ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის
სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ანა გოგოლაშვილი

ენილკონაზოლის ენანტიომერების დაყოფა ციკლოე ქსტრინის ტიპის ქირალური სელექტორებით კაპილ არულ ელექტროფორეზში და სელექტორ-სელექტანდის კომპლექსების სტრუქტურის კვლევა ბირთვულ-მაგნიტური რეზონანსის მეთოდით.

ქიმიური ექსპერტიზა

ნაშრომი შესრულებულია ქიმიური ექსპერტიზის
მაგისტრის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

სამეცნიერო ხელმძღვანელი
საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის აკადემიკოსი, ივ.
ჯავახიშვილის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის ზუსტ და
საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტის ფიზიკური და
ანალიზური ქიმიის კათედრის გამგე ბეჟან ჭანკვეტაძე

თბილისი, საქართველო

2017

ანოტაცია

მოლეკულის ქირალობა დიდ გავლენას ახდენს მის ფიზიოლოგიურ მოქმედებაზე, ამის ბევრი მაგალითი არსებობს სხვადასხვა სფეროში, თუმცა ყველაზე მნიშვნელოვან როლს იგი ფარმაცევტულ მრეწველობაში ასრულებს. ბიოლოგიურად და ფარმაკოლოგიურად აქტიური ნაერთების უმეტესობა ქირალურია. დღესდღეობით გამოყენებული სამკურნალწამლო საშუალებების დაახლოებით 40% წარმოადგენს ქირალურ ნივთიერებებს და მათგან მხოლოდ 25% გამოიყენება სუფთა ენანტიომერის სახით [1]. ენანტიომერები ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან რეცეპტორებისადმი განსხვავებული აფინობის უნარით. ადამიანის ორგანიზმი შეიცავს დიდი რაოდენობით ჰომოქირალურ ნაერთებს, რის გამოც იგი წარმოადგენს მძლავრ ქირალურ სელექტორს, რომელიც არამარტო განსხვავებულად რეაგირებს სხვადასხვა ენანტიომერზე, არამედ ახდენს რაცემატის დაყოფას, რის შედეგადაც თითოეული მათგანი განიცდის განსხვავებულ მეტაბოლიზმს, ეს კი საბოლოოდ იწვევს ენანტიომერების განსხვავებულ ფარმაკოლოგიურ მოქმედებას. ამდენად, ერთ იზომერს შესაძლოა გააჩნდეს დადებითი თერაპიული და ფარმაკოლოგიური მოქმედება, მაშინ როდესაც მეორე იზომერი შეიძლება წარმოადგენდეს ბალასტს ან გააჩნდეს ტოქსიკური მოქმედება. ამერიკის შეერთებულინ შტატების საკვებისა და ფარმაცევტული საშუალებების რეგისტრაციის სააგენტო (FDA) მოითხოვს ახალი ქირალური სამკურნალწამლო საშუალების რეგისტრაციამდე ჩატარდეს თითოელი ენანტიომერის აქტივობის შესწავლა და რომელი ენანტიომერიც გამოავლენს დადებით თერაპიულ ეფექტს, მხოლოდ ეს ენანტიომერი, სუფთა სახით იქნას გამოყენებული როგორც სამკურნალო საშუალება.

კაპილარული ელექტროფორეზი ქირალური დაყოფების მიზნით პოპულარულ მეთოდს წარმოადგენს. მის პოპულარობას განაპირობებს მეთოდის მთელი რიგი უპირატესობები ქრომატოგრაფიულ მეთოდებთან შედარებით, კერძოდ ის, რომ მეთოდი ხასიათდება ძალიან მაღალი ეფექტურობით (ასეული ათასიდან რამდენიმე მილიონამდე თეორიული თეფშების რაოდენობა), მოქნილობა და ანალიზის ჩატარების დაბალი ღირებულება, ასევე კაპილარული ელექტროფორეზი წარმოადგენს მინიატურულ მეთოდს, რომელიც არ აბინძურებს გარემოს. კაპილარული ელექტროფორეზის ექსპერიმენტის ჩატარება 25-150 მკმ შიგა დიამეტრის მქონე კაპილარის გამოყენებით ხდება , რომელიც მხოლოდ ბუფერული ხსნარით არის შევსებული. მაღალი ძაბვის მიმართ კაპილარი მდგრადობა კი გვაძლევს საშუალება გამოვიყენოთ ძაბვა (100 to 500 ვოლტი/სმ),

შედარებით მცირე რაოდენობის სითბოს წარმოქმნის ხარჯზე, მიუხედავად ჯოულის სითბოს წარმოქმნისა, რომელიც ელექტრული ნაკადის გამტარში გადაადგილების შედეგად წარმოიქმნება, რომელსაც ჩვენს შემთხვევაში კაპილარში მოძრავი ბუფერი წარმოადგენს. ასეთი მაღალი ძაბვის გამოყენების შესაძლებლობა უზრუნველყოფს ანალიზის მცირე დროს, მეთოდის მაღალ ეფექტურობასა და მაღალ გარჩევითობას. დაყოფის სხვადასხვა რეჟიმი საშუალებას იძლევა კაპილარულ ელექტროფორეზში გამოვიყენოთ დაყოფის სხვადასხვა მექანიზმები, ნიმუშის მინიმალური მოცულობა კი 1 დან 50 ნანოლიტრამდე მერყეობს, რაც საშუალებას გვაძლევს მოვახდინოთ მოცემული მეთოდის, როგორც ავტომატიზაცია, ასევე რაოდენობრივ ანალიზში გამოყენება.

მიუხედავად იმისა, რომ თავდაპირველად კაპილარული ელექტროფორეზი გამიზნული იყო ბიოლოგიური მაკრომოლეკულების დასაყოფად დღეს იგი ფართოდ გამოიყენება სხვადასხვა სამეცნიერო თუ ინდუსტრიულ სფეროებში. კაპილარული ელექტროფორეზის გამოყენება განსაკუთრებით ხელსაყრელია ისეთი ნივთიერებების კვლევისათვის როგორებსაც წარმოადგენენ ამინომჟავები, ქირალური სამკურნალწამლო საშუალებები, ვიტამინები, პესტიციდები, არაორგანული იონები, ორგანული მჟავები, საღებავები, ზედაპირულად აქტიური ნივთიერებები, პეპტიდები და პროტეინები, ასევე ნახშირწყალბადები, ოლიგონუკლეიდები და რაც განსაკუთრებით მნიშვნელოვანი და აქტუალურია დღესდეობით დნმ-ის ფრაგმენტების ანალიზითან ერთად შესაძლებელია უჯრედოვანი ქსოვილებისა და ვირუსული ნაწილაკების კვლევა.

კაპილარულ ელექტროფორეზის ქირალური გამოცნობის მექანიზმს წარმოადგენს სელექტორ-სელექტანდის შიგამოლეკულური, არაკოვალენტური ურთიერთქმედება, რომლის კვლევისათვის სხვადასხვა თეორიული თუ ექსპერიმენტული საშუალებები გამოიყენება. საყურადღებოა ის ფაქტი, რომ ვერცერთი ზემოთ აღნიშნული მეთოდი ვერ უზრუნველყოფს გამოცნობის მექანიზმში მონაწილე ძალების სრულ და სიღრმისეულ ანალიზს, რაც საშუალებას მოგვცემდა შეგვექმნა უნივერსალური ქირალური სელექტორი. ქირალური კვლევებისათვის დაყოფისა და სპექტრალური მეთოდების ტანდემის გამოყენება იდეალური არჩევანია, მაგალითად შეგვიძლია მოვიყვანოთ კაპილარული ელექტროფორეზი, რომლის გამოყენებითაც არის შესრულებული ჩვენი ექსპერიმენტული სამუშაო, რომელშიც ქირალური დაყოფის ექსპერიმენტი ტარდებოდა ჰომოგენურ გამხსნელსა და მონო ფაზაში, რაც საშუალებას გვაძლევდა ამ პირობების სიმულაცია მოგვეხდინა ბირთვულ-მაგნიტური რეზონანსის ექსპერიმენტში. მოლეკულათშორისი გამოცნობის მექანიზმების დასახასიათებლად ამ ორი მეთოდის პარალელურად

გამოყენება საშუალებას გვაძლევს მივიღოთ ინფორმაცია არამარტო მოლეკულათშორისი ურთიერთქმედების და სელექტორ-სელექტანდის კომპლექსის სტრუქტურის შესახებ, არამედ შევისწავლოთ ქირალური გამოცნობის მექანიზმი მოლეკულურ დონეზე.

ბოლო 25 წლის განმავლობაში ბირთვულ-მაგნიტური ექსპერიმენტი ფართოდ გამოიყენება ქირალურ ანალიზში სტექიომეტრიის, შეუღლების მუდმივას და სელექტორ-სელექტანდის მიერ წარმოქმნილი კომპლექსის სტრუქტურის დასადგენად, რათა სიღრმისეულად მოხდეს კაპილარულ ელექტროფორეზში მიღებული ენანტიომერების დაყოფის ფაქტორების და ქირალური გამოცნობის მექანიზმების კვლევა, თუმცა ამ მხრივ ჯერ კიდევ მნიშვნელოვანი სამუშაოა ჩასატარებელი, რათა საშუალება გვქონდეს განვსაზღვროთ ქირალურ გამოცნობაზე მოქმედი ფაქტორები და ვიწინასწარმეტყველოთ ქირალური ანალიზის შედეგები ქირალური სელექტორის, სელექტანდის ბუნებისა და სტრუქტურის გათვალისწინებით და ანალიზის პირობებზე დაყრდნობით.

მაღალეფექტური სითხურ ქრომატოგრაფიაში ენანტიომერების ელუირების რიგის ძირითადად განისაზღვრება ენანტიომერების აფინობით ქირალური სელექტორის მიმართ, მაშინ როცა კაპილარულ ელექტროფორეზში ენანტიომერების დაყოფა დამოკიდებულია არამარტო ენანტიომერების აფინობაზე ქირალურ სელექტორის მიმართ, არამედ წარმოქმნილი კომპლექსების ელექტროფორეტულ ძვრადობაზეც. რაც შეეხება მიგრაციის რიგის ცვლილებას, იგი შეიძლება გამოწვეული იყოს სელექტორ-სელექტანდის მიერ წარმოქმნილი კომპლექსის განსხვავებული სტრუქტურით. ამ შემთხვევაში მცირე განსხვავებაც კი შეიძლება გახდეს მიგრაციის რიგის ცვლილების გამომწვევი მიზეზი. ამ მიმართულებით მნიშვნელოვანია ქირალური გამოცნობის მექანიზმში მონაწილე ენანტიოსელექტიური და კომპლექსის წარმოქმნაში მონაწილე ძალების გამოთვლა და მათი გავლენის შესწავლა. კვლევის ეს მიმართულებამ შესაძლებლობას მოგვცემს უფრო ღრმად შევისწავლოთ ციკლოდექსტრინების და საანალიზო ნივთიერების ურთიერთქმედება, ხოლო მიღებული ინფორმაცია მოგვცემს საფუძველს შევძლოთ ექსპერიმენტის მიზნებიდან გამომდინარე შევარჩიოთ სპეციფიური ბუნებისა და სტრუქტურის ციკლოდექსტრინი, რომელიც საუკეთესო ქირალური სელექტორი იქნება მოცემულ შემთხვევაში, ასევე ამ ინფორმაციაზე დაყრდნობით შესაძლებელი იქნება ანალიზის ოპტიმალური პირობების შერჩევაც, ასევე შესაძლებელი იქნება წინასწარ, თეორიულად გამოვთვალოთ ანალიზის შედეგები ისეთ ფაქტორებზე დაყრდნობით, როგორებიცაა ქირალური სელექტორისა და საკვლევი ქირალური ნივთიერების სტრუქტურა, ასევე მათი ბუნება და ანალიზის პირობები.

ჩვენს სამუშაოში შესწავლილია ენილკონაზოლის ენანტიომერების დაყოფა და მიგრაციის რიგის ცვლილება კაპილარულ ელექტროფორეზში ქირალურ სელექტორებად როგორც ნატივური, ასევე მოდიფიცირებული ციკლოდექსტრინების გამოყენებით. მიგრაციის რიგის შებრუნება მოხდა ბუნებრივი ბეტა ციკლოდექსტრინის და სულფატირებულ ჰეპტაკის(2-O-მეთილ- 3,6-დი-O-სულფო)-β-CD-ს (HMDS-β-CD) შორის. ამის შემდეგ ჩვენს მიერ გამოყენებული იქნა ბირთვულ-მაგნიტური რეზონანსი, რათა შეგვესწავლა ქირალური გამოცნობის მექანიზმი და ამ გამოცნობის მექანიზმებს შორის განსხვავება თითოეული ციკლოდექსტრინისთვის, რისთვისაც გამოვიყენეთ ბირთვულ-ოვერჰაუზერის ეფექტზე დაფუძნებული ბირთვულ-მაგნიტური რეზონანსის ROESY ექსპერიმენტი. აღნიშნული მეთოდის გამოყენებით მოხდა ბეტა ციკლოდექსტრინსა და საკვლევი ენილკონაზოლის თითოეულ ენანტიომერთან წარმოქმნილი კომპლექსის სტრუქტურის დადგენა და მათ შორის განსხვავებების შესწავლა. დადგენილ იქნა, რომ ენილკონაზოლის (+) ენანტიომერთან წარმოქმნილი ჩართული კომპლექსი იყო უფრო სტაბილური, ვიდრე მის (-) ენანტიომერთან წარმოქმნილი ჩართული კომპლექსი. ბირთვულ-მაგნიტური რეზონანსის ექსპერიმენტის შედეგად მიღებული ეს შედეგები კორელაციაშია კაპილარულ ელექტროფორეზში მიღებულ მიგრაციის რიგთან. ამასთანავე მნიშვნელოვანი იყო ის ფაქტი, რომ ბეტა ციკლოდექსტრინისგან განსხვავებით HMDS-β ციკლოდექსტრინის ქირალურ სელექტორად გამოყენებისას შიგამოლეკულური ურთიერთქმედების შედეგად ჩართული კომპლექსის წარმოქმნა არ დაფიქსირდა. შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ ამ შემთხვევაში ენილკონაზოლისა და HDMS-β-ციკლოდექსტრინის მოლეკულებს შორის ხდება გარეგანი (არაჩართული) კომპლექსის წარმოქმნა.

Summary

The chirality of a molecule may considerably affect its physiological activity. Many compounds of biological and pharmacological interest are chiral. Approximately 40% of the drugs in use are known to be chiral and only about 25% are administered as pure enantiomers. Enantiomers differ from each other from the viewpoint of their absorption, distribution, protein binding and receptor affinity. The living body with its numerous homochiral compounds being amazingly chiral selector, will interact with each racemic drug differently and metabolize each enantiomer by a separate pathway to generate different pharmacological activity. Thus, one isomer may produce the desired therapeutic activities, while the other may be inactive or, in worst cases, produce undesired or toxic

effects. The administration of pure, pharmacologically active enantiomers is therefore of immense importance. Thanks to a wide range of modern technologies for chiral separation, US Food and Drug Administration (FDA) recently recommends the assessments of each enantiomer activity for racemic drugs in body and promotes the development of new chiral drugs as single enantiomers.

Capillary electrophoresis is one of the youngest method for separation of enantiomers, established as very popular tool in this field. The major reasons for such a popularity of CE is its own unique mechanism for separation of enantiomers. In addition, CE is highly efficient, very flexible, cost-effective, environmentally friendly miniaturized technique. CE is performed in the capillary format, typically 25- to150 μm inner diameter (id), which are usually filled only with buffer. Use of the capillary has numerous advantages, particularly with respect to the detrimental effects of Joule heating (heat generated when a electric current flows through a conductor such as a buffer filled capillary. The high electrical resistance of the capillary enables the application of very high electrical fields (100 to 500 V/cm) with only minimal heat generation. The use of thehigh electrical fields results in short analysis times and high efficiency and resolution, often in excess of 1000000 theoretical plates. The numerous separation modes offer different separation mechanisms and selectivities, minimal sample volume requirements (1 to 50 nL), on-capillary detection, and the potential for quantitative analysis and automation. Originally considered primarily for the analysis of biological macromolecules, CE has proved useful for separations of compounds such as amino acids, chiral drugs, vitamins, pesticides, inorganic ions, organic acids, dyes, surfactants, peptides and proteins, carbohydrates, oligonucleotides and DNA restriction fragments, and even whole cells and virus particles.

Various experimental and theoretical tools can be harnessed for understanding of the nature of those intermolecular forces which are involved in noncovalent selector-selectand binding and enantioselective recognition. However, none of these methods alone is able to provide a conclusive (more or less realistic) vision on chiral recognition that would enable to predict the best chiral selector or analyte from the viewpoint of recognition power. Some separation and non-separation methods fit to, and extend each other perfectly for chiral analysis. For instance, separations of enantiomers in CE are performed in homogenous solution in a single phase. These conditions can be perfectly mimicked in NMR spectroscopic experiments. Thus, the information gained on stereoselective intermolecular interactions with these two techniques is very complementary and thus, this tandem represents very powerful tool for better understanding of enantioselective recognition mechanisms on the molecular level. Over last 25 years various NMR spectroscopic

experiments have been used for obtaining information on stoichiometry, binding constants and structure of selector-selectand complexes responsible for separation of enantiomers observed in CE experiments. However, as stated above there is still long way to go before one becomes able to identify the intermolecular forces involved in selector-selectand binding and chiral recognition and predict separation result based on the structure and nature of selector, selectand and separation medium. Particularly valuable information on chiral recognition in intermolecular interactions may be provided by gaining insight about the forces leading to a reversal of recognition.

It seems that the enantiomer elution order (EEO) in HPLC mostly indicates a reversal of the recognition pattern in selector-selectand interactions, while this is not always the case in CE. In this technique, the mobility-related phenomena may also be responsible for an enantiomer migration order (EMO) reversal. Sometimes significant structural differences can be detected between the chiral analyte-chiral selector intermolecular complexes with opposite recognition pattern. However, in other cases just minor differences are observed between the structures of complexes while the recognition pattern is opposite. Thus, despite significant efforts in this direction it is still necessary to accumulate as many examples as possible of opposite enantiomer recognition pattern, study the most likely structure of these complexes and on the next step to calculate/compute forces involved in selector-selectand binding and enantioselective recognition. This approach may enable prevailing the forces and interactions governing enantioselective recognition in intermolecular complexes of cyclodextrins with chiral guest compounds. With this knowledge, the forces and interactions might be adjusted by changing the structure/nature of CD-type chiral selector, as well as the medium for interaction. Such knowledge may also allow predicting the separation results based on the structure of the chiral analyte, chiral selector and separation conditions.

In the present study, the enantiomer migration order (EMO) of enilconazole in the presence of various cyclodextrins (CDs) was investigated by capillary electrophoresis (CE). Opposite EMO of enilconazole were observed when β-CD or the sulfated heptakis(2-O-methyl-3,6-di-O-sulfo)-β-CD (HMDS-β-CD) were used as the chiral selectors. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy was used to study the mechanism of chiral recognition between enilconazole enantiomers and those two cyclodextrins. Based on rotating frame nuclear Overhauser (ROESY) experiments, the structure of an inclusion complex between enilconazole and β-CD was derived, in which (+)-enilconazole seemed to form a tighter complex than the (-)-enantiomer. This correlates well with the migration order of enilconazole enantiomers observed in CE. No evidence of complexation

between enilconazole and HMDS-β-CD could be gathered due to lack of intermolecular NOE interactions. Most likely the interaction between enilconazole and HDMS-β-CD leads to formation of shallow external complex that is sufficient for separation of enantiomers in CE but cannot be evidenced based on ROESY experiment. Thus, in this case CE documents the presence/existence of intermolecular interactions which are at least very difficult to be evidenced/confirmed by other instrumental techniques.

შინაარსი

ანოტაცია ..... გვ. 2

შინაარსი ..... გვ. 9

1. **შესავალი** ..... გვ. 10
2. **ლიტერატურული ნაწილი**
   - 2.1 ქირალური დაყოფის აქტუალურობა ..... გვ. 12
   - 2.2 ქირალური დაყოფის მეთოდები ..... გვ. 13
   - 2.3 კაპილარული ელექტროფორეზის მეთოდი და მისი უპირატესობები დაყოფის სხვა მეთოდებთან შედარებით ..... გვ. 14
   - 2.4 ციკლოდექსტრინების გამოყენება ქირალურ დაყოფებში ..... გვ. 19
   - 2.5 ბირთვულ-მაგნიტური რეზონანსის სპექტროსკოპია ..... გვ. 21
3. **ექსპერიმენტული ნაწილი**
   - 3.1 გამოყენებული ხელსაწყოები ..... გვ. 23
   - 3.2 მასალები და რეაგენტები ..... გვ. 23
   - 3.3 კაპილარული ელექტროფორეზის ექსპერიმენტი ..... გვ. 24
   - 3.4 ენილკონაზოლის ენანტიომერების შეგროვება ..... გვ. 24
4. მიღებული შედეგები და განსჯა ..... გვ. 25
5. დასკვნები …..... გვ. 34
6. გამოყენებული ლიტერატურა ..... გვ. 35

შესავალი

დღეისათვის გამოყენებულ ფარმაცევტულ მოქმედ საფუძველთა მნიშვნელოვანი ნაწილი წარმოადგენს ქირალურ ნივთიერებებს. მათი უმეტესობის სინთეზი ხდება რაცემული ნარევის (ორი ენანტიომერის ნარევი 50:50-თანაფარდობით) სახით. სამკურნალწამლო საშუალებათა ენანტიომერები უმრავლეს შემთხვევაში განსხვავდება მათი ფარმაკოლოგიური მოქმედებით ცოცხალ ორგანიზმზე. ენანტიომერები ერთმანეთისგან განსხვავდება, როგორც აბსორბციის უნარით, ასევე განაწილების და პროტეინებთან შეკავშირების და რეცეპტორებთან უთიერთქმედების უნარით. ხშირ შემთხვევაში მათ განსხვავებული მეტაბოლიზმი ახასიათებთ. ძირითადად განსახვავებენ ენანტიომერების განსხვავებული მოქმედების სამ სახეს „ცოცხალ“ გარემოში:

1) მხოლოდ ერთი ენანტიომერს აქვს დადებითი ფარმაკლოგიური ეფექტი, მეორე ენანტიომერი ან ბალასტია, ან უარეს შემთხვევაში შეიძლება ჰქონდეს უარყოფითი გვერდითი ეფექტიც, მაგალითად ნაპროქსენის და ომეპრაზოლის შემთხვევებში მხოლოდ ერთ ენანტიომერს (S- ფორმა) აქვს სამკურნალო მოქმედება;

2) ერთი ენანტიომერის მოქმედება ბევრად აღემატება მეორე ენანტიომერისას, ეს შემთხვევა აღმოჩნდა კეტოპროფენის შემთხვევაში, S-ფორმას გააჩნდა ბევრად ძლიერი მოქმედება, ვიდრე R-ფორმა;

3) მესამე შემთხვევაში შეიძლება მხოლოდ ერთ ენანტიომერს ჰქონდეს დადებითი ეფექტი, მაგრამ ორგანიზმში ენზიმების მოქმედების შედეგად მეორე ენანტიომერი გარდაიქმნებოდეს აქტიურ ენანტიომერად, ამის მაგალითად გამოდგება იბუპროფენის შემთხვევა, რომლის (R-ფორმა)-ს არ აქვს დადებითი ფარმალოგიური მოქმედება, მაგრამ ცოცხალ ორგანიზმში მეტაბოლიზირდება RCoA-თიოეთერად, რომელიც შემდეგ ეპიმერიზდება S-CoA-თიოეთერად და საბოლოოდ გარდაიქმნება S-იბუპროფენად.

კაპილარული ელექტროფორეზის მეთოდი წარმოადგენს განსაკუთრებით საინტერესო ტექნიკას ქირალურ ანალიზში, რადგან მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის მეთოდის შედარებით დაბალი ეფექტურობით და ანალიზის მაღალი ღირებულებით ხასიათდება.კაპილარული ელექტროფორეზის მეთოდის უპირატესობას წარმოადგენს ინსტრუმენტის სიმარტივე, მინიატურულობა, მაღალეფექტურობა, უნივერსალურობა, ანალიზის მოკლე დრო, მაღალი გარჩევითობა, ნიმუშის მცირე რაოდენობა და ანალიზის დაბალი ღირებულება. კაპილარულ ელექტროფორეზში ენანტიომერების დაყოფა

მიიღწევა ქირალური სელექტორის გამოყენებით, რომელიც ცალკეულ ენანტიომერს იკავშირებს განსხვავებული სიმტკიცით. დღეისათვის ამა თუ იმ ქირალური დაყოფის ჩასატარებლად ქირალური სელექტორის შერჩევა ხდება ემპირიულად, რაც დროის დიდ დანახარჯს განაპირობებს. კაპილარული ელექტროფორეზის პოტენციალი ენანტიოსელექტიური მოლეკულათშორისი ურთიერთქმედებების კვლევის მიზნით ნაკლებად არის შესწავლილი. კაპილარული ელექტროფორეზის გამოყენების თვალსაჩინო უპირატესობა ამ თვალსაზრისით ის არის ის, რომ ეს მეთოდი საშუალებას იძლევა აღმოვაჩინოთ ისეთი ნატიფი ენანტიოსელექტიური ეფექტები მოლეკულათშორის ურთიერთქმედებებში, რომელთა დამზერა სხვა მეთოდების გამოყენებით არ ხერხდება. რადგან ეს მეთოდი არ იძლევა პირდაპირ ინფორმაციას კომპლექსების სტექიომეტრიის და სტრუქტურის შესახებ, ამიტომ კაპილარულ ელექტროფორეზთან ერთად ჩვენს მიერ გამოყენებულ იქნა ბირთვულ-მაგნიტური რეზონანსის (ბმრ) სპექტროსკოპია.

ჩვენს მიერ შესწავლილ იქნა იმიდაზოლის ერთ-ერთი ნაწარმის ენილკონაზოლის ენანტიომერების დაყოფა და ენანტიომერების მიგრაციის რიგი კაპილარული ელექტროფორეზის გამოყენებით, ხოლო ქირალური გამოცნობის მექანიზმები დახასიათებულ იქნა ბირთვულ-მაგნიტური რეზონანსის (ბმრ) სპექტროსკოპიის გამოყენებით.

იმიდაზოლი წარმოადგენს ორგანულ ნაერთს, რომლის ფორმულა არის C3N2H4. ის არის არომატული ჰეტეროციკლი, ე.წ. დიაზოლი. ბევრი ბუნებრივი ნაერთი, განსაკუთრებით ალკალიოდები შეიცავს იმიდაზოლის ბირთვს. ეს ბირთვი ასევე ძალიან მნიშვნელოვანი სამშენებლო ჯგუფია ბევრი ბიოლოგიური მოლეკულის სინტეზისთვის, როგორიც არის მაგალითად ჰისტიდინი და მისი მონათესავე ჰორმონი-ჰისტამინი. ბევრი ქირალური სამკურნალო სამკურნალო საშუალება შეიცავს იმიდაზოლის ბირთვს, როგორებიც არის ანტიმიკოტიკური საშუალებები, ნიტროიმიდაზოლის სერიის ანტიბიოტიკები და სედატიური მოქმედების პრეპარატი მიდაზოლამი.

პირველად ენილკონაზოლი დარეგისტრირებულ იქნა კომპანია Janssen Pharmaceutica -ს მიერ1983წელს, როგორც ანტიმიკოტიკური საშუალება. მისი გამოყენება მაღალი ეფექტურობის გამო სწრაფადვე დაიწყეს თესლის შესაწამლად, მოგვიანებით კი მისი გამოყენება ინტენსიურად დაიწყესფრინველთა იმკუბატორების სოკოსგან დასაცავად. დღეისათვის ის აქტიურად გამოიყენება ვეტერინარიასა და სოფლის მეურნეობაში

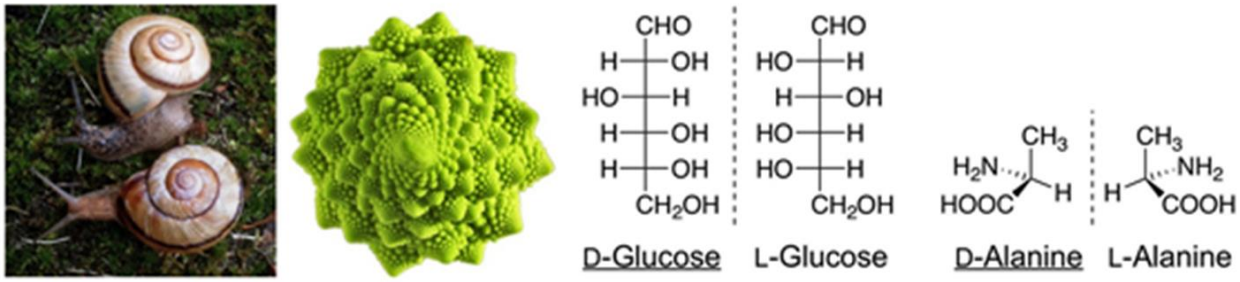
სხვადასხვა სახის სოკოვანი დაავადებების სამკურნალოდ ცხოველებსა თუ მცენარეებში, გარდა ზემოთ აღნიშნულისა ენილკონაზოლი წარმატებით გამოიყენება სხვადასხვა ტიპის სოკოვანი დაავადებების სამკურნალოდ ადამიანებში.

2. ლიტერატურული ნაწილი

2.1. ქირალური დაყოფის აქტუალურობა

“ქირალობა” ძველბერძნული სიტყვაა და ხელს ნიშნავს. “ქირალობა”აღნიშნავს, რომ ნებისმიერი ორი საგანი (მოლეკულა) ერთმანეთის მიმართ ისეთ შესაბამისობაშია, როგორც მარჯვენა და მარცხენა ხელი, ან საგანი და მისი სარკული გამოსახულება. ქირალური შეიძლება იყოს ნივთიერება, რომლის მოლეკულაში არის ოთხი 3. განსხვავებული ჩამნაცვლების მქონე ნახშირბადატომი, თუმცა არსებობს სხვა ატომებით (აზოტი,გოგირდის და ფოსფორი) ან ქირალობის სხვა ელემენტებით (ღერძი, სიბრტყე) განპირობებული ქირალობის შემთხვევებიც. ენანტიომერებს ერთნაირი ფიზიკური და ქიმიური თვისებები გააჩნიათ, თუმცა ისინი ბრტყლად პოლარიზებად სინათლეს სხვადასხვა მხარეს აბრუნებენ

აუცილებელია აღინიშნოს, რომ ცოცხალი ორგანიზმები არის ჰომოქირალური, რაც იმას ნიშნავს, რომ მოლეკულები, რომლებისგანაც შედგება ცოცხალი ორგანიზმები, ე.წ. RNA, DNA, ამინომჟავები, პროტეინები და შაქრები ყველა არის ქირალური [1]. ცოცხლ ორგანზმებში ისინი მხოლოდ ერთი ენანტიომერის სახით არსებობს, მაგ.: მარჯვნივმბრუნავი B-DNA, მარცხნივმბრუნავი Z-DNA, l-ამინომჟავები და d-შაქრები (სურ. 1). ამ უმნიშვნელოვანეს ბიოლოგიურ სელექტიურობას ეწოდება ჰომოქირალობა [2].



სურ. 1 ჰომოქირალობის მაგალითები ცოცხალ ორგანიზმებში

ცოცხალი ორგანიზმების ჰომოქირალობა განაპირობებს მათ განსხვავებულ დამოკიდებულებას ერთი და იმავე საკვებდანამატის, არომატიზატორის და სამკურნალწამლო საშუალების ორი განსხვავებული ენანტიომერის მიმართ. საუკეთესო მაგალითად გამოდგება ასპარგინის შემთხვევა: S-ასპარგინი არის მწარე გემოსი ხოლო R-ასპარგინი ტკბილია. ცოცხალი ორგანიზმის ასეთი განხსვავებული აღქმა ერთი და იმავე ნაერთის ცალკეულ ენანტიომერის მიმართ განაპირობებს, რომელი ენანტიომერი არის უფრო მისაღები ცოცხალი ორგანიზმისთვის და რომელს „ჩამოართმევს ხელს“ [3].

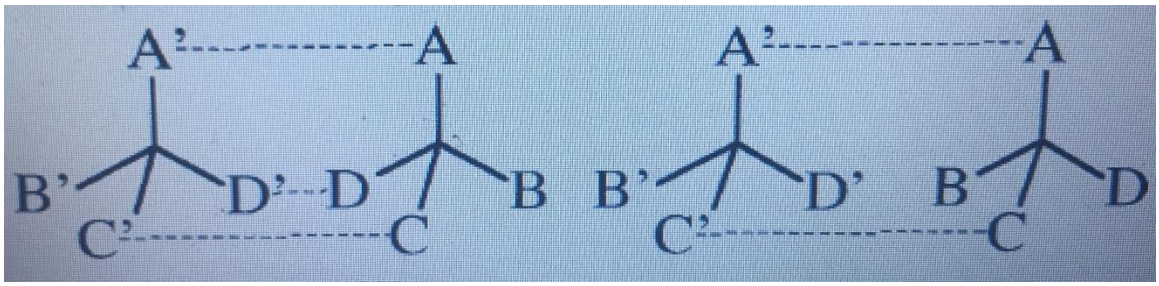
2.2 ქირალური დაყოფის მეთოდები

ქირალური ნივთიერებების სიმრავლემ და ფართო გამოყენებამ სამკურნალწამლო საშუალებებში, სოფლის მეურნეობასა თუ სხვა სფეროებში ქირალური დაყოფა განსაკუთრებით აქტუალური გახადა. ქირალური დაყოფის განსაკუთრებით მძლავრ და პოპულარულ მეთოდებს კაპილარული ელექტროფორეზი და ქრომატოგრაფიული მეთოდები წარმოადგენს. ამ მეთოდების უპირატესობას წარმოადგენს ის, რომ მათი საშუალებით შესაძლებელია როგორც ქირალური დაყოფის განხორციელება, ასევე ენანტიომერული სისუფთავის კონტროლი სინთეზის სხვადასხვა ეტაპზე, რაცემატიზაციის პროცესი და პარალელურად მოვახდინოთ ხარისხის კონტროლი. შედარებით ახალ, მაგრამ საკმაოდ მძლავრ მეთოდს ქირალურ დაყოფებში წარმოადგენს კაპილარული ელექტრო ქრომატოგრაფია, რომელიც თავის თავში აერთიანებს, როგორც კაპილარული ელექტროფორეზის, ასევე ქრომატოგრაფიის უპირატესობებს.

იმისათვის, რომ ქირალური დაყოფა მოხდეს ყველა ზემოთ ნახსენებ მეთოდში აუცილებელია ქირალური სელექტორების გამოყენება, რომლებიც თავად წარმოადგენენ ქირალურ ნივთიერებებს და შესაბამაისად განსხვვებულად ურთიერთქმედებენ თითოეულ ენანტიომერთან. ეს განსხვავებული ურთიერთქმედება შეიძლება გამოიხატოს, როგორც განსხვავებულ აბსორბცია-დესორბციაში, ასევე განსხვავებული სტრუქტურის კომპლექსის წარმოქმნაში. დღეითვის ქირალური სელექტორების საკმაოდ ფართო სპექტრი არსებობს, რომელთაგან ოპტიმალურის ამორჩევა ხდება გამოყენებული მეთოდისა და ექსპერიმენტის მიზნებიდან გამომდინარე.

ქირალური გამოცნობის მექანიზმის აღსაწერად ხშირად გამოიყენება სამ წერტილიოვანი ურთიერთქმედების მეთოდს, რომელიც დალგლიეშის მიერ იქნა მოცემული. ზემოთხსენებული მეთოდი გულისხმობს, რომ მოცემული სამ სახის

ურთიერთქმედებიდან ერთ-ერთი მაინც უნდა იყოს სტერეოსელექტიური (სურ. 2) იმისათვის რომ ადგილი ჰქონდეს ქირალურ გამოცნობას.



სურ. 2 სამ წერტილიანი ურთიერთქმედების მოდელის დიაგრამა

ასევე მნიშვნელოვანია ლიპკოვიცის მიერ მოცემული მოდელი, რომელიც საკვლევი ნივთიერებისა და ქირალური სელექტორის ურთიერთქმედებას აღწერს ატომურ დონეზე. ქირალური დაყოფის ძირითად მიზეზებს წარმოადგენს შემდეგი ფაქტორები

1) წყალბადური ბმა

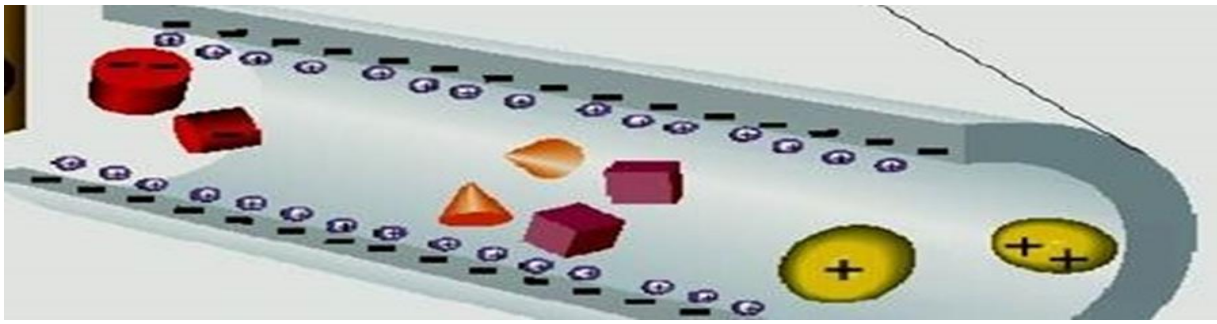
2) π-πურთიერთქმედება

3) იონური ურთიერთქმედება (მართალია იონურ ურთიერთქმედებას ქირალურ დაყოფაში იმხელა მნიშვნელობა არ აქვს, როგორც ზემოთ ჩამოთვლილ ურთიერთქმედებებს, მაგრამ იგი შეიძლება ქირალური დაყოფის დამხმარე ფაქტორად იყოს წარმოდგენილი).[2]

2.3 კაპილარული ელექტროფორეზის მეთოდი და მისი უპირატესობები დაყოფის სხვა მეთოდებთან შედარებით

კაპილარული ელექტროფორეზი წარმოადგენს ნივთიერებათა დაყოფის მეთოდს, რომელიც დაფუძნებულია ნარევთა განსხვავებულ ძვრადობაზე ელეტრულ ველში, რაც განპირობებულია ელექტროოსმოსური და ელექტროფორეტული ძვრადობით. ელექტროფორეტული ძვრადობა აღიძვრება საკვლევი ნიმუშის თითოეულ კომპონენტში და იწვევს მათ გადაადგილებას ელექტრულ ველში. ელექტროფორეტული ძვრადობა თითოეული კომპონენტის მუხტის სიმკვრივეზეა დამოკიდებული, რის შედეგადაც კომპონენტები რომელთა მუხტი უფრო დიდია, ხოლო რადიუსი ნაკლები უფრო სწრაფად გადაადგილდებიან კაპილარში, მუხტის სიმკვრივე ხშირად კომპონენტების pK სიდიდეზეა დამოკიდებული, შესაბამისად საჭიროა ისეთი pH-ის შერჩევა, რომელზეც საკვლევი ნიმუშის ყველა კომპონენტს განსხვავებული მუხტი ექნებათ, თუნდაც იგი ნულის ტოლი იყოს, რადგან ამ დროს მოცემული კომპონენტის სიჩქარე ელექტროოსმოსური ნაკადის

სიჩქარის ტოლი იქნება, განსხვავებით სხვა კომპონენტების სიჩქარეებისაგან, რომელთა მუხტიც ნულისაგან განსხვავებულია. (სურ. 3).



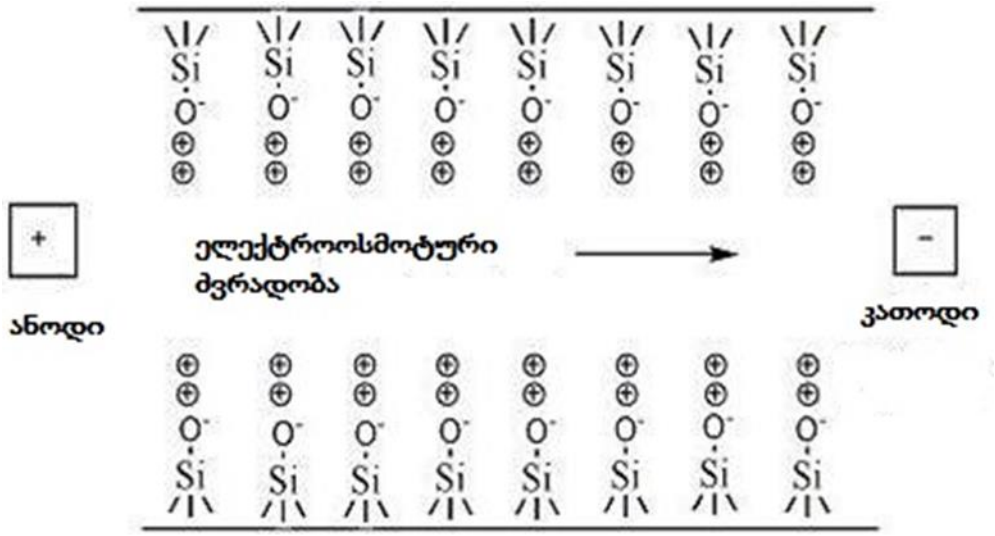
სურ. 3 ელექტროფორეტული ძვრადობის სქემატური გამოსახულება

ელექტროოსმოსური ნაკადი კაპილარული ელექტროფორეზის ექსპერიმენტის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი შემადგენელი კომპონენტია, რადგან სწორედ ელექტროოსმოსური ნაკადის გავლენით გადაადგილდება კაპილარში ნეიტრალური კომპონენტები. ელექტროოსმოსური ნაკადი აღიძვრება კაპილარის ზედაპირზე არსებული სხვადასხვა ჯგუფების იონიზაციის შედეგად (სურ. 4). ან ხსნარში არსებული იონების ადსორბციით კაპილარის ზედაპირზე, ჩვენს შემთხვევაში ვიყენებდით კვარცის კაპილარს (ასევე გამოიყენება ტეფლონის და პირექსის კაპილარები), შესაბამისად ამ შემთვევაში ხდება კაპილარის ზედაპირზე არსებული სილანური ჯგუფების იონიზაცია, რის შედეგადაც კაპილარის ზედაპირზე ხდება უაარყოფითი მუხტის კონცენტრირება, ხოლო ბუფერულ ხსნარში არსებული დადებითად დამუხტული ნაწილაკების აკუმულირება სწორედ კაპილარის ზედაპირზე არსებული უარყოფითი მუხტის გასწვრივ ხდება. აღნიშნული მუხტის გადანაწილება თავის მხრივ იწვევს ნაკადის ორმაგ შრეს. ელექტროოსმოსური ძვრადობის როლი კაპილარულ ელექტროფორეზში ძალიან დიდია და ელექტროფორეტული ძვრადობისაგან განსხვავებით ის ვარირებადი სიდიდეა. ელექტროოსმოსური ძვრადობა რამდენიმე პარამეტრის ცვლილებით შეგვიძლია ვარეგულიროთ, პირველი და ყველაზე მნიშვნელოვანი პარამეტრი, რომლის ცვლილებაც ანალიზის შედეგზე ფუნდამენტურ გავლენს არ ახდენს (იშვიათი გამონაკლისების გარდა) ბუფერული ხსნარი pH-ია, რაც უფრო მაღალია იგი მით უფრო მეტი სილანური ჯგუფების იონიზაცია ხდება კაპილარში და შესაბამისად უფრო მაღალია ელექტროოსმოსური ნაკადის მნიშვნელობაც. აუცილებელია აღინიშნოს, რომ იმის მიხედვით თუ რომელ კაპილარს ვიყენებთ ელექტროოსმოსური ნაკადის მნიშვნელობა მნიშვნელოვნად იცვლება (სურ. 5). ელექტოოსმოსური ნაკადის ვარირებადობის გამო მნიშვნელოვანია ბუფერული ხსნარის pH-ის ანალიზის მიზნებიდან გამომდინარე ცვლილება, რადგან ისეთი pH-ის

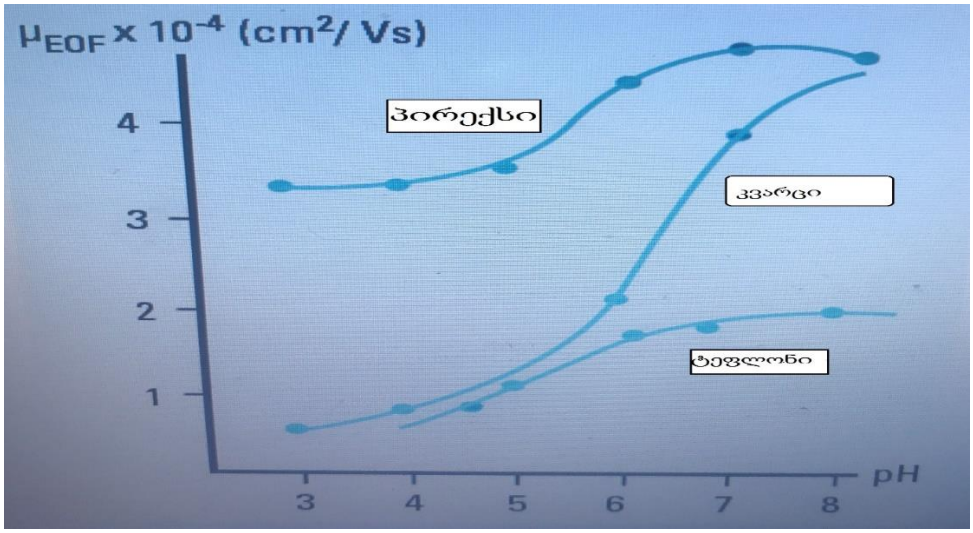
შერჩევისას, როდესაც ელექტროოსმოსური ნაკადი ძალიან მცირე სიდიდეა, შესაძლებელია მოხდეს უარყოფითად დამუხტული ნაწილაკების ადსორბირება კაპილარის ზედაპირზე, რაც დიდ პრობლემას წარმოადგენს ცილების ანალიზში. ანალიზის ისეთი მეთოდებისთვის, როგორსაც წარმოადგენს იზოელექტრული ფოკუსირება, იზოტახოფორეზი და კაპილარული გელ-ელექტროფორეზი საჭიროა ელექტროოსმოსური ნაკადის მინიმუმამდე დაყვანა ამ მთლიანად მოსპობა [4].

pH-ის გარდა ელექტროოსმოსური ნაკადზე შეიძლება გავლენა მოახდინოს ძაბვამ, რომელსაც ანალიზის დროს ვიყენებთ, რადგან ელექტროოსმოსური ნაკადი და გამოყენებული ელექტრული დენი ერთმანეთის პროპორციული სიდიდეებია. გასათვალისწინებელია ის ფაქტი, რომ ძაბვა პირდაპირპროპორციულად არის დაკავშირებული ანალიზის ხანგრძლივობასთან, შესაბამისად თუ მას ძალიან შევამცირებთ ანალიზის მნიშვნელოვნად გაიზრდება, ხოლო ძაბვის გაზრდამ შეიძლება ანალიზის დრო ისე შეამციროს, რომ ეს დრო არ იყოს საკმარისი კომპონენტების ერთმანეთისაგან დასაყოფად.

ასევე შესაძლებელია ბუფერული ხსნარის კონცენტრაციისა და ტემპერატურის ცვლილების მიხედვით ელექტროოსმოსურ ნაკადზე გავლენის მოხდენა. გარდა ზემოთ აღნიშნულისა არსებობს მეთოდები რომლის საშუალებითაც შესაძლებელია კაპილარის ზედაპირზე ნეიტრალური ან დადებითად ან უარყოფითად დამუხტული პოლიმერის დაფენა, რომელიც უზრუნველყოფს ელექტროოსმოსური ნაკადის არამარტო მთლიანად გაქრობას ან შემცირებას, არამედ მისი მიმართულების შეცვლასაც კი იმ შემთხვევაში თუ მოვახდენთ ზედაპირის დადებითად დამუხტული პოლიმერით დაფარვას.



სურ. 4 ელექტროოსმოსური ძვრადობის სქემატური გამოსახულება



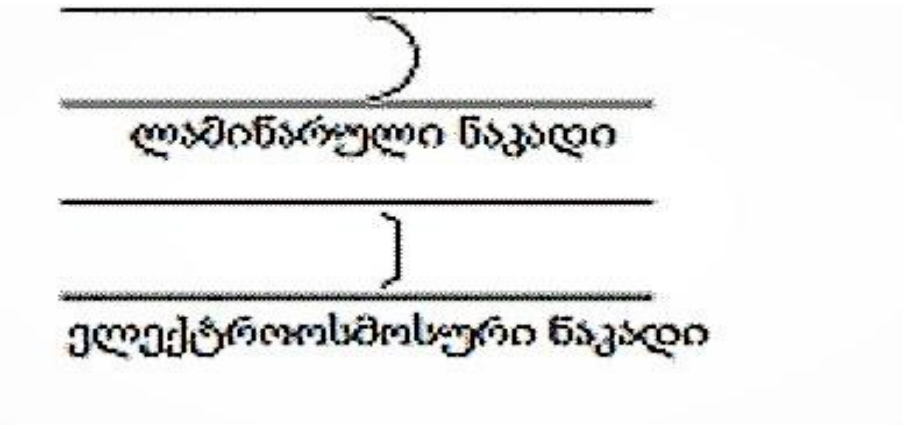
სურ. 5 ელექტროოსმოსური ძვრადობის pH-ზე დამოკიდებულების გრაფიკი სხვადასხვა სახის კაპილარისთვის.

ბოლო ორი ათწლეულია კაპილარულმა ელექტროფორეზმა ქირალურ დაყოფაში სამკაოდ დიდი პოპულარობა მოიპოვა, ზოგადად კაპილარულ ელექტროფორეზს ქრომატოგრაფიულ მეთოდებთან შედარებით გააჩნია რიგი უპირატესობები, ეს უპირატესობები მოიცავს, როგორც პრაქტიკულ ასევე თეორიულ უპირატესობებს.

კაპილარული ელექტროფორეზის მეთოდის პრაქტიკული უპირატესობები განპირობებულია ხელსაწყოს აგებულებით და იწვევს იმას, რომ კაპილარულ ელექტროფორეზში არ გვაქვს მკვდარი მოცულობა, რადგან არ გვაქვს ინიცირებისა და დეტექტირების ბლოკები, ამ შემთხვევაში ინიცირებაც და დეტექტირებაც ხდება კაპილარში (სურ. 5). კაპილარული ელექტროფორეზის ზემოთ ნახსენები უპირატესობები გამოწვეულია ხელსაწყოს სიმარტივით, რომელიც მოიცავს ბუფერით შევსებულ რეზერვუარებს, რომელშიც კპილარის ბოლოებია ჩაძირული, რათა მოხდეს ელექტრული წრედის შეკვრა, რაც გამოიწვევს კაპილარში ელექტროოსმოტური ნაკადის, ხოლო საანალიზო ნიმუშში ელექტროფორეტული ძვრადობის გაჩენას. დეტექტირება, როგორც ზემოთ იყო აღნიშნული ინიცირების მსგავსად თავად კაპილარში ხდება, რომლის გარე ზედაპირის კაპილარისთვის დრეკადობის მინიჭების მიზნით პოლიმერით არის დაფარული, სწორედ ამიტომ კაპილარის გარკვეულ ნაწილზე საჭიროა პოლიმერის მოშორება, რათა გარკვეულ მონაკვეთზე კაპილარი გახდეს ხილულ და ულტრაიისფერ

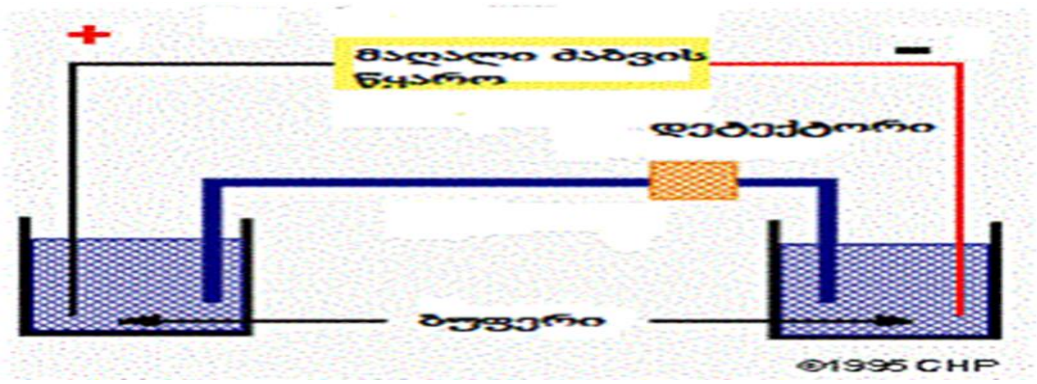
უბანში გამჭირვალე, პოლიმერის მოშორება კაპილარის გახურებით ხდება რის შედეგადაც კაპილარს დეტექტირების ფანჯარა უკეთდება.

ასევე მნიშვნელოვანია წაკვეთილი კონუსის ფორმის ნაკადი კაპილარულ ელექტროფორეზში, რაც გამოწვეულია ელექტროოსმოსური ნაკადის გავლენით წარმოქმნილი ორმაგი ელექტრული შრის შედეგად, იმის გამო რომ ხსნარში არსებული დადებითი მუხტის ლოკალიზება კაპილარის კედლებთან ხდება, ერთი შეხედვით ხსნარის ამ ნაწილის ელექტროფორეტული ძვრადობა კათოდის მიმართ უფრო მაღალი უნდა იყოს, ვიდრე ნაკადის დანარჩენი ნაწილის, შესაბამისად ნაკადს უნდა გააჩნდეს ჩაზნექილი პარაბოლის ფორმა, თუმცა ამ შემთხვევაში გასათვალისწინებელია ხახუნი, რომელიც ხდება კაპილარის კედლებსა და ნაკადის ზემოთ აღნიშნულ ნაწილთან, რაც მკვეთრად ამცირებს მის სიჩქარეს, შედეგად კი ვიღებთ წაკვეთილი კონუსისებრ ნაკადს, რომელიც ძლიერ განსხვავდება სითხურ ქრომატოგრაფიაში არსებული ლამინარული ნაკადისგან, რაც საშუალებას გვაძლევს კაპილარულ ელექტროფორეზში მივიღოთ ბევრად უფრო ვიწრო პიკები ვიდრე სითხურ ქრომატოგრაფიაში (სურ. 6).



სურ. 6 ელექტროოსმოსური ნაკადისა და ლამინარული ნაკადის შედარება

კაპილარულ ელექტროფორეზის მეთოდის ერთ-ერთ ძირითად უპირატესობას ასევე წარმოადგენს ის, რომ მიიღწევა თეორიული თეფშების ძალიან მაღალი რიცხვი (უმეტესად მეტია 100000-ზე), რაც გამოწვეულია იმით, რომ ვან დეემტერის განტოლებაში არ გვაქვს A (განივი დიფუზია) და C (მასის გადატანის წინააღმდეგობა) კოეფიციენტი, რადგან დაყოფა ხდება ცარიელ კაპილარსა და ერთ ფაზაში [5].



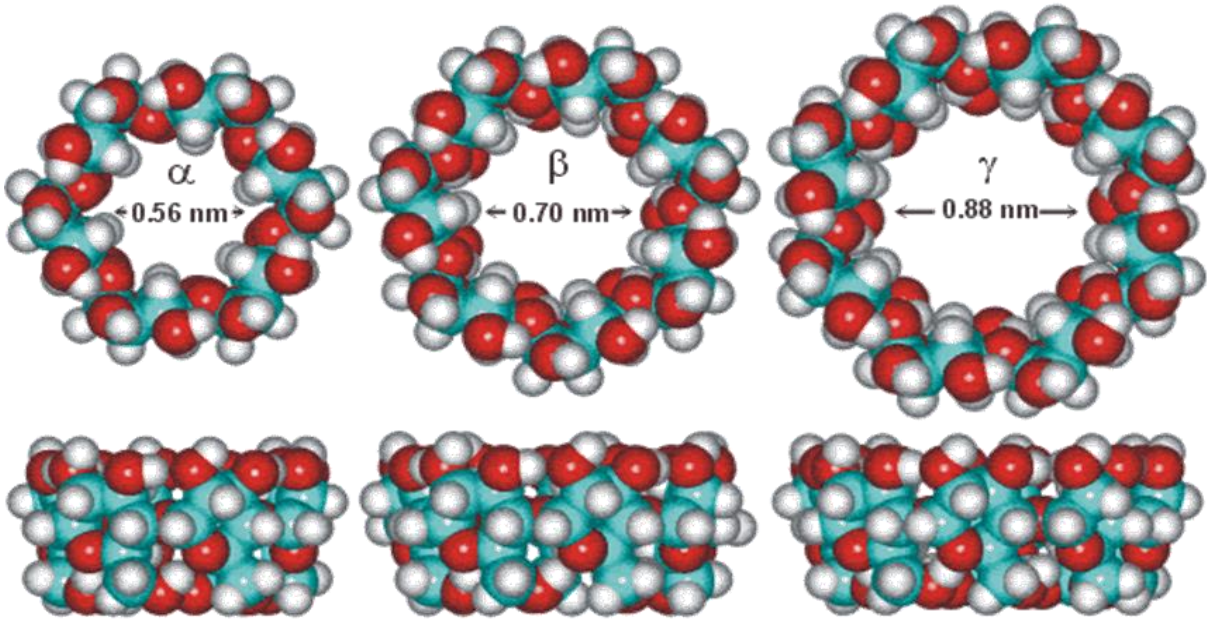
სურ. 5 კაპილარული ელექტროფორეზის ხელსაწყოა სქემა

ქირალური დაყოფებისთვის კაპილარულ ზონურ ელექტროფორეზს ვერ გამოვიყენებთ, რადგან ენანტიომერებს გააჩნიათ ერთნაირი ფიზიკური და ქიმიური თვისებები, აქედან გამომდინარე მათი მუხტის სიმკვრივე ელექტრულ ველში იქნება ერთმანეთის ტოლი, ქირალური დაყოფისათვის კაპილარულ ელექტროფორეზში აუცილებელია გამოვიყენოთ ქირალური სელექტორი, რომელიც განასხვავებს ენანტიომერებს ერთმანეთისაგან და რაც ყველაზე მნიშვნელოვანია შესძენს მათ განსხვავებულ სიჩქარეებს, ამისათვის კი აუცილებელია გამოვიყენოთ კაპილარული ელექტროკინეტიკური ქრომატოგრაფია, რომელიც გულისხმობს ბუფერში ფსევდო ფაზის დამატებას და შემდეგ ქირალური დაყოფის მიღწევას სწორედ ფსევდო ფაზასა და საკვლევ ნიმუშის ურთიერთქმედების ხარჯზე, ფსევდო ფაზებად საკმაოდ აქტუალურია ციკლოდექსტრინების გამოყენება, ამ მიმართულებით პირველი შრომა ჯერ კიდევ 1985 წელს გამოქვეყნდა გესმანის მიერ.

2.4 ციკლოდექსტრინების გამოყენება ქირალურ დაყოფებში

ციკლოდექსტრინები წარმოადგენენ ციკლურ ოლიგოსაქარიდებს, რომლებიც შეიცავენ D-(+)-გლუკოპირანოზას მონომერს, რომლებიც ერთმანეთთან დაკავშირებულები არიან

α(1,4)- გლიკოზიდური ბმით (სურ. 6)



სურ. 6 ბუნებრივი ციკლოდექსტრინები

ციკლოდექსტრინებს გააჩნიათ კალათის ფორმა, რომლის შიგა შრე ჰიდროფობურია, ხოლო გარე შრე ჰიდროფილური, სწორედ შიგა შრის ჰიდროფობურობა უწყობს ხელს საკვლევ ნიმუშსა და ციკლოდექტრინს შორის ჩართული კომპლექსის წარმოქმნას. ცალკეულ ენანტიომერსა და ციკლოდექტრინს შორის წარმოქმნილ კომპლექსს გააჩნია ერთმანეთისგან განსხვავებული ძვრადობა და კომპლექსის მდგრადობის დრო, სწორედ ეს ფაქტი განაპირობებს ციკლოდექსტრინების ენანტიომერების გამოცნობის უნარს. ასევე გასათვალიწინებელია გარე შრით ურთიერთქმედებაც, რომელიც მოიცავს წყალბადურ ბმებს და დიპოლ-დიპოლურ ურთიერთქმედებას.

ქირალური დაყოფებისთვის კაპილარულ ელექტროფორეზში გამოიყენება როგორც ბუნებრივი, ასევე მათი მოდიფიცირებით მიღებული ციკლოდექსტრინები. კაპილარულ ელექტროფორეზში ციკლოდექსტრინების გამოყენების ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი უპირატესობა არის წყლიან ბუფერში მათი კარგი ხსნადობა და ხილულ და ულტრაიისფერ უბნებში მათი გამჭირვალობა.

ბუნებრივ ციკლოდექსტრინებს წარმოადგენს α, β და γ ციკლოდექსტრინები, რომელთაგანაც ალფა ექვსი ციკლური ოლიგოსაქარიდისგან, ბეტა შვიდი, ხოლო გამა რვა ციკლური ოლიგოსაქარიდისგან შედგება. ბუნებრივი ციკლოდექსტრინების დერივატიზაციას 2, 3 და 6 მდგომარეობაში არსებული ჰიდროქსილის ჯგუფებში ახდენენ, ხოლო რაც შეეხება მათი ხსნადობის გაზრდას, იგი შიგა შრის მოდიფიცირებით არის შესაძლებელი.

ქირალური გამოცნობის მექანიზმი ციკლოდექსტრინების შემთხვევაში დაფუძნებულია ღრუში არსებულ ჰიდროფობურ ჯგუფებთან საკვლევი ნივთიერების ჰიდროფობური ნაწილის ურთიერთქმედებით (ხშირ შემთხვევაში არომატული ბირთვის), ასევე შესაძლებელია მოხდეს წყალბადური ბმის წარმოქმნა და დიპო-დიპოლური ურთიერთქმედება ციკლოდექსტრინის ჰიდროქსილის ჯგუფებსა და საკვლევი ნიმუშის ქირალურ ცენტრთან არსებულ პოლარულ ნაწილს შორის.

ქირალური კვლევებისათვის დაყოფისა და სპექტრალური მეთოდების ტანდემის გამოყენება იდეალური არჩევანია, მაგალითად შეგვიძლია მოვიყვანოთ კაპილარული ელექტროფორეზი, რომლის გამოყენებითაც იქნა შესრულებული ჩვენი ექსპერიმენტული სამუშაო, რომელშიც ქირალური დაყოფის ექსპერიმენტი ტარდებოდა ჰომოგენურ გამხსნელსა და მონო ფაზაში, რაც საშუალებას გვაძლევდა ამ პირობების სიმულაცია მოგვეხდინა ბირთვულ-მაგნიტური რეზონანსის ექსპერიმენტში. ამ ორი მეთოდის ერთობლიობა საშუალებას გვაძლევს მივიღოთ ინფორმაცია არამარტო მოლეკულათშორისი ურთიერთქმედების შესახებ, არამედ შევისწავლოთ ქირალური გამოცნობის მექანიზმი მოლეკულურ დონეზე. ბოლო 25 წლის განმავლობაში ბირთვულ-მაგნიტური ექსპერიმენტი ფართოდ გამოიყენება ქირალურ ანალიზში სტექიომეტრიის, შეუღლების მუდმივას და სელექტორ-სელექტანდის მიერ წარმოქმნილი კომპლექსის სტრუქტურის დასადგენად, რათა სიღრმისეულად მოხდეს კაპილარულ ელექტროფორეზში მიღებული ენანტიომერების დაყოფის ფაქტორების და ქირალური გამოცნობის მექანიზმების კვლევა, თუმცა ამ მხრივ ჯერ კიდევ მნიშვნელოვანი სამუშაოა ჩასატარებელი, რათა საშუალება გვქონდეს განვსაზღვროთ ქირალურ გამოცნობაზე მოქმედი ფაქტორები და ვიწინასწარმეტყველოთ ქირალური ანალიზის შედეგები ქირალური სელექტორის, სელექტანდის ბუნებისა და სტრუქტურის გათვალისწინებით და ანალიზის პირობებზე დაყრდნობით.

2.5 ბირთვულ-მაგნიტური რეზონანსის სპექტროსკოპია

ბოლო 25 წლის განმავლობაში ბირთვულ-მაგნიტური ექსპერიმენტი ფართოდ გამოიყენება ქირალურ ანალიზში სტექიომეტრიის, შეუღლების მუდმივას და სელექტორ-სელექტანდის მიერ წარმოქმნილი კომპლექსის სტრუქტურის დასადგენად, რათა სიღრმისეულად მოხდეს კაპილარულ ელექტროფორეზში მიღებული ენანტიომერების

დაყოფის ფაქტორების და ქირალური გამოცნობის მექანიზმების კვლევა, განსაკუთრებით მნიშვნელოვანი და საინტერესო მეთოდს ამ მხრივ წარმოადგენ ბირთვულ-ოვერჰაუზენის ეფექტზე დაფუძნები ROESY ექსპერიმენტი. ROESY არის NOESY ექსპერიმენტის მსგავსი, თუმცა იგი ძირითადად საშუალო ზომის მოლეკულების კვლევისთვის გამოიყენება. იმის ნაცვლად, რომ დამზერილ იქნას ჯვარედინი რელაქსაცია z-დამაგნიტების საწყისი მდგომარეობიდან, როგორც სტანდარტულ ბირთვულ-მაგნიტურ ექსპერიმენტში ხდება, ამ შემთხვევაში წონასწორული მდგომარეობა ბრუნდება x ღერძზე (ღერძის მიმართ), ხოლო შემდეგ სპინის ბლოკირება ხდება შიგა მაგნიტური ველით ისე რომ მას შეუძლია პრეცესირება. ეს მეთოდი შესაძლებელია გამოყენებული იქნას იმ მოლეკულებისათვის, რომელთა ბრუნვის კორელაციის დრო არის იმ დიაპაზონში, რომელშიც ბირტვული ოვერჰაუზერის ეფექტი არის ძალიან მცირე საიმისოდ, რომ შესაძლებელი იყოს მისი დამზერა, განსაკუთრებით ეს არის მოლეკულები, რომელთა მოლეკულური მასა არის დაახლოებით 1000 დალტონი, რადგან ROESY-ის აქვს განსხვავებული დამოკიდებულება კორელაციის დროსა და განივი რელაქსაციის სიჩქარეს შორის. NOESY-ში განივი რელაქსაციის სიჩქარის კონსტანტა დადებითი მნიშვნელობიდან უარყოფითში კორელაციის დროის გაზრდასთან ერთად და იძლევა ისეთ მნიშვნელობას, რომელიც ახლოს არის ნულთან, მაშინ როდესაც ROESY-ში განივი რელაქსაციის კონსტანტაყოველთვის დადებითია [6, 7]. ROESY-ი ექსპერიმენტი საშუალებას გვაძლევს სელექტორ-სელექტანდს შორის არსებული კომპლექსის აგებულების შესახებ, ამ დროს ხდება როგორც საკვლევი ნიმუშის ასევე ქირალური სელექტორის თითოეული პროტონის დასხივება, რათა გამოძახილი მოგვცეს მისგან 2-3 ანქსტრემით დაშორებულმა ყველა პროტონმა.

3. ექსპერიმენტული ნაწილი

3.1 გამოყენებული ხელსაწყოები

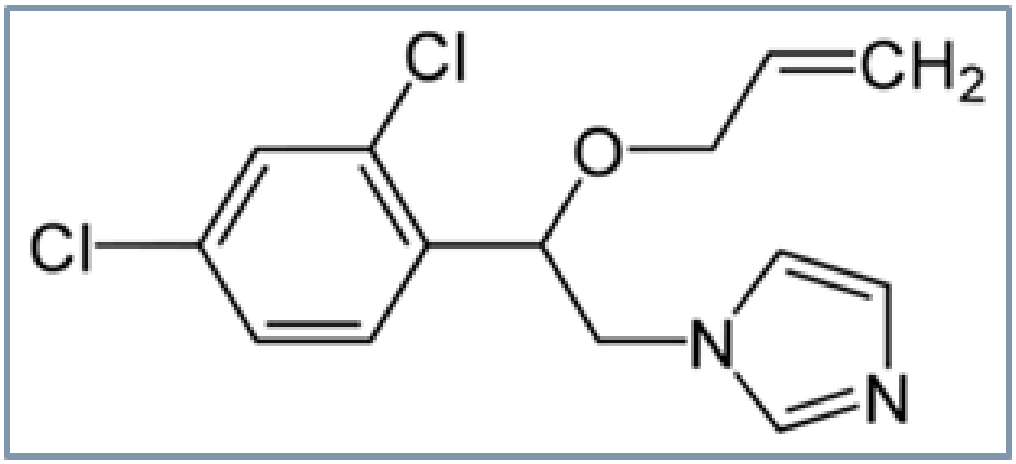
კაპილარული ელექტროფორეზის ექსპერიმენტის ჩატარება ხდება Agilent G1600 (Agilent Technologies, ვალდბრონი, გერმანია) მოდელის კაპილარული ელექტროფორეზის ხელსაწყოს გამოყენებით, რომელიც აღჭურვილი იყო ინიცირების ავტომატური სისტემით, ულტრაიისფერი დეტექტორი და ტემპერატურის კონტროლირებადი სისტემით. მეთოდების შესადგენად და ხელსაწყოს სამართავად გამოყენებული იქნა The Chemstation B.04.03 პროგრამა, ხოლო კვარცის კაპილარები მოწოდებული იქნა Polymicro Technologies (ფროენიქსი, არიზონას შტატი, აშშ) მიერ.

ნიმუშის წონაკის აწონვა ხდებოდა ნახევრადმიკრო სასწორზე მოდელი Kern ABJ-NM-ის გამოყენებით (Kern, გერმანია).

ბირთვულ მაგნიტური რეზონანსის ექსპერიმენტში კი გამოყენებული იქნა Varian-ის ფირმის 500 მეგაჰერციანი ბირთვულ-მაგნიტური რეზონანსის ხელსაწყო.

3.2 მასალები და რეაგენტები

რაცემული ენილკონაზოლი (1-ალილოქსი-2-(იმიდაზოლ-1-ილ)-1-ფენილეთანი,)სურ.7



სურ.7 ენილკონაზოლის სტრუქტურა

დეიტერიუმის ოქსიდი (D_2O), ნატრიუმის დეიტეროქსიდი (NaOD, 40% გახსნილი D_2O), ფოსფორმჟავა (85%), 85% დეიტერირებული ფოსფორმჟავა გახსნილი D_2O-ში, ჰეპტაკის(2,6-დი-*O*-მეთილ)-β-CD (DM-β-CD) და ჰეპტაკის(2,3,6-ტრი-*O*-მეთილ)-β-CD (TM-β-CD) შეძენილი იყო Sigma-Aldrich (სენტ ლუისი, აშშ). ბუნებრივი α-, β- და γ-CD, ჰეპტაკის(2-O-მეთილ-3,6-დი-O-სულფო)-β-CD (HMDS-β-CD), ჰეპტაკის(2,3-დი-O-მეთილ-6-O-სულფო)-β-CD (HDMS-β-CD) და ჰეპტაკის(2,3-დი-O-აცეტილ-6-O-სულფო)-β-CD (HDAS-β-CD)

უსასყიდლოდ გადმოგვცა კომპანიამ Cyclolab (ბუდაპეშტი, უნგრეთი). გამოყენებული წყალი იყო Milli-Q ხარისხის (მილიპორი, ბედფორდი, აშშ). ელექტროლიტის ხსნარი გამოყენების წინ იფილტრებოდა მემბრანულ ფილტრში (0.2 მკმ) Alltech (ლაარნე, ბელგია).

3.3 კაპილარული ელექტროფორეზის ექსპერიმენტი

ენანტიომერების დაყოფა კაპილარულ ელექტროფორეზში შესრულებული იქნა 50 mM კალიუმის დიჰიდროფოსპატის გამოყენებით, რომლის pH 2.0.

გამოყენებული კვარცის კაპილარის მთლიანი სიგრძე იყო 50სმ, ხოლო ეფექტური სიგრძე 41 სანტიმეტრი, კაპილარის შიგა დიამეტრი წარმოადგენდა 50 მიკრომეტრს.

ნიმუშის ინიცირება კაპილარში ხდებოდა 5 მილიბარი წნევის საშუალებით 3 წამის განმავლობაში. ანალიზები ტარდებოდა მუდმივი დენის 150 მიკროამპერის და 20 ºC პირობებში. დეტექტირება ხდებოდა ულტრაიისფერ უბანში 200 და 220ნმ-ზე. ინიცირებამდე ხდებოდა კაპილარის გარეცხვა 1N NaOH-ით 2 წამის განმავლობაში, რის შემდეგაც კაპილარი კვლავ ირეცხებოდა ჯერ ბუფერით, ხოლო შემდეგ ციკლოდექსტრინიანი ბუფერით 2 წუთის განმავლობაში.სამუშაოს დამთავრების შემდეგ კაპილარი გარეცხვა ხდებოდა 30 წუთის განმავლობაში1M NaOH-ით და შემდეგ 15 წუთით წყლით.

3.4 ენილკონაზოლის ენანტიომერების შეგროვება.

მონიშნული ნიმუშის მოსამზადებლად ენანტიომერების შეგროვება მოხდა სითხური ქრომატოგრაფიის გამოყენებით, ამ მიზნით გამოვიყენეთ შემდეგი მეთოდი:

ქრომატოგრაფიული სვეტი- Lux Cellulose-4,

სვეტების თერმოსტატის ტემპერატურა- 25 °C.

მოძრავი ფაზა-n-ჰექსანი/2-პროპანოლი/დიეთილამინი (60:40::0.1)

ნაკადის სიჩქარე- 1 მლ/წთ.

ამ მეთოდით პირველი ელუირდებოდა (-)-ენილკონაზოლი, ხოლო შემდეგ (+)-ენილკონაზოლი. შეგროვებული ენანტიომერების სისუთავე წარმოადგენდა 99.8%. შეგროვებული ენანტიომერების გამოყენება შემდგომში მოხდა, როგორც კაპილარული ელექტროფორეზის ექსპერიმენტში მიგრაციის რიგების შესასწავლად, ასევე ბირთვულ-მაგნიტური სპექტროსკოპიის ექსპერიმენტში.

4. მიღებული შედეგები და განსჯა

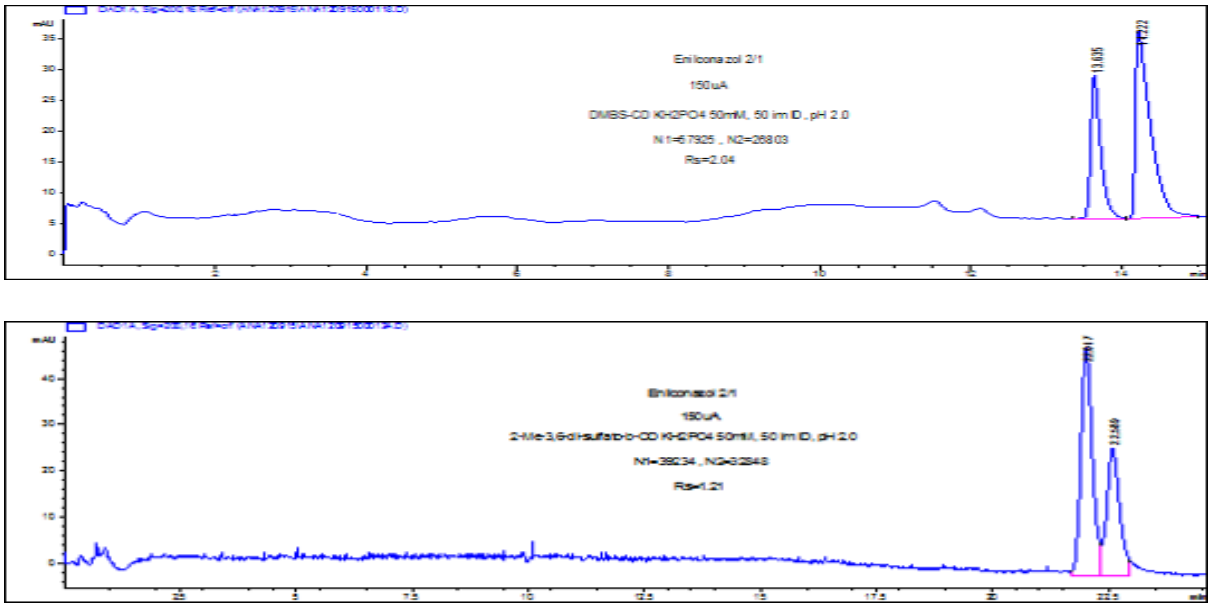
სურ. 8 კაპილარულ ელექტროფორეზში მიღებული შედეგები

ქირალური სელექტორი	კონცენტრაცია, მგ/მლ	t_1, წთ	t_2, წთ	a	მიგრაციის რიგი
a-CD	85	25.46	25.46	1.00	-
b-CD	18	16.61	17.19	1.03	(-) (+)
g-CD	100	7.71	7.83	1.02	(-) (+)
DM-b-CD	40	27.18	27.57	1.01	(-) (+)
TM-b-CD	20	9.26	9.56	1.03	(-) (+)
HMDS-b-CD	10	22.02	22.59	1.03	(+) (-)
HDMS-b-CD	10	13.64	14.22	1.04	(-) (+)
HDAS-b-CD	10	11.09	11.64	1.05	(-) (+)
HDA-b-CD	10	6.27	6.60	1.05	(-) (+)

ჩვენს მიერ მოხდა ენილკონაზოლის როგორც ნატიურ ასევე მოდიფიცირებულ ციკლოდექსტრინების გამოყენებით ანალიზის ჩატარება, რათა დაგვედგინა, როგორც ჩანაცვლებული ჯგუფების ასევე მოლეკულის ზომის გავლენა ქირალურ დაყოფაზე და გამოცნობის მექანიზმზე, იქიდან გამომდინარე, რომ ენილკონაზოლი საშუალო ზომის მოლეკულას წარმოადგენდა ჩვენთვის იმთავითვე ცნობილი იყო, რომ საუკეთესო დაყოფას ბუნებრივი ციკლოდექსტრინებიდან ბეტა ციკლოდექსტრინების გამოყენებით მივიღებდით, რაც გამართლდა კიდეც ექსპერიმენტის შედეგად, რადგან ბეტა ციკლოდექსტრინის შიგა ღრუ არის საშუალო ზომის და მასში ციკლოდექსტრინი ადვილად ჩავიდა და საკმაოდ დიდი დროც დაყო, რამაც მოგვცა საკმაოდ მაღალი სელექტიურობა ალფა და გამმა ციკლოდექსტრინთან შედარებით, მაგალითად ალფა ციკლოდექსტრინის შემთხვევაში მისი შიგა ღრუ არ აღმოჩნდა საკმარისი იმისათვის, რომ ენილკონაზოლთან ჩართული კომპლექსი წარმოექმნა, ხოლო გამა ციკლოდექსტრინის

შემთხვევაში იგი იმდენად დიდი იყო, რომ მდგრადი კომპლექსის წარმოქმნა ვერ მოხერხდა.

ციკლოდექსტრინების ზომების გარდა მნიშვნელოვან ფაქტორს წარმოადგენდა ციკლოდექსტრინების გარე შრის მოდიფიცირების შედეგად მიღებული ციკლოდექსტრინებისა და ჩამნაცვლებელი ჯგუფების გავლენა, როგორ ენანტიომერულ დაყოფაზე, ასევე მიგრაციის რიგზე. გარე შრის მოდიფიცირებას რამდენიმე მნიშვნელოვანი ფუნქცია აკისრია, პირველ რიგში ხდება გარე შრის ჰიდროფობურობის გაზრდა, მაგალითი შეგვიძლია მოვიყვანოთ ჩვენს მიერ გამოყენებულ ტრიმეთილ და დიმეთილ ბეტა ციკლოდექსტრინები, რომლებშიც ჰიდროქსილის მოდიფიცირება მოხდა მეთოქსი ჯგუფით, რამაც პირველ შემთხვევაში კომპლექსის მდგრადობა მკვეთრად გაზარდა, ხოლო სამი მეთილის რადიკალის შემთხვევაში დაყოფა გააუმჯობესდა. ჰიდროფობურობის გაზრდის გარდა გამოვიყენეთ დამუხტული ჯგუფებით მოდიფიცირებული ციკლოდექსტრინები, რომელთაგან განსაკუთრებით საინტერესო შედეგი მივიღეთ იმ შემთხვევაში, როდესაც გამოყენებული გვქონდა მეთილ დი სულფო ბეტა ციკლოდექსტრინი და დი მეთილ სულფო ბეტა ციკლოდექსტრინი, მიუხედავად იმისა, რომ მათ შორის არც ისე დიდი განსხვავებაა, დამუხტული ორი სულფო ჯგუფის არსებობამ მთლიანად შეცვალა გამოცნობის მექანიზმი (სურ.9)

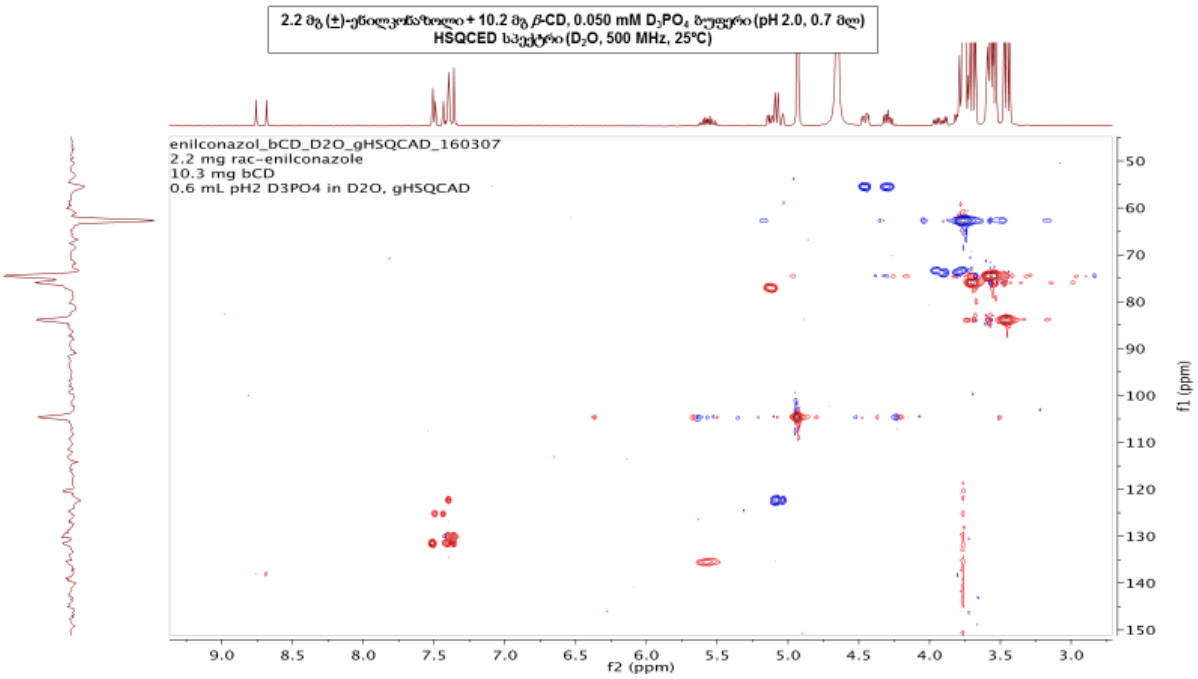


სურ. 9 მიგრაციის რიგის ცვლილება ბუნებრივ β-CDსა და მოდიფიცირებულ HMDS- β -CD ციკლოდექსტრინს შორის

ჩვენს მიერ ჩატარებული ბირთვულ-მაგნიტური ექსპერიმენტი შეგვიძლია დავყოთ

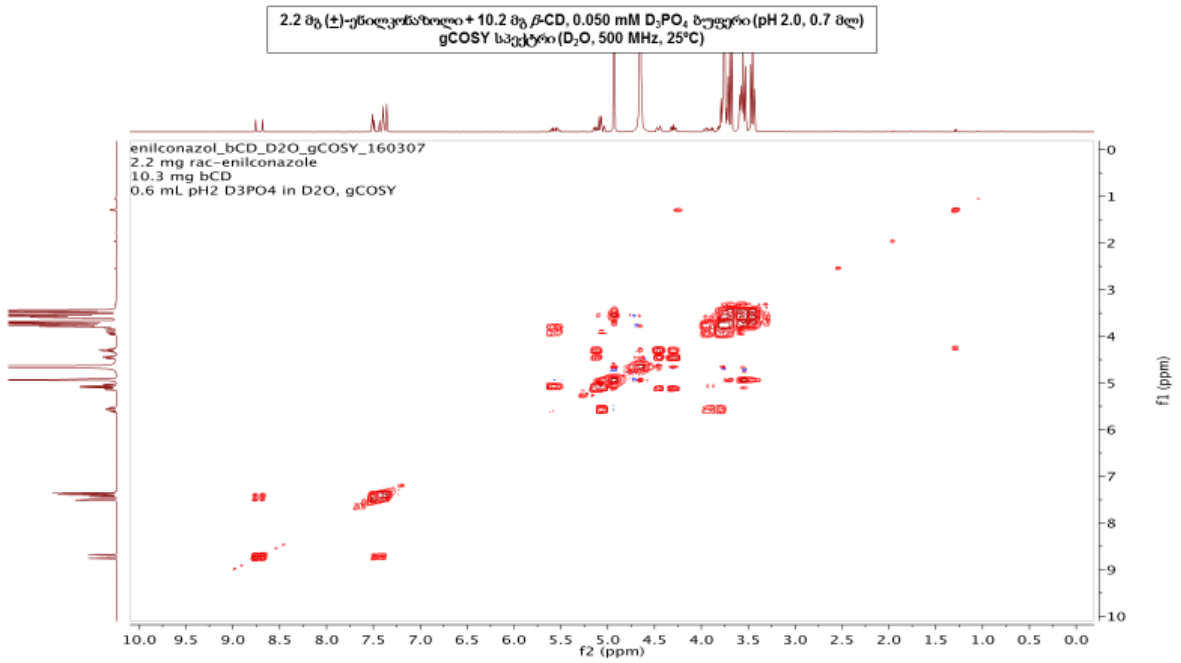
რამდენიმე ნაწილად:

1)პირველ რიგში გადავიღეთ ციკლოდექსტრინისა და ენილკონაზოლის მონიშნული ნიმუშის ნარევის პროტონულ-მაგნიტური სპექტრი ზუსტად იგივე პირობებში რა პირობებშიც ვატარებდით კაპილარული ელექტროფორეზის ექსპერიმენტს (ნახ. 10)



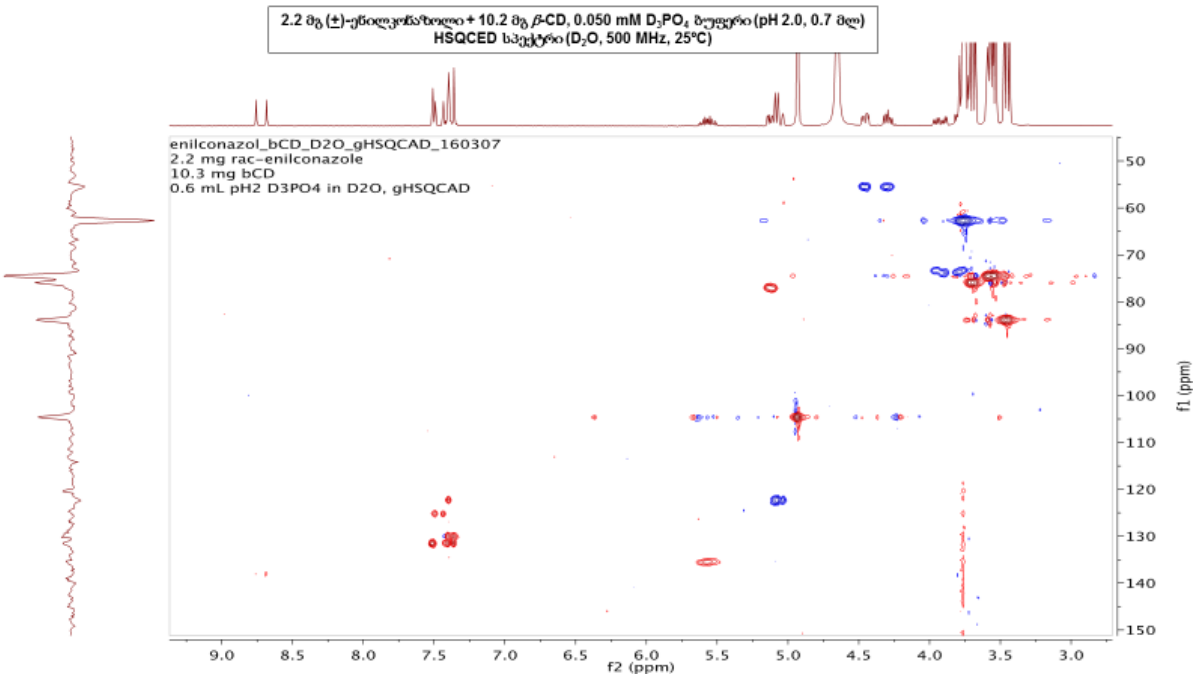
სურ.10 ენილკონაზოლისა და ბეტა ციკლოდექსტრინის ნარევის პროტონულ-მაგნიტური სპექტრი.

2) შემდეგ ეტაპზე გადავიღეთ ჰომობირთვული კოზი რაც საშუალებას მოგვცემდა პროტონულ-მაგნიტურ ექსპერიმენტში მიღებული სიგნალები მიგვეკუთვნებინა ჩვენთვის უკვე ცნობილი ციკლოდექსტრინისა და ენილკონაზოლის პროტონებისათვის (სურ.11)



სურ. 11 ენილკონაზოლისა და ბეტა ციკლოდექსტრინის gCOSY სპექტრი.

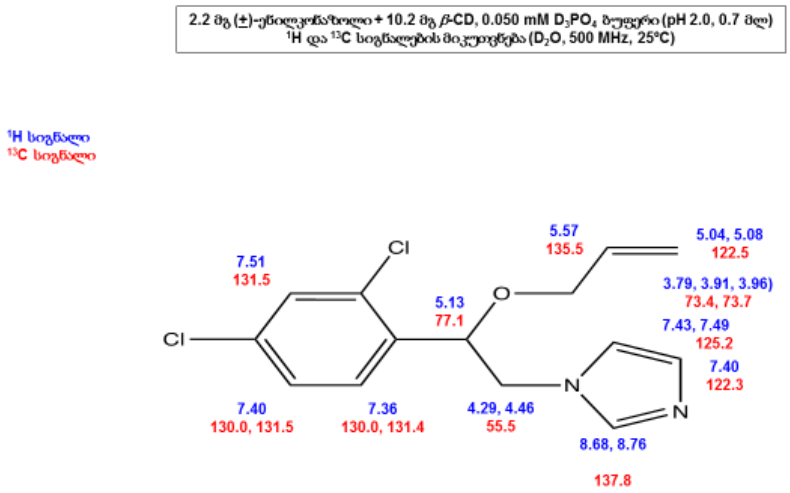
3) მესამე ეტაპს წარმოადგენდა ჰეტერობირთვული კოზი, რომელიც საშუალებას მოგვცემდა პროტონებსა და ნახშირბადებს შორის კორელაციის დადგენაში (სურ.12).



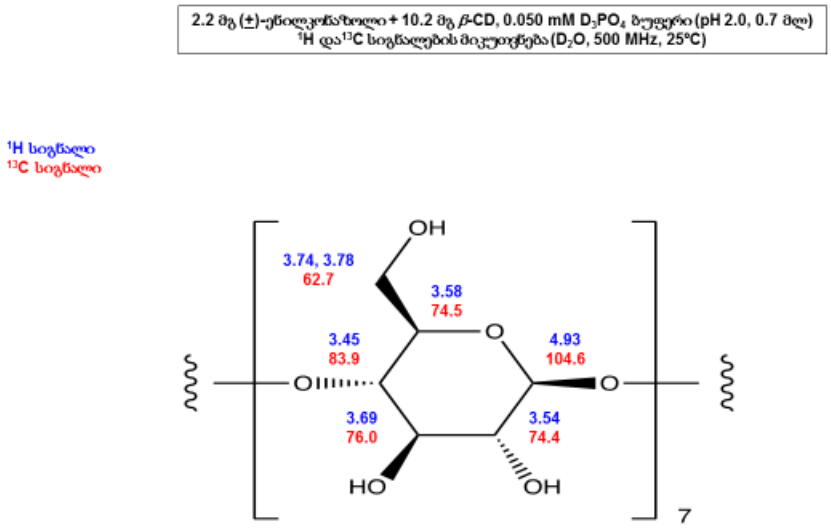
სურ. 12 ენილკონაზოლისა და ბეტა ციკლოდექსტრინის HSQC სპექტრი.

რის შედეგადაც ჩვენთვის უკვე ნათელი გახდა ციკლოდექსტრინისა და ენილკონაზუოლის

სტრუქტურიდან, რომელი პროტონი თუ ნახშირბადი რა სიხშირეზე იძლეოდა გამოძახილს, რამაც საშუალება მოგვცა სტრუქტურაში სიგნალების მიკუთვნების (სურ.13), (სურ.14)

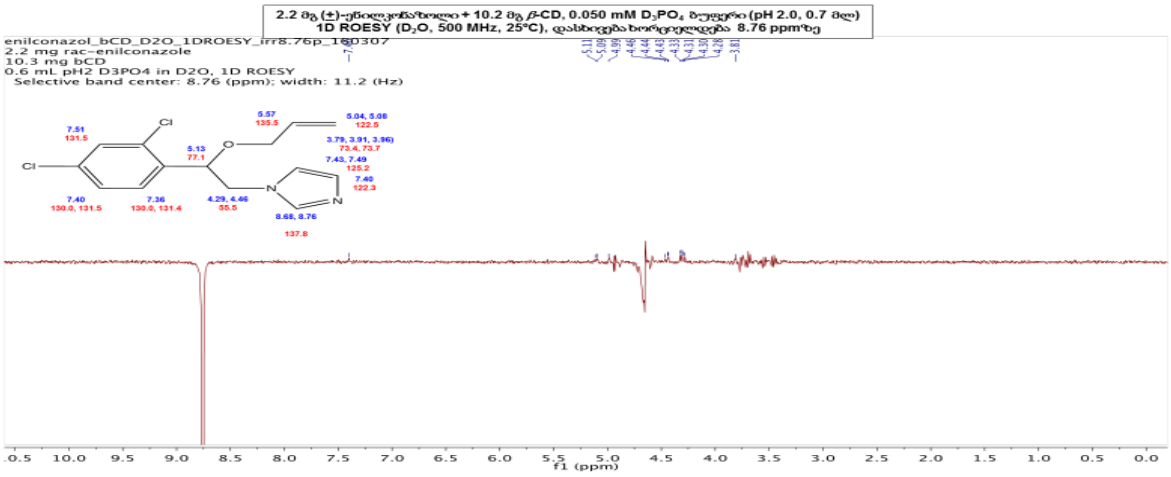


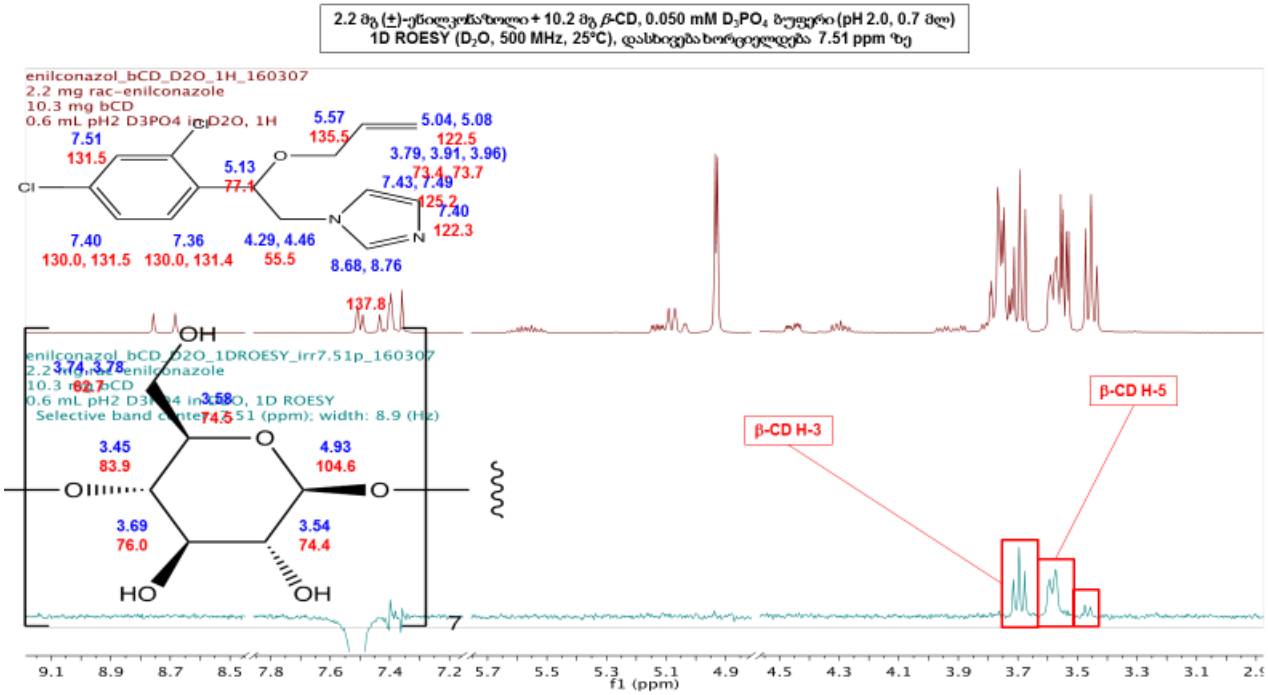
სურ.13 ბირთვულ-მაგნიტურ ექსპერიმენტში მიღებული სიგნალების მიკუთვნება ენილკონაზოლის სტრუქტურაში



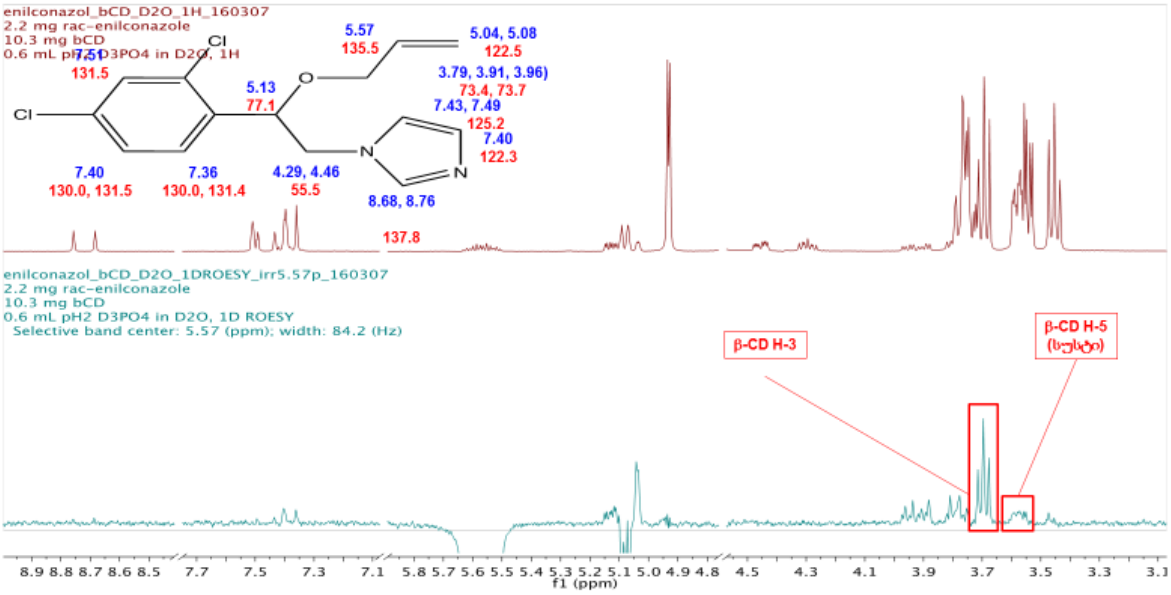
სურ.14 ბირთვულ-მაგნიტურ ექსპერიმენტში მიღებული სიგნალების მიკუთვნება ბეტა ციკლოდექსტრინის სტრუქტურაში სტრუქტურაში

4) ბოლო ეტაპზე მოხდა როეზი ექსპერიმენტის ჩატარება, რომლის დროსაც მოხდა, როგორც ციკლოდექსტრინის ასევე ენილკონაზოლის ყველა პროტონის დასხივება და მის ირგვლივ 3-5 ანქსტრემის დაშორებით მდებარე ყველა პროტონის გამოძახილის დაფიქსირება

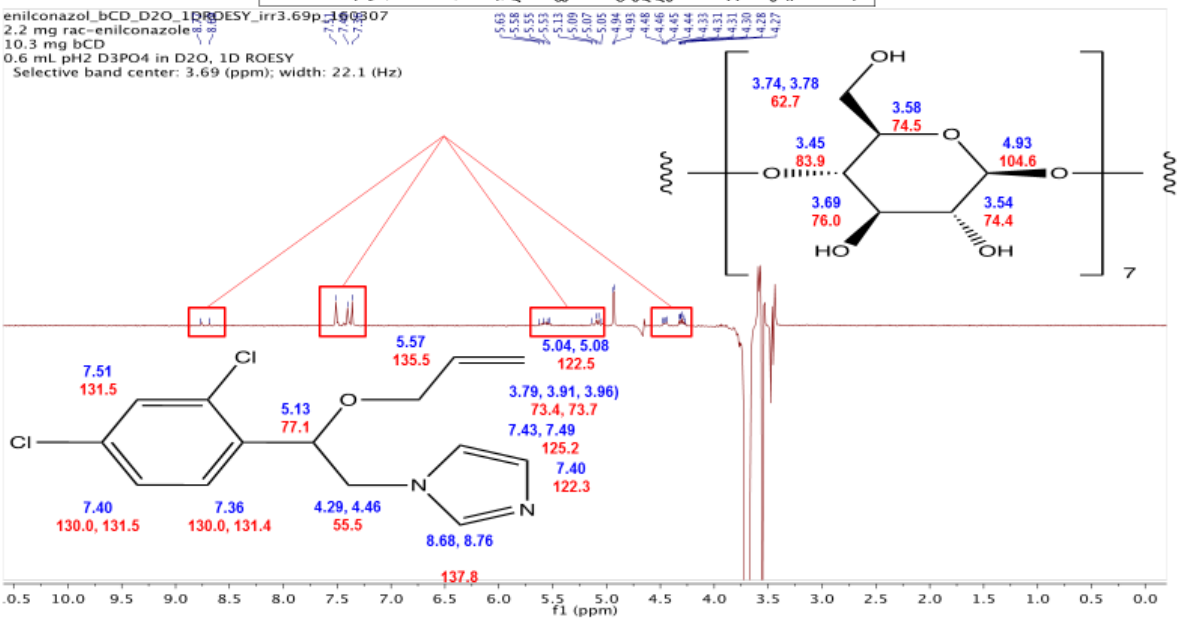


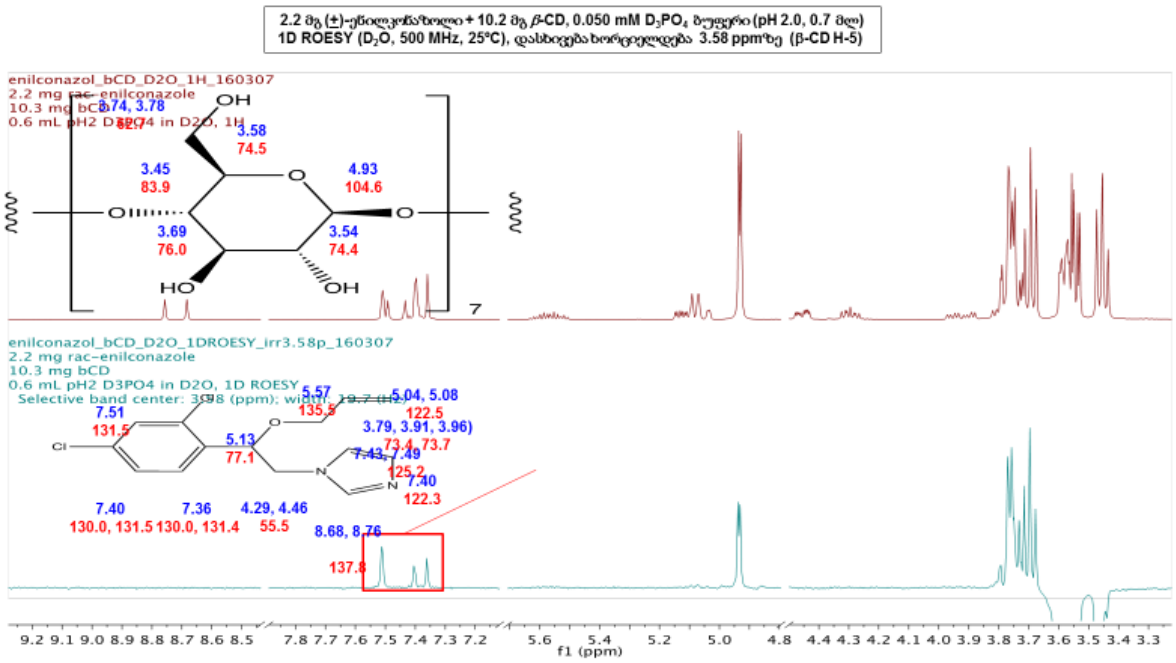


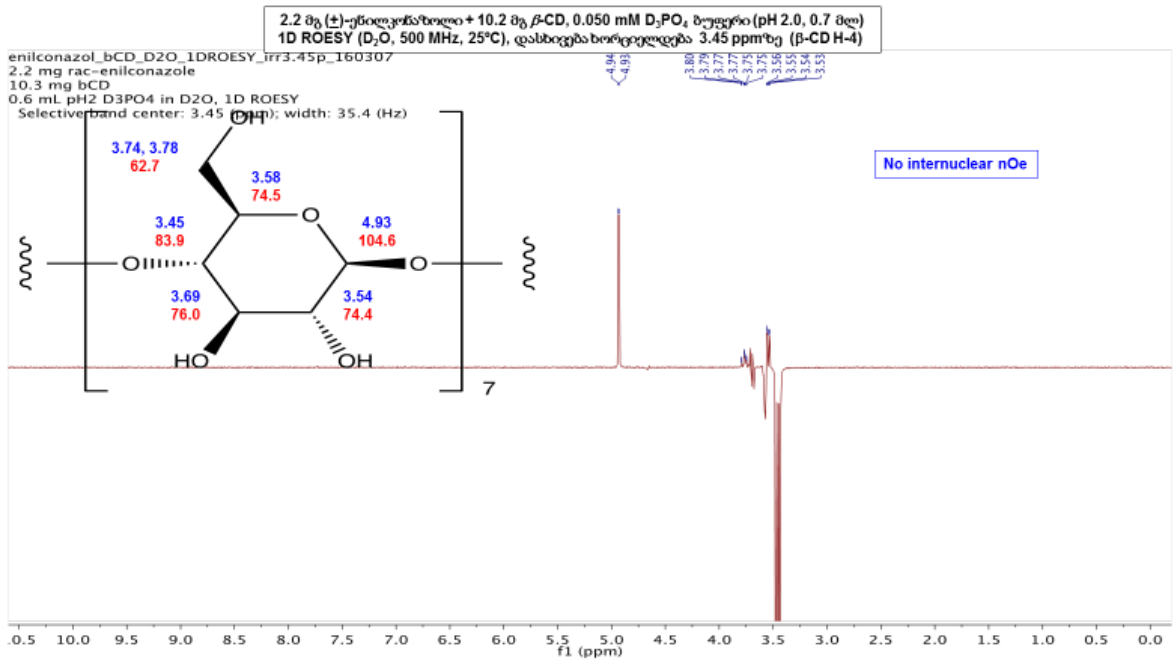
2.2 მგ (±)-ენილკონაზოლი + 10.2 მგ β-CD, 0.050 mM D_3PO_4 ბუფერი (pH 2.0, 0.7 მლ)
1D ROESY (D_2O, 500 MHz, 25°C), დასხივება ხორციელდება 5.57 ppm-ზე ($OCH_2C\underline{H}=CH_2$)



2.2 მგ (±)-ენილკონაზოლი + 10.2 მგ β-CD, 0.050 mM D_3PO_4 ბუფერი (pH 2.0, 0.7 მლ)
1D ROESY (D_2O, 500 MHz, 25°C), დასხივება ხორციელდება 3.69 ppm-ზე (β-CD H-3)

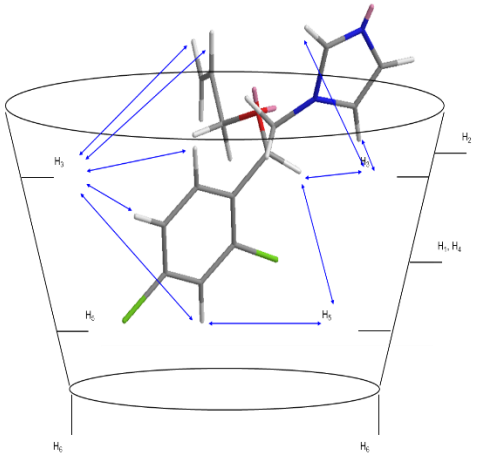






სურ.15 ბირთვულ-მაგნიტური ექსპერიმენტის შედეგად ბეტა ციკლოდექსტრინისა და ენილკონაზოლის ყველა პროტონის დასხივების შედეგად მიღებული ROESY ექსპერიმენტის შედეგები

ბირთვულ-მაგნიტური სპექტროსკოპიის საშუალებით კიდევ უფრო თვალსაჩინო გახდა მიგრაციის რიგის ცვლილების მიზეზები, რადგან როეზი ექსპერიმენტმა გვიჩვენა, რომ ნატივური ბეტა ციკლოდექსტრინის შემთხვევაში ადგილი ქონდა ჩართული კომპლექსის წარმოქმნას, რომლის დროსაც ენილკონაზოლის მოლეკულის ყველაზე პოლარული ნაწილი, ანუ ის ნაწილი რომელშიც არომატულ ბირთვში ჩანაცვლებული იყო ქლორის ორი მოლეკულა, მონაწილეობდა ჩართული კომპლექსის წარმოქმნაში, სწორედ ის წყალბადები, რომლებიც მოლეკულის ამ ნაწილში მდებარეობდნენ გვაძლევდნენ სიგნალს როეზი ექსპერიმენტში ბეტა ციკლოდექსტრინის ღრუში არსებული წყალბადების დასხივებისას, რამაც მოგვცა საშუალება შეგვედგინა მოდელი, რომელიც ასახავს ბეტა ციკლოდექსტრინსა და ენილკონაზოლს შორის წარმოქმნილი ჩართული კომპლექსის სტრუქტურას (სურ.16),



სურ.16 ენილკონაზოლსა და ბეტა ციკლოდექსტრინს შორის წარმოქმნილი კომპლექსის სტრუქტურა.

ხოლო მეთილ-დი-სულფო ბეტა ციკლოდექსტრინსა და ენილკონაზოლს შორის კომპლექსის წარმოქმნა არ დაფიქსირდა, რაც იმას ნიშნავს, რომ დამუხტული ჯგუფით გარე შრის მოდიფიცირებამ გააძლიერა სწორედ გარე შრით ურთიერთქმედება, რომელიც თავის თავში გულისხმობს π-πურთიერთქმედებას, წყალბადურ ბმას, იონურ ურთიერთქმედებასა და ვანდერვაალსური ძალებით ურთიერთქმედებას, რამაც მთლიანად შეცვალა ქირალური გამოცნობის მექანიზმნი და მიგრაციის რიგი კაპილარულ ელექტროფორეზში.

5. დასკვნები

1. ციკლოდექსტრინების მოდიფიცირებამ გამოიწვია დაყოფის გაუმჯობესება კაპილარულ ელექტროფორეზში. [3]

2. მეთილის რადიკალისა და სულფო ჯგუფის ჩანაცვლებამ ბეტა ციკლოდექსტრინში გამოიწვია გამოცნობის მექანიზმის შეცვლა ნატიურ ბეტა ციკლოდექსტრინთან შედარებით.

3. 1D ROESY მეთოდმა ბირთვულ მაგნიტურ რეზონანსში გვიჩვენა, რომ β -CD-ისა და ენილკონაზოლის ენანტიომერებს შორის მოხდა ჩართული კომპლექსის წარმოქმნა, ხოლო HMDS- β -CDსა და ენილკონაზოლის ენანტიომერებს შორის ჩართული კომპლექსის წარმოქმნა არ დაფიქსირდა, რაც გახდა ელექტროფორეზში მიგრაციის რიგირს ცვლილების მიზეზი.

6. გამოყენებული ლიტერატურა

[1] Bezhan Chankvetadze Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis

[2] Chiral Separations Methods and Protocols Edited by G.Gübitz And Martin G. Schmid

[3] Ann Gogolashvili, Elene Tatunashvili, Lali Chankvetadze, Tamas Sohajda, Julianna Szeman, Antonio Salgado, Bezhan Chankvetadze Separation of enilconazole enantiomers in capillary electrophoresis with cyclodextrin-type chiral selectors and investigation of structure of selector-selectand complexes by using nuclear magnetic resonance spectroscopy;

[4] Cari E Sänger – van de Griend, Ylva Hedeland, Curt Pettersson , Capillary Electrophoresis: an Attractive Technique for Chiral Separations, Chromatography May/June, 2013;

[5] Ingelse, B. A. (1997). Chiral separations using capillary electrophoresis Eindhoven: Technische Universiteit, Eindhoven DOI: 10.6100/IR492451

[6] Keeler, pp. 273, 297–299;

[7] Nakanishi, Koji, ed. (1990). One-dimensional and two-dimensional NMR Spectra by Modern Pulse Techniques. Mill Valley, California: University Science Books. p. 136. ISBN 0-935702-63-6.