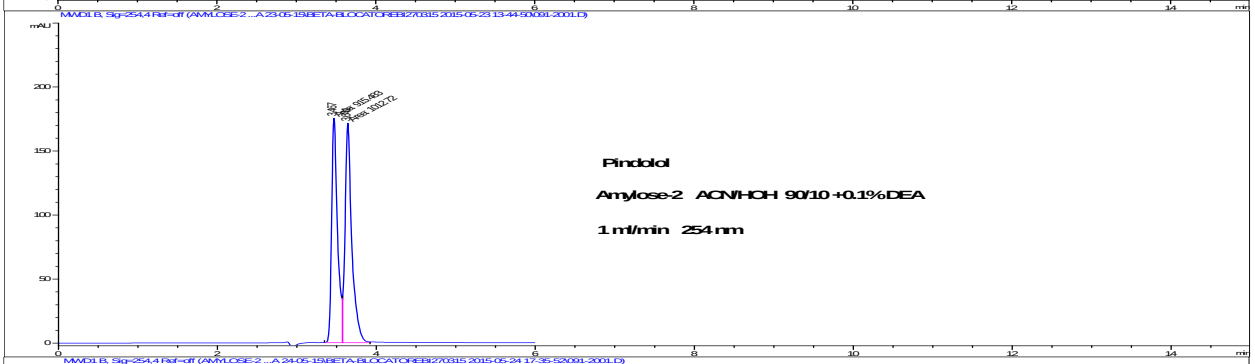
ნახ.4 ტერტატოლოლი SP-6 სვეტზე **MeOH +0.1% DEA** -სა და **MeOH+0.1% DEA + NH4(AC) 5 mMol** მოძრავ ფაზებში.

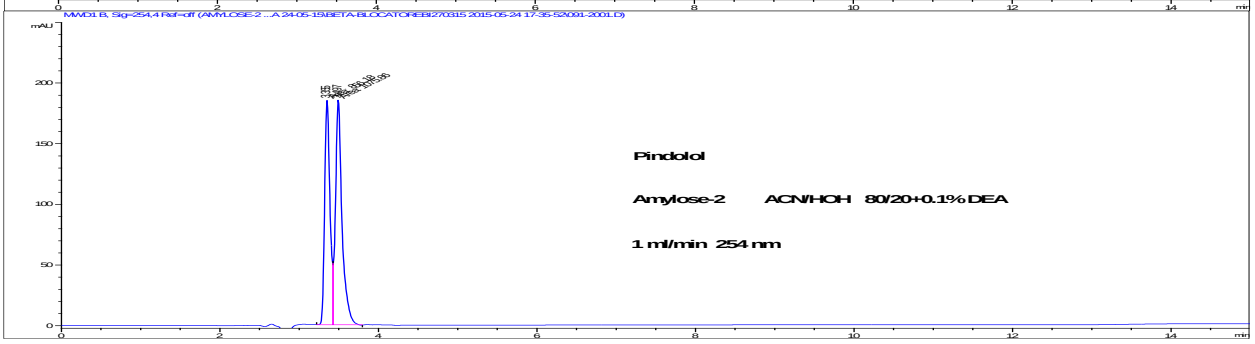
ნახ.3 და ნახ.4 -დან ჩანს, რომ მეთანოლიან ფაზაში ამონიუმის აცეტატის დამატება ამცირებს შეკავების დროებს,ხოლო დაყოფის თვალსაზრისით იგი მნიშვნელოვან გავლენას არ ახდენს,, მაშინ როდესაც აცეტონიტრილიანი მოძრავის შემთხვევაში ამონიუმის აცეტატის დამატება იწვევს დაყოფის სელექტივობის მკვეთრად გაზრდას.

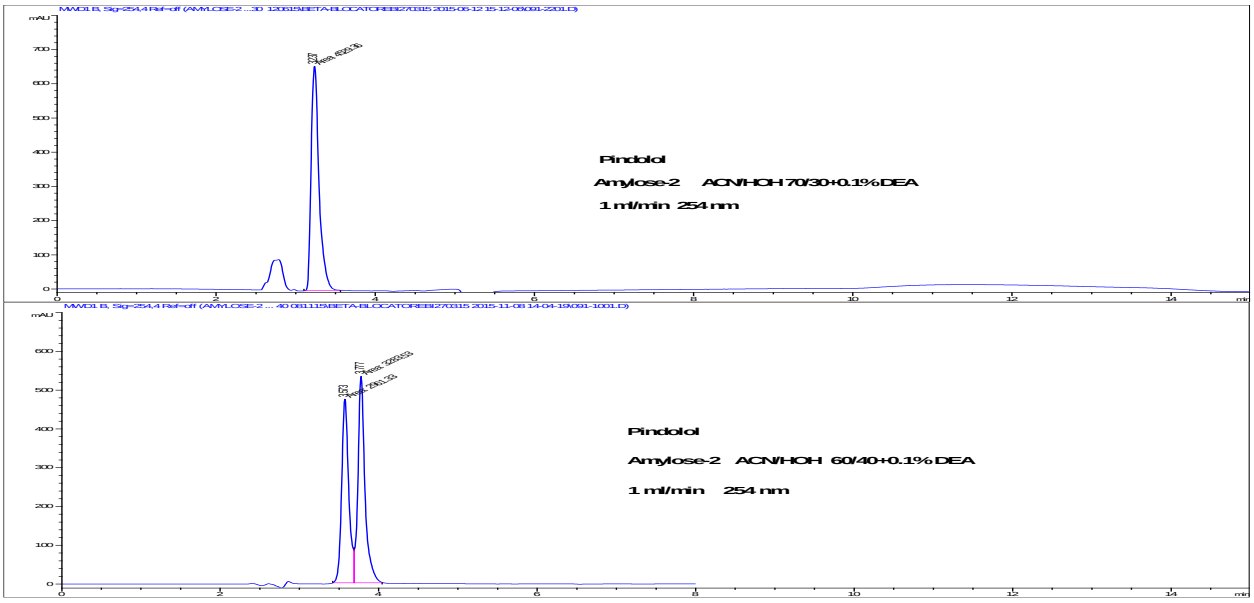
შემდეგ ეტაპზე ვაკვირდებოდით, თუ როგორ გავლენას ახდენდა წყლის მოცულობის გაზრდა აცეტონიტრილიან მოძრავ ფაზაში.


Pindolol
Amylose-2 ACN +0.1% DEA
1 ml/min 254 nm


Pindolol
Amylose-2 ACN/HOH 95/5 +0.1% DEA
1 ml/min 254 nm


Pindolol
Amylose-2 ACN/HOH 90/10 +0.1% DEA
1 ml/min 254 nm


Pindolol
Amylose-2 ACN/HOH 80/20+0.1% DEA
1 ml/min 254 nm



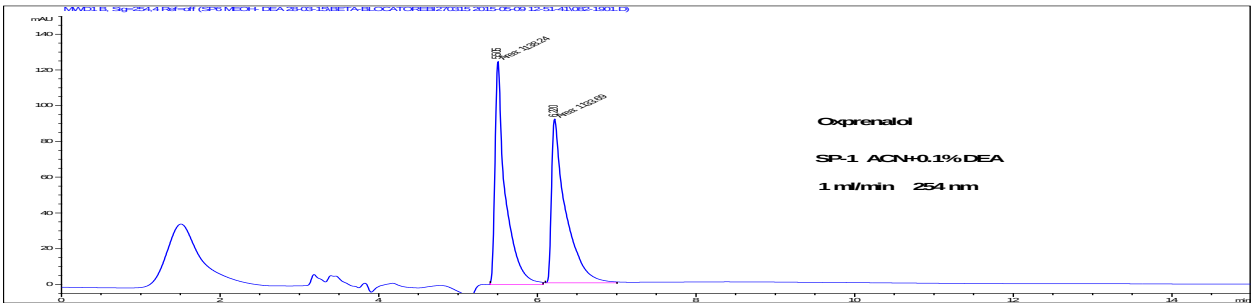
ნახ.5 პინდოლოლის ენანტიომერების დაყოფა მოძრავ ფაზებად სუფთა აცეტონიტრილსა და აცეტონიტრილი/წყალის სხვადასხვა თანაფარდობების გამოყენების შემთზვევაში.

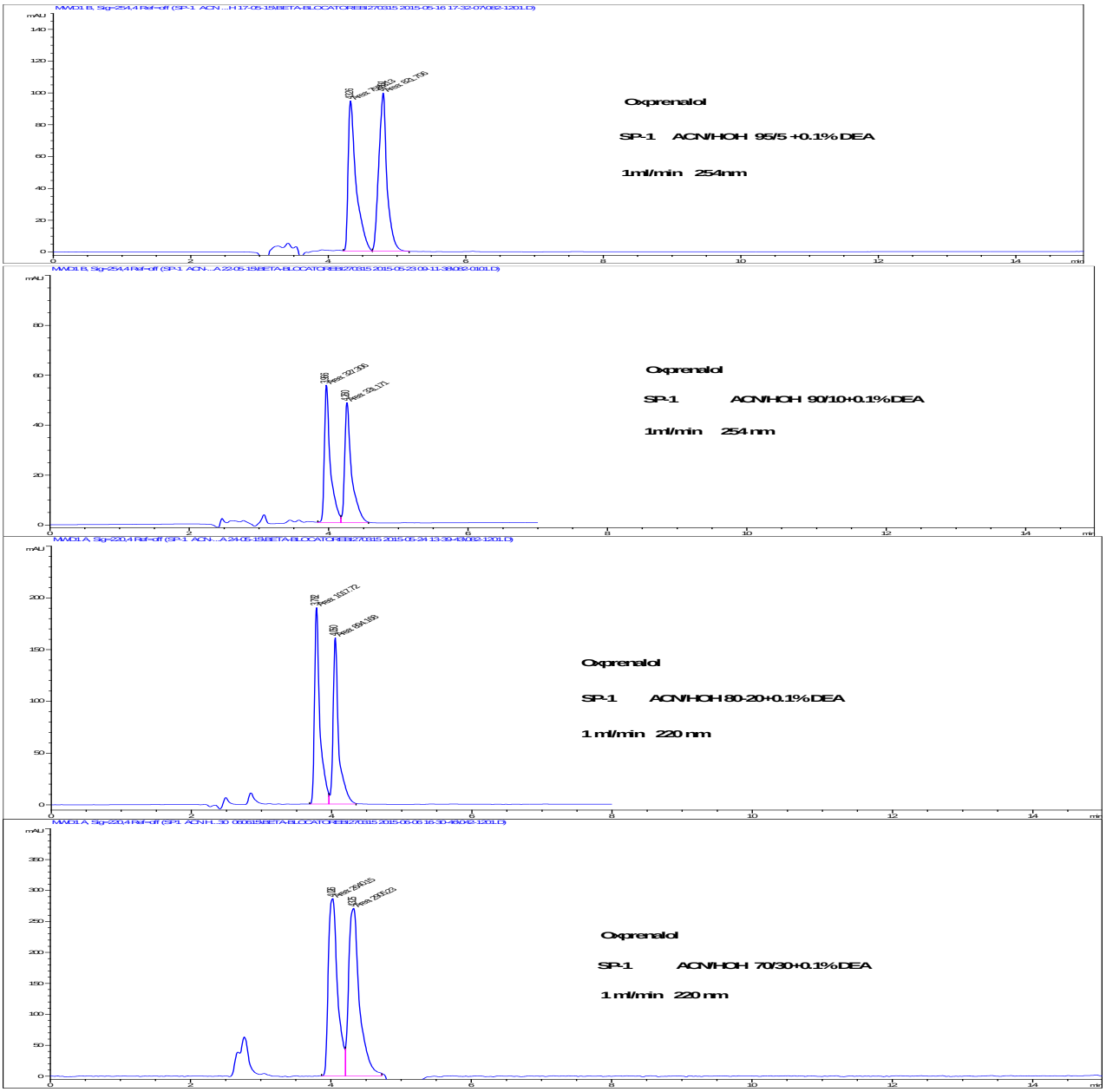
მოძრავ ფაზად აცეტონიტრილი/წყლის გამოყენებისას წყლის მოცულობის 30%-მდე თანდათანობით გაზრდით მცირდება შეკავების დრო.წყლის შემცველობის შემდგომი გაზრდით შეკავების დრო კი გაზრდას იწყებს.

ეს ფაქტი ეწინააღმდეგება ლიტერატურიდან ცნობილ ფაქტს, კერძოდ, რაც უფრო მეტია წყლის შემცველობა ელუენტში მით უფრო ხანგრძლივია შეკავების დრო.

ზემოთ აღნიშნული მიუთითებს, რომ ქირალური დაყოფები ამ სისტემაში ხდება ჰიდროფილური მექანიზმით და არ ემორჩილება შებრუნებულფაზიანი ქრომატოგრაფიის მექანიზმს.

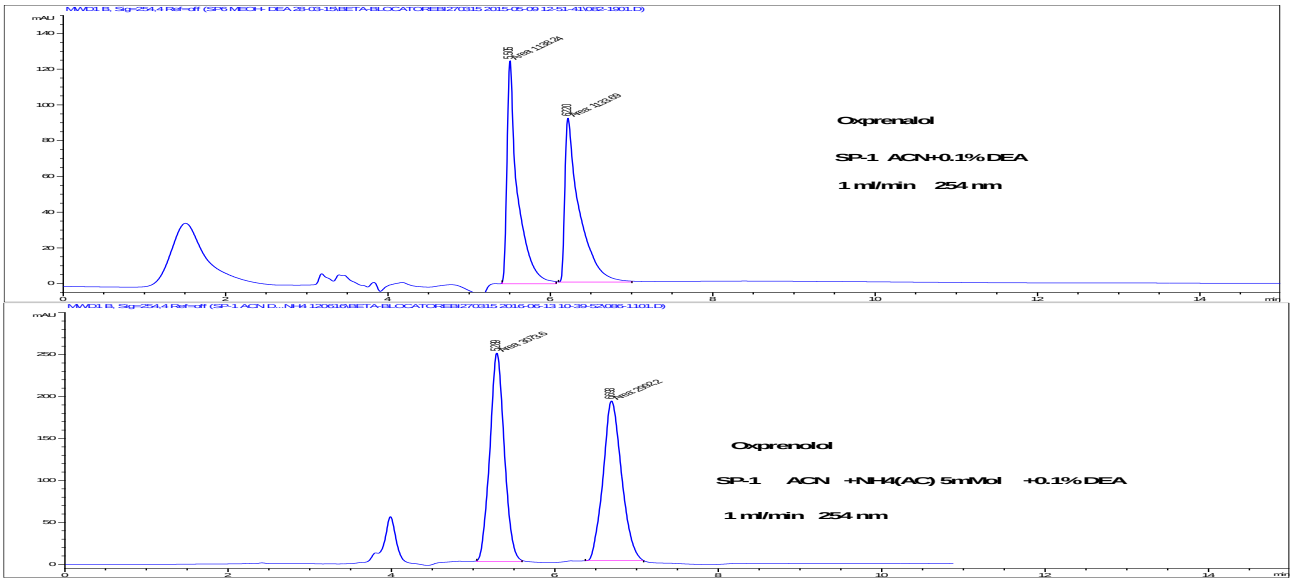
იგივე ეფექტი იკვეთება სხვა დანარჩენი რაცემატების შემთხვევებშიც.



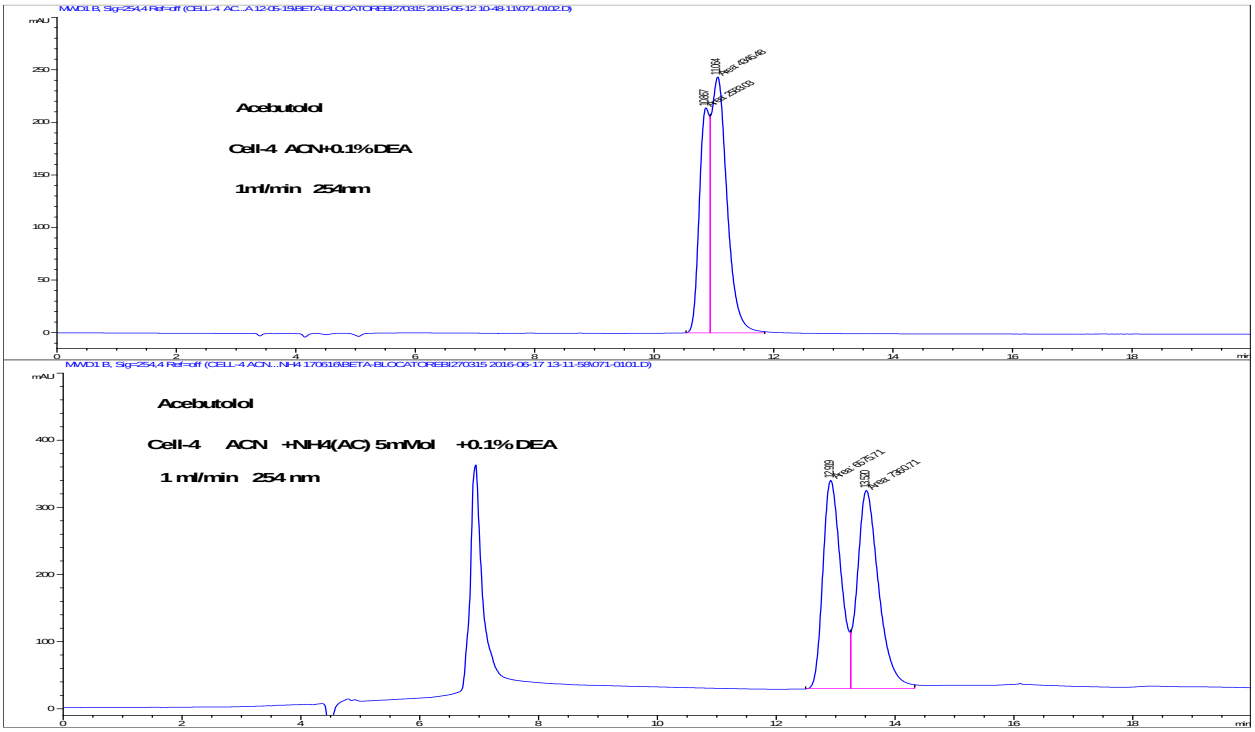


ნახ.6 ოქსპრენოლოლს ენანტიომერების დაყოფა მოძრავ ფაზებად სუფთა აცეტონიტრილსა და აცეტონიტრილი/წყალის სხვადასხვა თანაფარდობების გამოყენების პირობებში.

ექსპერიმენტის შემდეგ ეტაპს წარმოადგენდა შეგვესწავლა აცეტონიტრილიან მოძრავ ფაზაზე ამონიუმის აცეტატის დანამატის გავლენა:



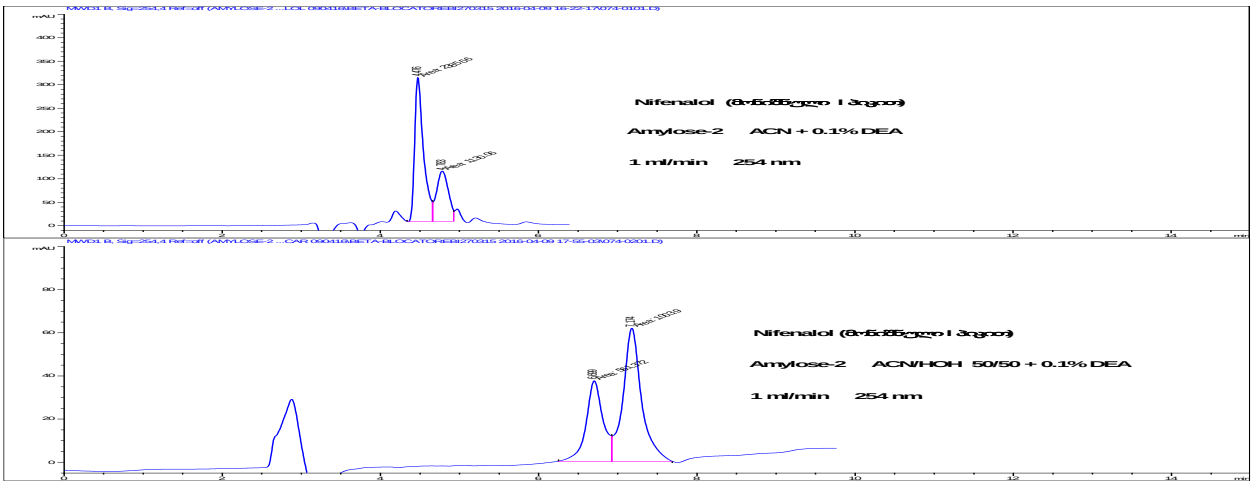
ნახ.7 ოქსპრენოლოლი ACN+0.1% DEA -სა და ACN+0.1% DEA + NH4(AC) 5 mMol -ში.



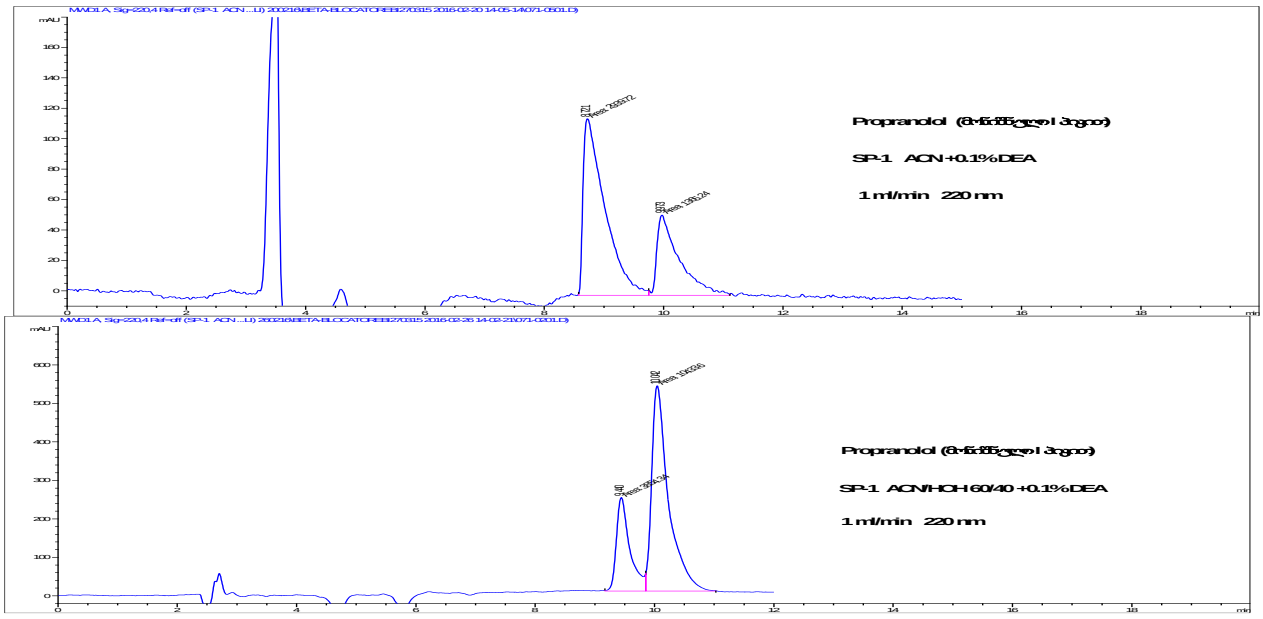
ნახ.8 აცებუტოლოლის ენანტიომერების დაყოფა მოძრავ ფაზებადACN+0.1% DEA -სა და ACN+0.1% DEA + NH4(AC) 5 mMol -ში გამოყენების პირობებში.

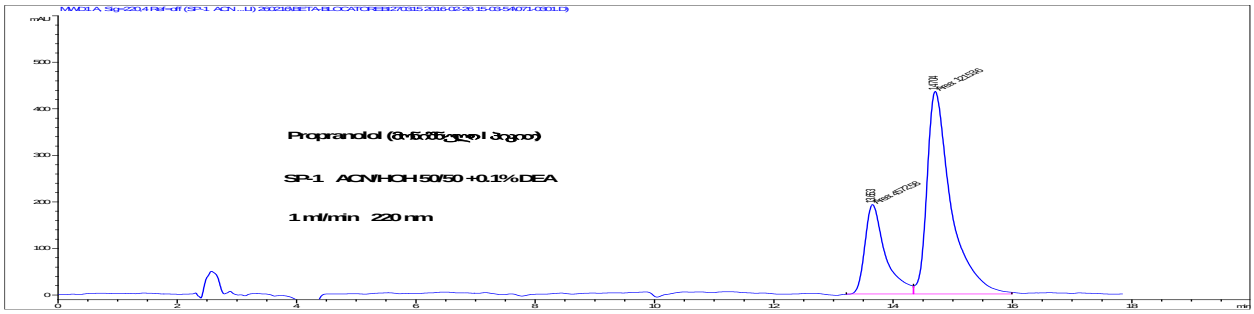
აცეტონიტრილიან მოძრავ ფაზაში ამონიუმის აცეტატის დამატებამგამოიწვია შეკავების დროებისა და სელექტივობის გაზრდა.

ექსპერიმენტის ბოლო ეტაპზე შევისწავლეთ საკვლევი ნივთიერებების ენანტიომერების ელუირების რიგზე მოძრავ ფაზაში წყლის შემცველობის გავლენა.

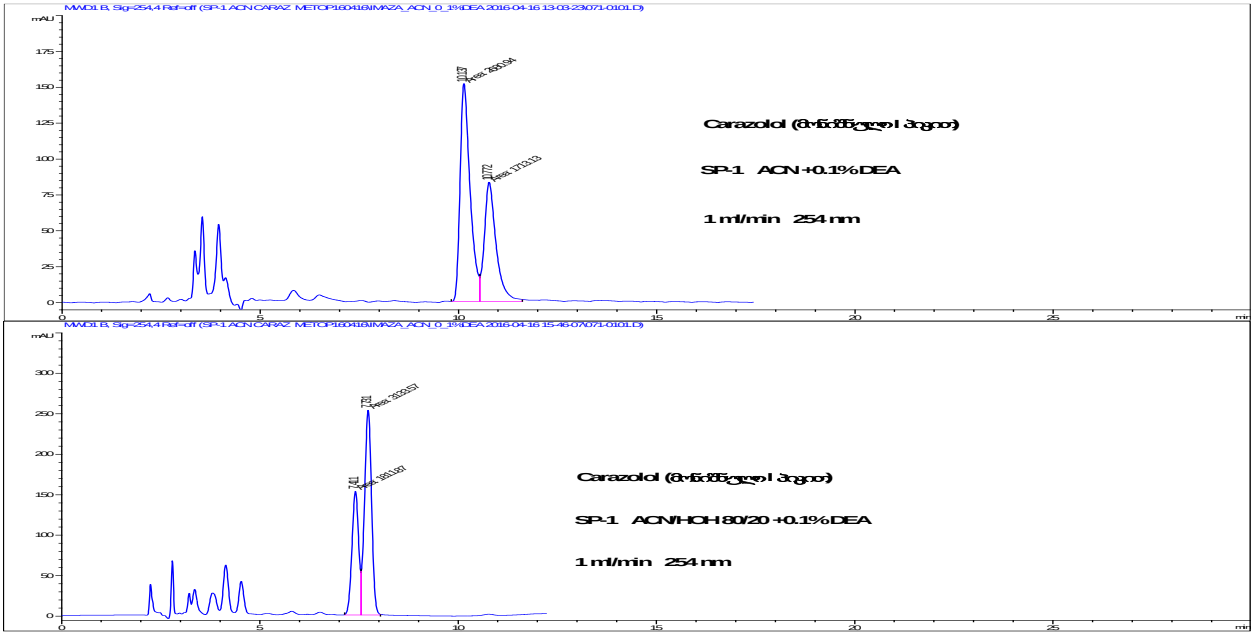


ნახ.10 SP-1 სვეტზე ნიფენალოლის მონიშნული ნიმუში





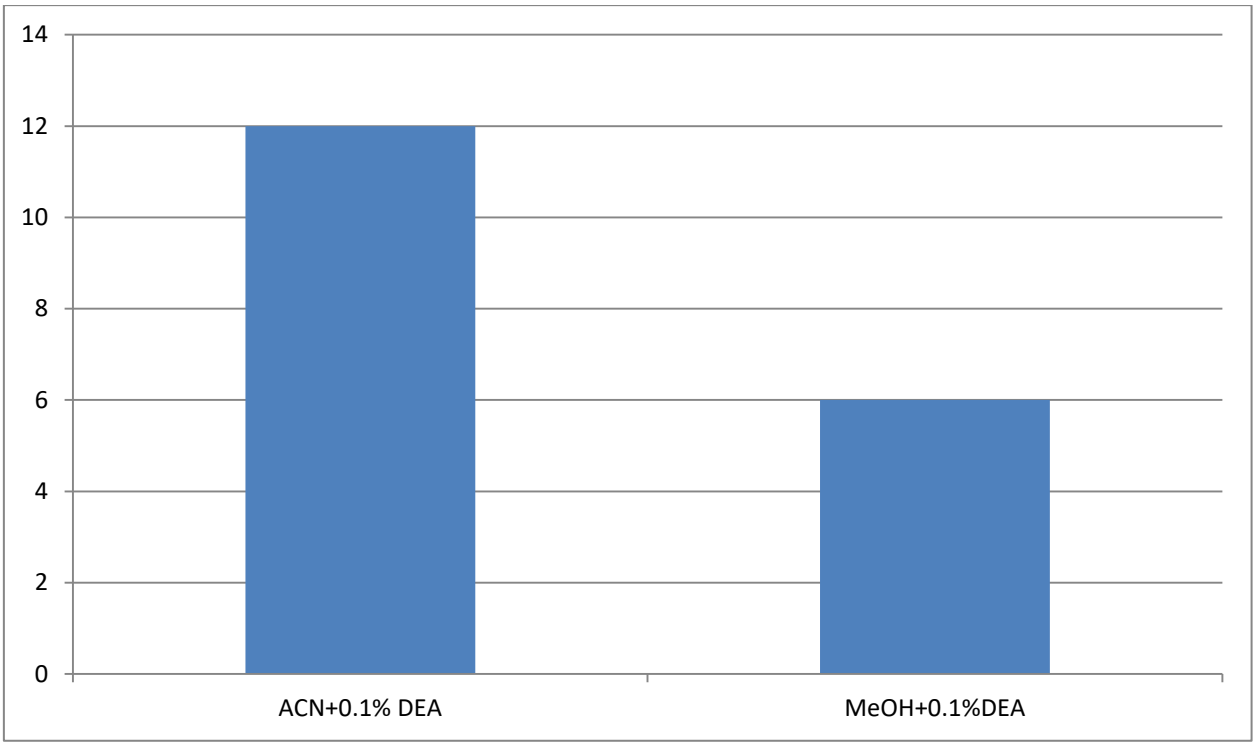
ნახ.10 SP-1 სვეტზე პროპრანოლოლის მონიშნული ნიმუში



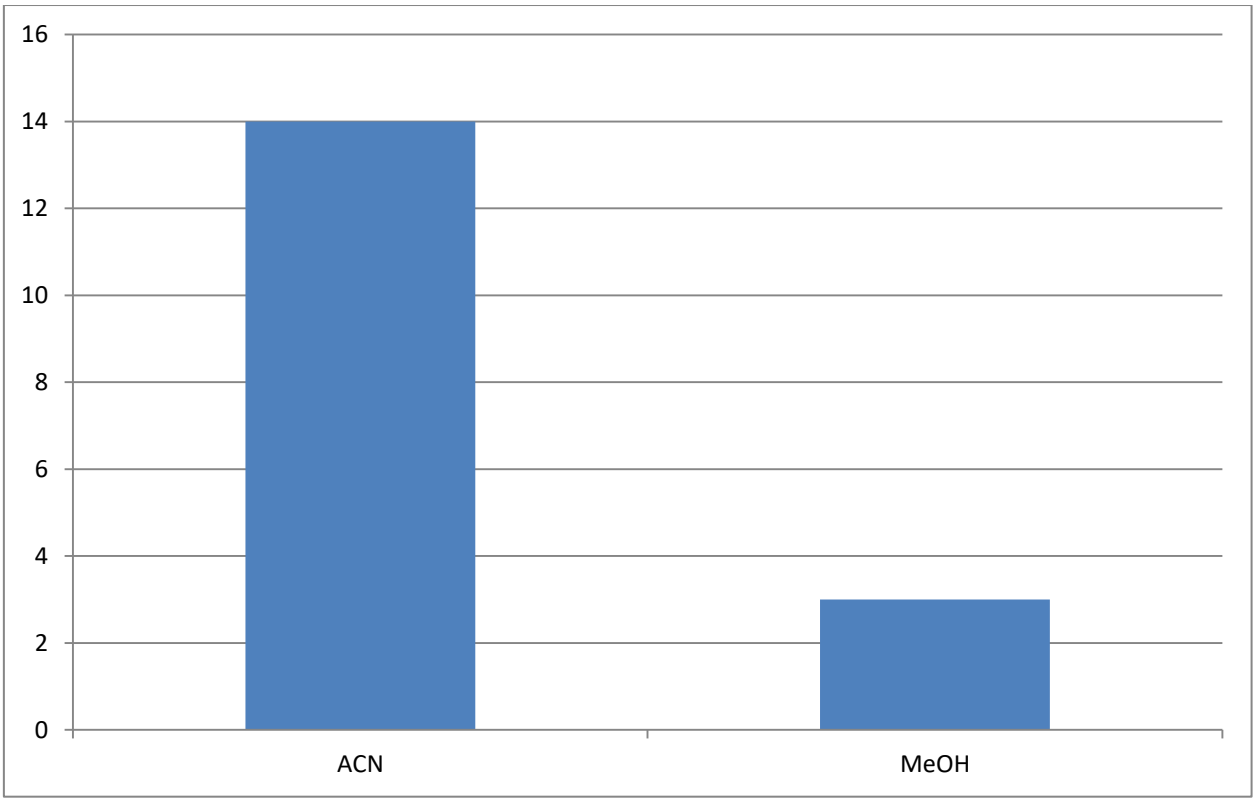
ნახ.11 SP-1 სვეტზე კარაზოლოლის მონიშნული ნიმუში

ჩვენს მიერ ჩატარებულ ექსპერიმენტულ სამუშაოში მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა,რომ რიგი ნივთიერებებისათვის აცეტონიტრილიან მოძრავ ფაზაში წყლის შემცველობის გაზრდამ გამოიწვია ელუირების რიგის ცვლილება.

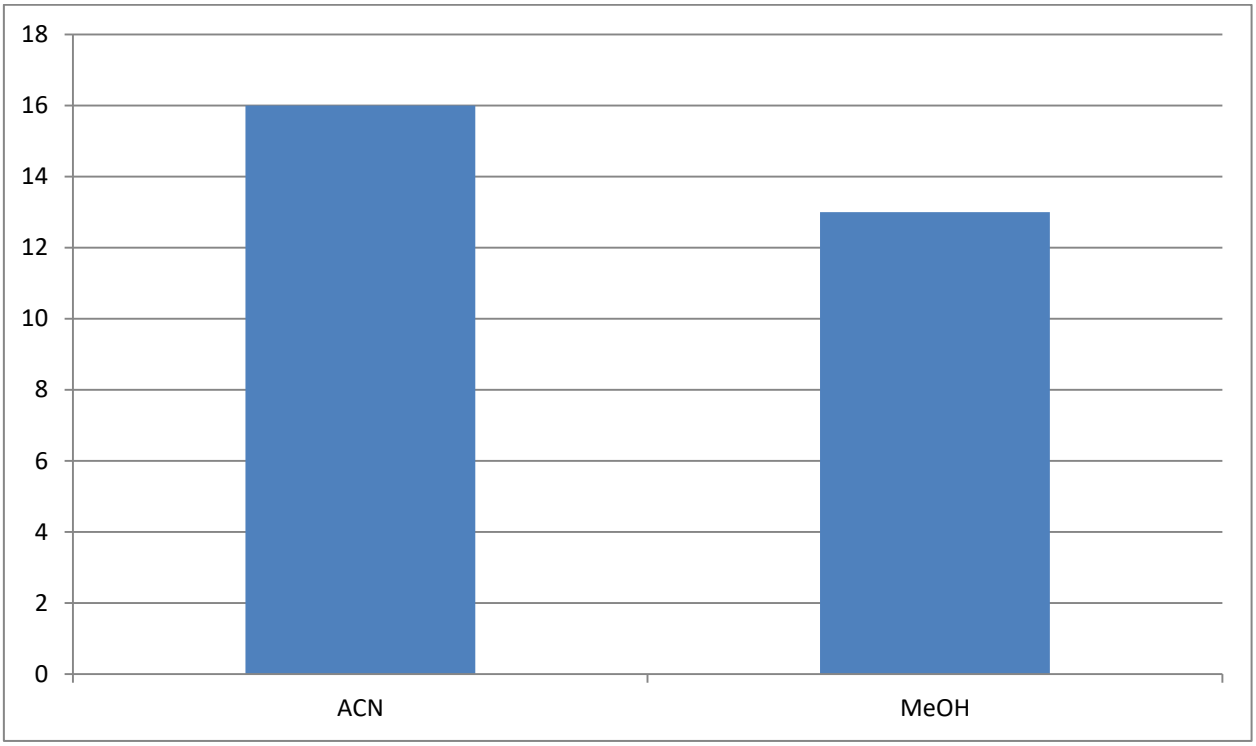
ექსპერიმენტული ნაწილის დასრულების შემდეგ, მიღებული შედეგების საფუძველზე მოვახდინეთ სტაციონარული ფაზებისა და მოძრავი ფაზების ოპტიმიზაცია. შეჯამებული შედეგები წარმოდგენილია დიაგრამების სახით.



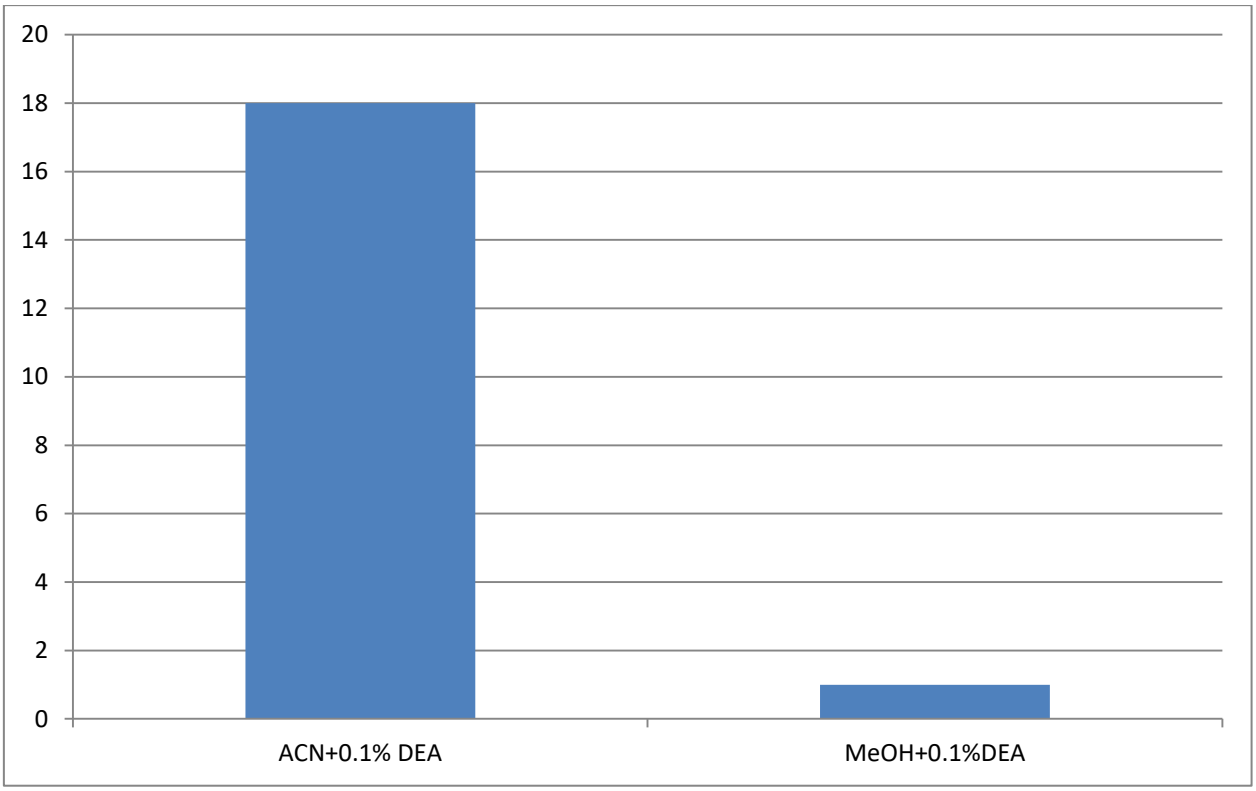
ნახ.12 SP-1 სვეტი, მოძრავი ფაზები: ACN+0.1% DEA და MeOH+0.1% DEA (შესწავლილია 20 ნივთიერება.)



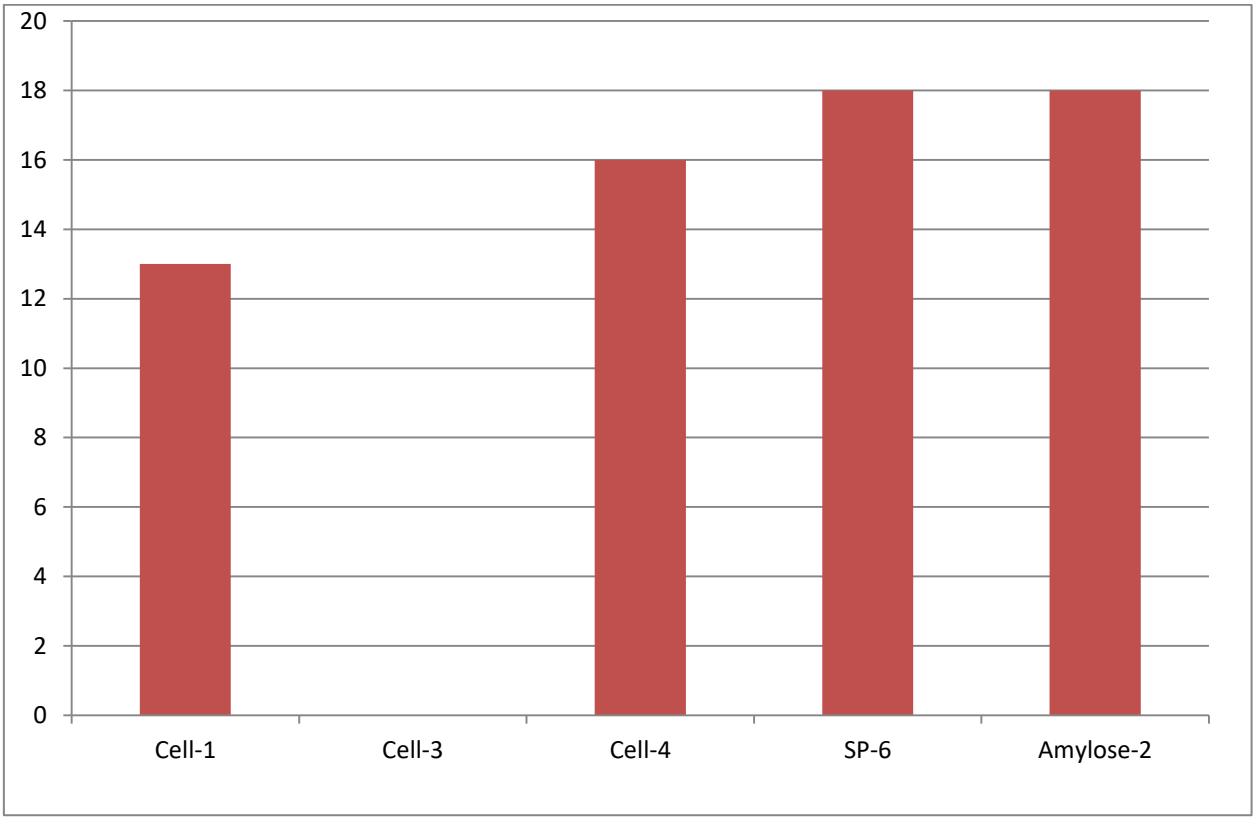
ნახ.13 Cell-4 სვეტი, მოძრავი ფაზები: ACN+0.1% DEA და MeOH+0.1% DEA (შესწავლილია 20 ნივთიერება.)



ნახ. 14 SP-6 სვეტი , მოძრავი ფაზები: ACN+0.1% DEA და MeOH+0.1% DEA (შესწავლილია 20 ნივთიერება.)



ნახ.15 Amylose-2 სვეტი , მოძრავი ფაზები: ACN+0.1% DEA და MeOH+0.1% DEA (შესწავლილია 20 ნივთიერება.)



ნახ.16 სტაციონარული ფაზების შედარება ACN+0.1 % DEA მოძრავ ფაზაში .

5. დასკვნები:

1. მეთანოლის შემცველი მოძრავი ფაზების გამოყენებისას მოძრავ ფაზაში წყლის შემცველობის გაზრდამ განაპირობა დაყოფის გაუმჯობესება, აღსანიშნავია, რომ მეთანოლისა და წყლის გარკვეულ თანაფარდობაზე შესაძლებელი გახდა იმ რაცემატების ენანტიომერების ფუძისეული დაყოფა, რომლებიც მოძრავ ფაზად სუფთა მეთანოლის გამოყენებისას არ იყოფოდა.
2. მეთანოლის შემცველი მოძრავი ფაზების გამოყენებისას მოძრავ ფაზაში ამონიუმის აცეტატის დამატება ამცირებს შეკავების დროებს, დაყოფის თვალსაზრისით იგი მნიშვნელოვან გავლენას არ ახდენს,ხოლო აცეტონიტრილიანი მოძრავი ფაზების შემთხვევაში ამონიუმის აცეტატის დამატება იწვევს ენანტიომერების დაყოფის სელექტივობის მკვეთრად გაზრდას.
3. აცეტონიტრილიანი მოძრავი ფაზები გამოყენებისას წყლის მოცულობის 30%-მდე თანდათანობით გაზრდით მცირდება შეკავების დრო. ეს მიუთითებს, რომ ქირალური დაყოფები ამ სისტემაში ხდება ჰიდროფილური მექანიზმით და არ ემორჩილება შებრუნებულფაზიანი ქრომატოგრაფიის მექანიზმს.
4. აცეტონიტრილიან მოძრავ ფაზაში ამონიუმის აცეტატის დამატებამ გამოიწვია შეკავების დროებისა და სელექტივობის გაზრდა.
5. აცეტონიტრილზე წყლის დამატებამ და შემდგომ წყლის მოცულობის გაზრდამ რიგი ნივთიერებებისთვის გამოიწვია ელუირების რიგის ცვლილება.

6.გამოყენებული ლიტერატურა:

1. ქ. ლომსაძე, ენანტიომერული ნარევების დაყოფის ფიზიკურ-ქიმიური მექანიზმები კაპილარულ ელექტროფორეზში და ამ მეთოდების გამოყენება ბიოსამედიცინო და ფარმაცევტულ ანალიზში; ქიმ. მეცნ. კანდ. დისერტაცია. თბილისი, 2005.

2. A. Ceccato, P. Chiap, Ph. Hubert, J. Crommen, J. Chromatogr. B 698 (1997) 161

3. G. Blaschke, Chromatographic Resolution of Racemates. New analytical methods Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 19 (1980) 13-24.

4. D.R. Taylor, K. Maher, J. Chromatogr. Sci. 30 (1992) 67

5. ლ. ჭანკვეტაძე „სითხური ქრომატოგრაფია“-სალექციო კურსი

6. http://en.wikipedia.org/wiki/Beta_blocker