



არჩილპროპიონის მჟავის ზოგიერთი ქირალური ნივთიერებების ენანტიომერების დაყოფა მალაქოფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიაში პოლისაქარიდული ქირალური სტაციონარული ფაზების და წყალი-ორგანული გამხსნელის ტიპის მოძრავი ფაზების გამოყენებით

რეზიუმე

წინამდებარე გამოკვლევაში აღწერილია პოლისაქარიდზე დაფუძნებული ქირალური სევეტების გამოყენებით ენანტიომერების (მჟავა ბუნების მქონე 4 ქირალური ნივთიერებების) დაყოფა მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის გამოყენებით, 7 პოლისაქარიდულ ქირალურ სევეტზე, წყლიან-ორგანულ მოძრავ ფაზასთან კომბინაციაში „შებრუნებული ფაზის“ მეთოდით. ასევე აღწერილია სტაციონარულ პოლისაქარიდულ სევეტებზე მოძრავი ფაზების ზეგავლენა, რომელსაც ახდენენ ენანტიომერების ელუირების რიგის შებრუნებისას.

1. შესავალი

უკანასკნელ წლებში ფართო მეცნიერული კვლევები მიმდინარეობს ქირალური ნივთიერებების ენანტიომერების დაყოფის, ფიზიკურ-ქიმიური თვისებების, ბიოლოგიური აქტივობის განსხვავებულობის, იდენტიფიცირების მეთოდების შექმნისა და სხვათა შესასწავლად.

აღნიშნული ხასიათის კვლევებით მეცნიერთა დაინტერესებას საფუძვლად უდევს ენანტიომერული იზომერების შესახებ დაგროვილი ექსპერიმენტული მონაცემები, რომლებიც ასახავენ მხოლოდ ცალკეული იზომერებისთვის დამახასიათებელ ბიოლოგიურ აქტივობას. სტერეოიზომერების ცოცხალ ორგანიზმზე ზემოქმედების ხასიათისა და ბუნების განსხვავებულობის, სპეციფიურობის გამო აუცილებელია ინდივიდუალური იზომერების ბიოლოგიური აქტივობის დადგენა.

ადრე ჩატარებულმა კვლევებმა სხვადასხვა საანალიზო ქირალური ნივთიერებების ენანტიომერების დაყოფისას აჩვენეს, რომ სელექტორ-სელექტანტის ურთიერთქმედებაში და პოლისაქარიდების ნაწარმების ენანტიოსელექტიურ გამოც-

დარეჟან ღუღუნოშვილი, მაია ცინცაძე
საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტი
E-mail: darejan-g@hotmail.com

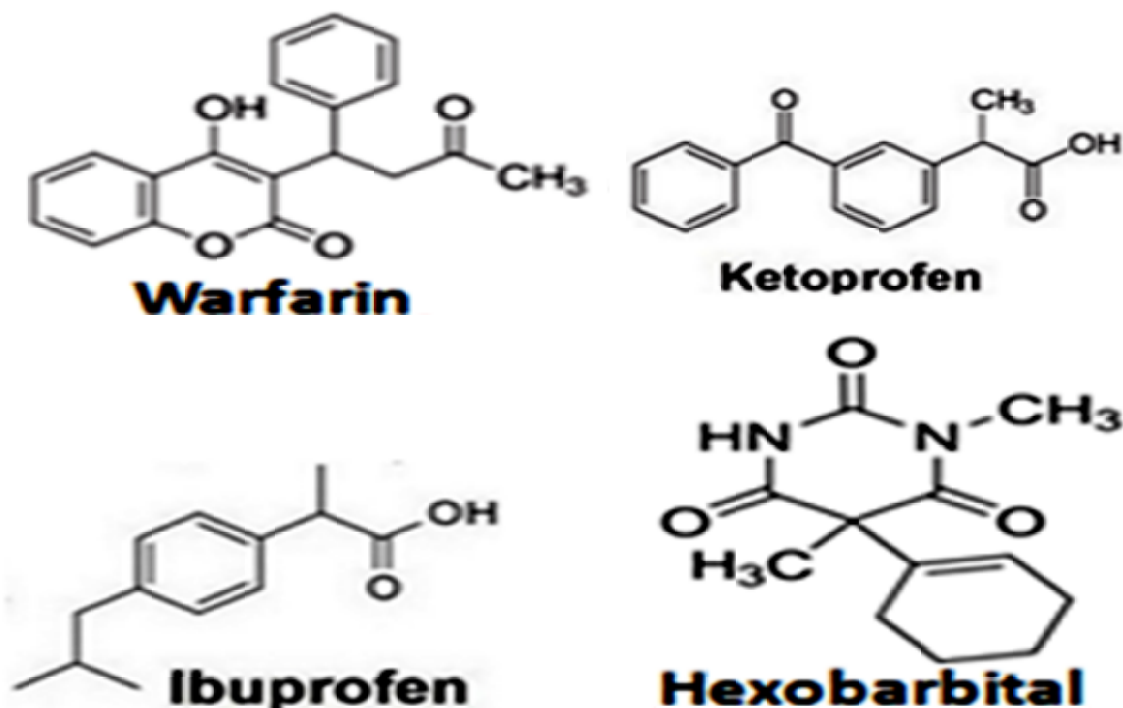
იზა მათარაშვილი
ივ. ჯავახიშვილის სახელობის
თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ნობაში ჩართული სხვადასხვა ტიპის ძალების გამო, ზემოთ აღნიშნული დაყოფის სისტემა შესაძლოა ყოველთვის ისე არ იქცეოდეს, როგორც შებრუნებულ ფაზიანი სისტემა [1-2]. პოლისაქარიდზე დაფუძნებული ქირალური სტაციონარული ფაზები არის ძალიან ეფექტური ენანტიომერების დაყოფისათვის, როგორც სუფთა პოლარულ-ორგანულ მოძრავ ფაზებთან, ასევე წყლიან-ორგანულ მოძრავ ფაზასთან კომბინაციაში [3-10], უპირატესად ბიოანალიზურ კვლევებში.

წყლიანი მოძრავი ფაზის გამოყენებისას წყალბადური ბმა ქირალურ ნივთიერებასა და პოლისაქარიდზე დაფუძნებულ ქირალურ სელექტორებს შორის არის ქირალური გამოცნობის ძირითადი ხელშემწყობი და ეს ურთიერთქმედება შეიძლება შემცირდეს წყლიან გარემოში. პოლისაქარიდების ფენილკარბამიდები შეიცავენ ჰიდროფობურ ადგილებს (დარებს და ღრუებს), თეორიულად წყალბადური ბმის წარმოქმნა ამ მასალებს და ქირალურ ნივთიერებებს შორის შესაძლებელია წყლიან გარემოშიც [3]. საანალიზო ნივთიერების ბუნების და დაყოფის პირობების მიხედვით, პოლისაქარიდებზე დაფუძნებული ქირალური სტაციონარული ფაზა შეიძლება მოიქცეს შებრუნებული ფაზის, ან ჰიდროფილური ურთიერთქმედების სტაციონარული ფაზის მსგავსად. მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიაში, პოლისაქარიდზე დაფუძნებული ქირალური სევეტების გამოყენებით, „შებრუნებული ფაზით“ ენანტიომერების დაყოფა ხდება წყლიან-ორგანულ მოძრავ ფაზასთან კომბინაციაში. პოლისაქა-



სურ. 1. შესწავლილი ქირალური ნაწარმების სტრუქტურული ფორმულები



რიდზე დაფუძნებული ქირალური სტაციონალური ფაზის ორმაგი ქმედების, საანალიზო ნივთიერების შეკავებასა და მისი ენანტიომერების დაყოფაში, წყალბადური ბმის და ჰიდროფობური ურთიერთქმედების როლის დასადგენად, შესწავლილი იქნა 4 ქირალური ნაწარმის დაყოფა პოლარულ-ორგანულ მოძრავი ფაზიდან, წყლიან-ორგანულ ფაზაზე თანმიმდევრული გადასვლის გავლენა სითხურ ქრომატოგრაფიაში.

იბუპროფენი-ქიმიური დასახელება-ალფა-მეთილ-4-(2-მეთილპროპილ) ბენზოლ ძმარმჟავა. ბრუტო ფორმულა: $C_{13}H_{18}O_2$. მიეკუთვნება აასს-პროპიონის მჟავას წარმოებული პრეპარატების ჯგუფს არასტეროიდული ანთების საწინააღმდეგო სამკურნალო საშუალებას, გამოხატული ანალგეზიური ეფექტით.

კეტოპროფენი-ქიმიური დასახელება - 3-ბენზოილ-ალფა-მეთილბენზოლ ძმარმჟავა. ბრუტო ფორმულა: $C_{16}H_{14}O_3$. კეტოპროფენს მიაკუთვნებენ აასს-პროპიონის მჟავას წარმოებული პრეპარატების ჯგუფის არასტეროიდული ანთების საწინააღმდეგო სამკურნალო საშუალება გამოხატული ანალგეზიური ეფექტით.

კვლევებში გამოყენებული ქირალური ნივთიერებები-ვარფარინი, კეტოპროფენი, პექსობარბიტალი, იბუპროფენი (ნახ. 1) შეძენილი იყო კომპანია SigmaAldrich-დან (შტაინზაიმი, გერმანია). ქრომატოგრაფიულად სუფთა მეთანოლი, აცეტონიტრილი და წყალი, ასევე ქიმიურად სუფთა ჭიანჭველმჟავა მოწოდებული იყო კარლ როთის მიერ (კარლსრუე, გერმანია).

კვლევებში გამოყენებული იყო კარლ როთის მიერ (კარლსრუე, გერმანია).

ყველა ექსპერიმენტი ჩატარებულია agilent 1200 HPLC სერიის მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფზე (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), რომელიც აღჭურვილია G1367C HiP ტიპის ავტოსემპლერით, თერმოსტატით, ტუმბოთი და G1367D VWD ტალღის სიგრძის დეტექტორით. ხელსაწყო კონტროლისათვის, მონაცემების მისაღებად და მონაცემების დასამუშავებლად გამოყენებული იყო პროგრამული უზრუნველყოფა. მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიული დაყოფები ჩატარდა 25°C-ზე 1 მლ/წთ მოძრავი ფაზის ნაკადით. მოძრავი ფაზები შეიცავს 0,1% ჭიანჭველმჟავას მოცულობითი თანაფარდობით. ულტრაიისფერი დეტექტორი მუშაობდა 240 ნმ ტალღის სიგრძეზე. ენანტიომერების ოპტიკური ბრუნვის ნიშნები განისაზღვრა პიკურ ექსპერიმენტების საფუძველზე.

ექსპერიმენტში გამოყენებული პოლისაქარიდული ქირალური სვეტები Lux Cellulose-1, Lux Cellulose-2, Lux Cellulose-3, Lux Cellulose-4, Lux Amylose-1, Lux Amylose-2.

Lux Amylose-2, ამილოზა-1 მოწოდებული იყო Phenomenex-ის მიერ (ტორანსი, კალიფორნია, აშშ), ხოლო Cellulose-(3,5-dichlorophenylcarbamate) სილიკატულ კოვალენტური იმობილიზაციით მომზადებული სვეტი მოწოდებული იყო კომპანია Enantioseps-ის მიერ (მიუსტერი, გერმანია). ქირალური სელექტორების სტრუქტურა



სურ. 2. პოლისაქარიდული ქირალური სეგტები და შესაბამისი ქირალური სელექტორები

Cellulose Derivatives, R=		Amylose Derivatives, R=	
Lux-Cellulose-1		Lux Amylose-1	
Lux-Cellulose-2		Lux-Amylose-2	
Lux-Cellulose-3			
Lux-Cellulose-4			
Cellulose-(3,5-dichlorophenylcarbamate			

ნაჩვენებია სურ. 2-ზე. ყველა სეგტი არის 250x4,6 ზომის და შევსებული 5 მიკრომეტრი ნომინალური ზომის მქონე სილიკაგელის ნაწილაკებით.

შედეგები და განსჯა

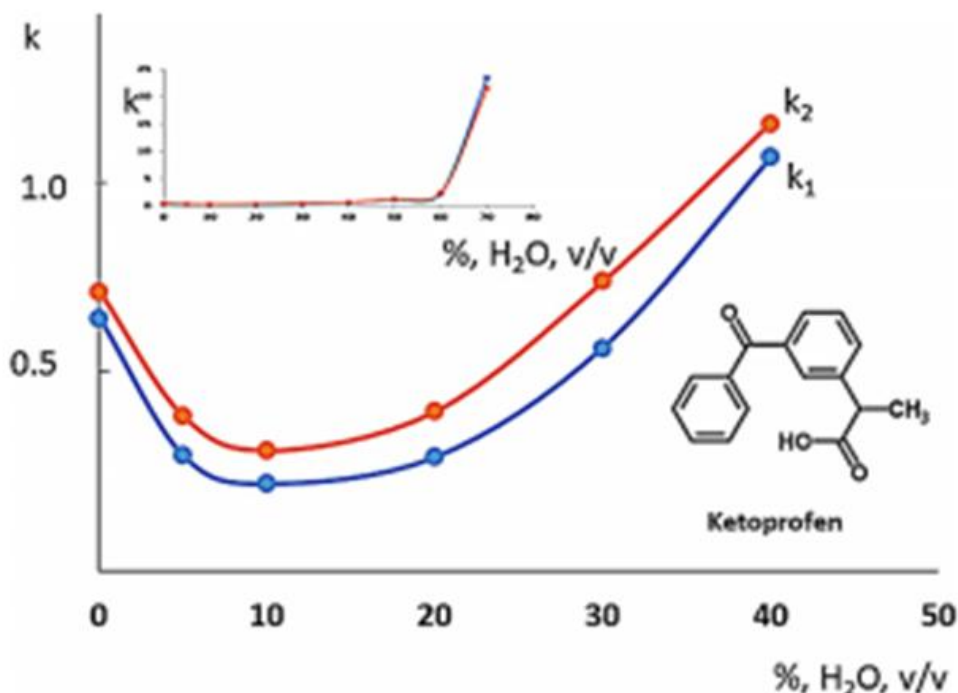
აცეტონიტრილი, როგორც აპროტონული გამხსნელი, ხელს არ უშლის ქირალურ სელექტორებსა და ქირალურ საანალიზო ნივთიერებებს შორის წყალბადური ბმების წარმოქმნას. ამგვარად, როდესაც მოძრავ ფაზად გამოიყენება აცეტონიტრილი, წყალბადური ბმები შეიძლება მნიშვნელოვნად მონაწილეობდეს ქირალურ გამოცნობაში, ხოლო წყალმა, როგორც ძლიერმა კონკურენტმა წყალბადური ბმების წარმოქმნის თვალსაზრისით, უნდა გამოაძევეს საანალიზო ნივთიერება ამ ურთიერთქმედებიდან. აცეტონიტრილზე დაფუძნებული მოძრავ ფაზაში წყლის რაოდენობის გაზრდით, წყლის ამ თვისების გათვალისწინებით, საანალიზო ნიმუშის შეკავების დრო მნიშვნელოვნად მცირდება. მსგავსი შედეგი შეიმჩნევა ამ კვლევაში გამოყენებული ქირალური საანალიზო ნიმუშისა და ქირალური სელექტორის ყველა კომბინაციისთვის. ამ პირობების გათვალისწინებით (აცეტონიტრილში წყლის 20%-მდე შემცველობა) პოლისაქარიდ-

ულ ფენილკარბამატებსა და ესტერის ტიპის ქირალურ სელექტორებს ახასიათებთ არა შებრუნებულ ფაზიანი მოქმედება, არამედ ჰიდროფილური ურთიერთობის ქრომატოგრაფიისთვის დამახასიათებელი ურთიერთქმედება. მსგავსი ქმედება არ არის შემჩნეული მეთანოლის მოძრავ ფაზაზე, სადაც წყლის დამატებით შეკავებაში ზრდა შეიმჩნევა ყველა საანალიზო ნიმუშისა და ქირალური სეგტის კომბინაციებში.

წყალბადურ ბმებზე დაფუძნებული ურთიერთქმედება გვაქვს ძირითადად წყლის დაბალი შემცველობისას აცეტონიტრილში (20%-ზე დაბლა), მაშინ როდესაც ჰიდროფობური ურთიერთქმედება დომინირებს წყლის 20%-ზე მაღალი შემცველობისას. ეს თვისება წარმოდგენილია სურათ 3-ზე, კეტოპროფენის ენანტიომერების დაყოფით Lux Cellulose - 1 სეგტზე. უნდა აღინიშნოს რომ აფინობის ტიპი კეტოპროფენის ენანტიომერებსა და ქირალურ სელექტორს შორის, რომელიც გამოწვეულია წყალბადური ბმებით (პოლარული) და ჰიდროფობური ურთიერთქმედებით, Lux Cellulose-3 დაფუძნებული ქირალური სელექტორის შემთხვევაში ურთიერთ საწინააღმდეგოა. ამის გამო ხდება ენანტიომერების ელუირების რიგის შებრუნება აცეტონიტრილში წყლის შემცველობის გაზრდით.



სურ. 3. კეტოპროფენის ენანტიომერების შეკავების დროის დამოკიდებულება მოძრავ ფაზაში წყლის შემცველობაზე.



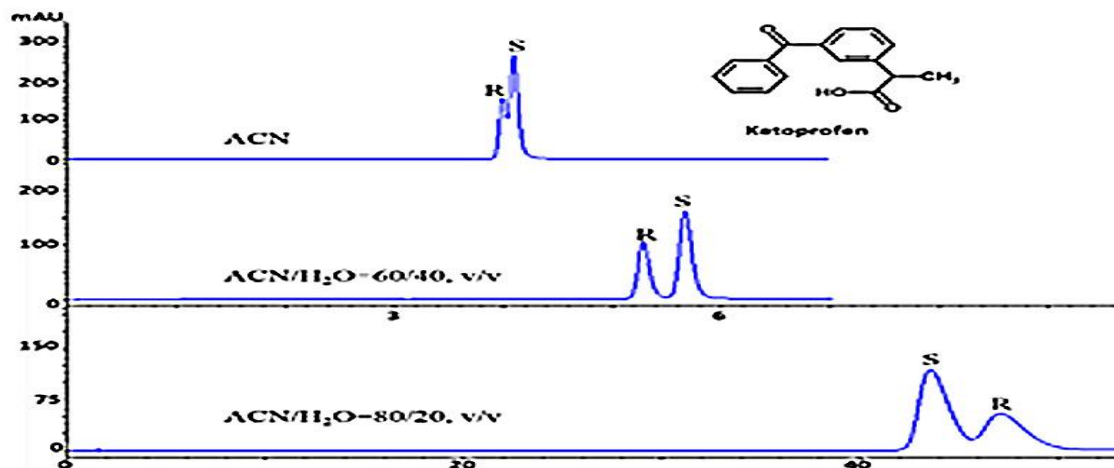
კეტოპროფენის ენანტიომერების ელუირების რიგის ცვლილება სტაციონალური მოძრავი ფაზის შემცველობის ცვლილებით, Lux Amylose-2-ზე დაფუძნებული ამოცნობა არის საპირისპიროდ.

იბუპროფენის ენანტიომერების ელუირების რიგის ცვლილება, მოძრავი ფაზის შემცველობის ცვლილებით, Lux Cellulose-3 სვეტზე. წყალბადური ბმებისა და ჰიდროფობული ურთიერთქმედება ურთიერთ საწინააღმდეგოა ამის გამო ხდება EEO რიგის შებრუნება.

ვარფარინის ენანტიომერების ელუირების რიგის ცვლილება, Lux ცელულოზა-3 სვეტზე $T=5^{\circ}\text{C}$ -ზე, წყალბადური ბმებისა და ჰიდროფობული ურთიერთქმედებებზე დაფუძნებული ამოცნობა არის საპირისპირო.

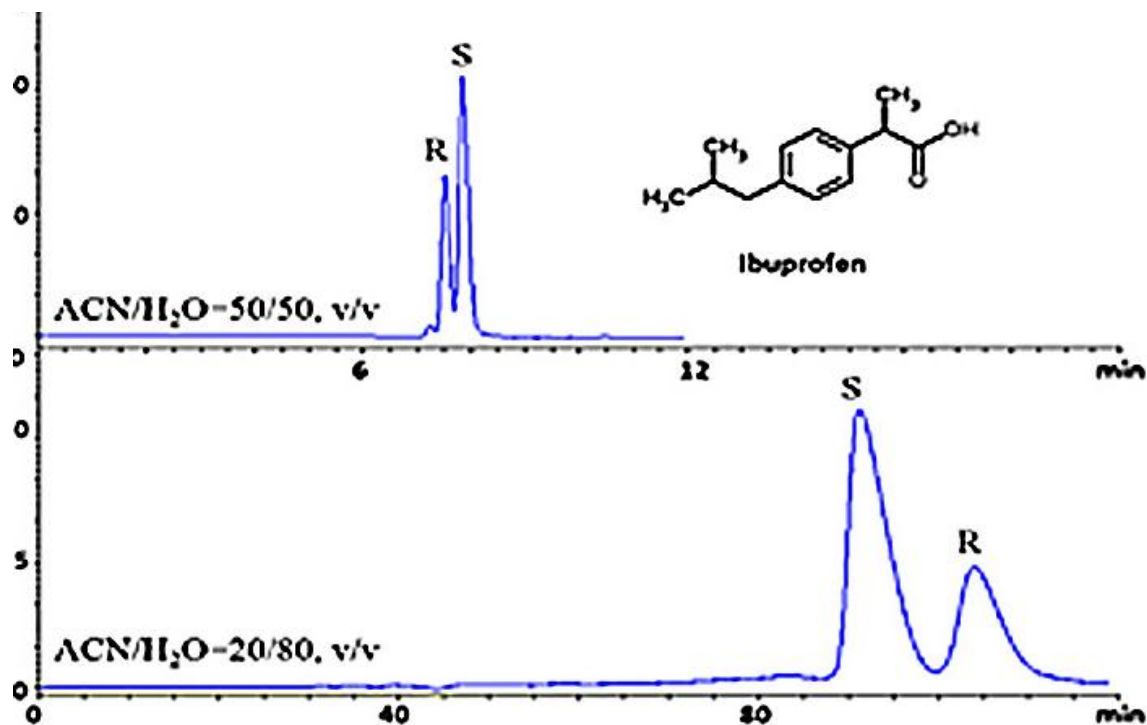
ჰექსობარბიტალის ენანტიომერების ელუირების რიგის ცვლილება, სტაციონალური მოძრავი ფაზის შემცველობის ცვლილებით, ცელულოზა-3 სვეტზე, $T=5^{\circ}\text{C}$ -ზე, წყალბადურ ბმებზე და ჰიდროფობულ ურთიერთქმედებებზე დაფუძნებული ამოცნობა არის საპირისპირო.

სურ. 4. კეტოპროფენის ენანტიომერების დაყოფა Lux Cellulose - 2 მოძრავ ფაზაში წყლის სხვადასხვა შემცველობისა





სურ. 5. იბუპროფენის ენანტიომერების დაყოფა Lux Cellulose - 3 მოძრავ ფაზაში წყლის სხვადასხვა შემცველობისას

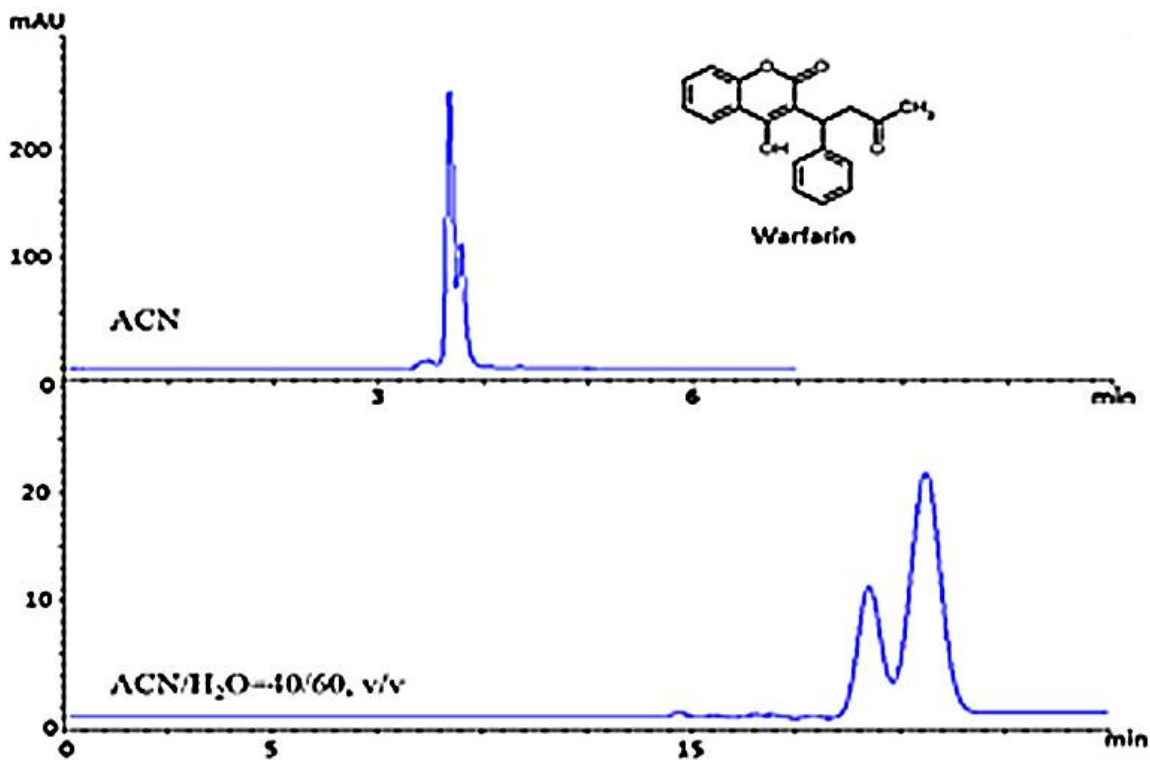


დასკვნა:

1. პოლისაქარიდებზე დაფუძნებული ქირალური სვეტები თხევად-ორგანულ მობილურ ფა-

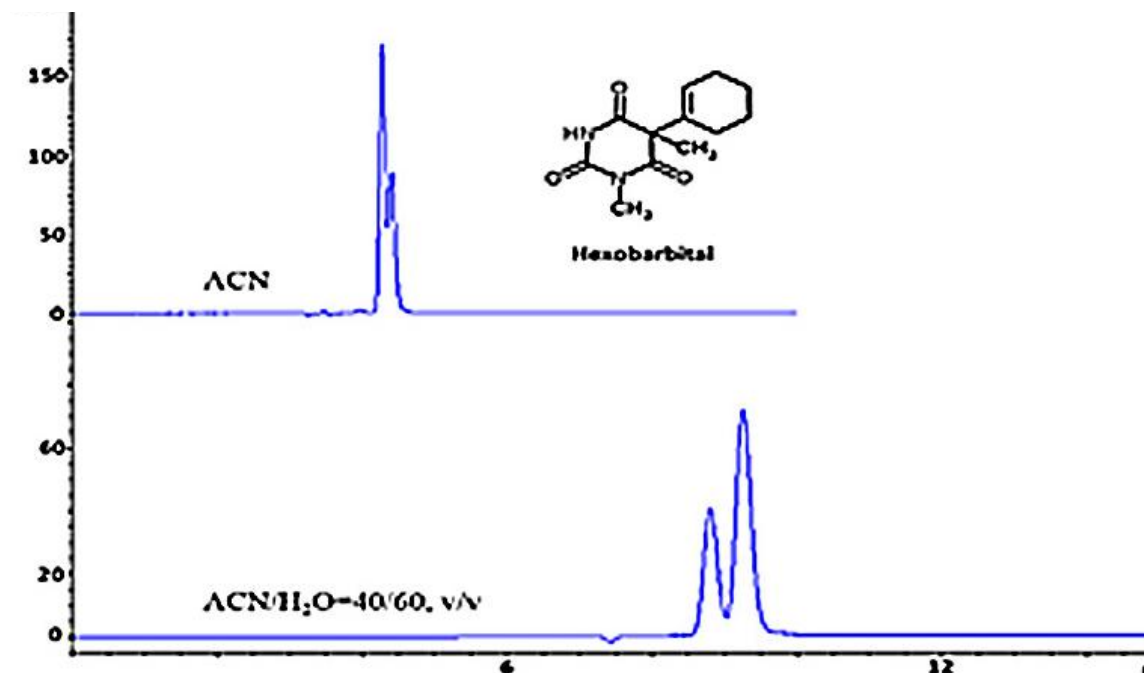
ზასთან ერთად გამოყენებისას, შესაძლოა ყოველთვის არ მოიქცეს ტიპური შებრუნებული-ფაზის სვეტების მსგავსად. განსაკუთრებით აცეტონი-

სურ. 6. ვარფარინის ენანტიომერების დაყოფა Lux Cellulose - 3 მოძრავ ფაზაში წყლის სხვადასხვა შემცველობისას





სურ. 7. ჰექსობარბიტალის ენანტიომერების დაყოფა Lux Cellulose - 3 მოძრავ ფაზაში
წყლის სხვადასხვა შემცველობისა



ტრილში წყლის დაბალი შემცველობისას.

2.EEO შებრუნება დამოკიდებულია მობილურ ფაზაში წყლის შემცველობაზე, ეს ფენომენი უფრო მეტად ვრცელდება აპროტონულ წყლის გამხსნელ სისტემაზე, ვიდრე პროტონულზე.

3. ორგანულ-მობილურ ფაზაში წყლის დამატებისას, მიღებული შედეგების კვლევიტ, შესაძლებელი გახდა, ქირალური ამოცნობის მექანი-

ზმებთან ერთად პოლისაქარიდული ქირალური სელექტორების შესწავლა.

4. მოყვანილი შედეგების საფუძველზე აშკარად იკვეთება, რომ წყალბადურ-ბმებზე და ჰიდროფობურ-ურთიერთქმედებებზე დამყარებული ამოცნობის აფინური მოდელები წინააღმდეგობაში მოდიან იბუპროფენის, ვარფარიინის, ჰექსობარბიტალის და კეტოპროფენის ენანტიომერებთან.

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. G. Hesse, R. Hagel, A complete separation of a racemic mixture by elution chromatography on cellulose triacetate, *Chromatographia* 6 (1973) 277-280.
2. Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada, Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers: Phenylcarbamates of polysaccharides coated on silica gel, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 5357-5359.
3. B. Chankvetadze, Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 26-51.
4. K. Ikeda, T. Hamasaki, H. Kohno, T. Ogawa, T. Matsumoto, J. Sakai, Direct separation of enantiomers by reversed-phase high performance liquid chromatography on cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate), *Chem. Lett.* (1989) 1089-1090.
5. A. Ishikawa, T. Shibata, Cellulosic chiral stationary phase under reversed-phase condition, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 859-878.
6. K. Tachibana, A. Ohnishi, Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 127-154.
7. T. Zhang, D. Nguyen, P. Franco, Reversed-phase screening strategies for liquid chromatography on polysaccharide-derived chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1048-1055.
8. L. Peng, S. Jayapalan, B. Chankvetadze, T. Farkas, Reversed phase chiral HPLC and LC/MS analysis with tris (Chloromethylphenylcarbamate) derivatives of cellulose and amylose as chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6942-6955.



9. J. Shen, Y. Okamoto, Efficient separation of enantiomers using stereoregular chiral polymers, Chem. Rev. 116 (2016) 1094-1138.
10. B. Chankvetadze, C. Yamamoto, Y. Okamoto, Enantioseparation of selected chiral sulfoxides using polysacchride-type chiral stationary phases and polar organic, polar aqueous-organic and normal-phase eluents, J. Chromatogr. A 922 (2001) 127-137.

ARILPROPION ACID ENANTIOMERS SEPARATION BY MEANS OF HPLC ON POLYSACCHARIDE BASED STATIONARY PHASE AND AQUEOUS POLAR ORGANIC MOBILE PHASE

**D. GUGUNISHVILI, M. TSINTSADZE,
I. MATARASHVILI,
Georgian Technical University**

Summary

When polysaccharide-based chiral columns are used in combination with aqueous-organic mobile phases for the separation of enantiomers in high-performance liquid chromatography the separation mode is commonly called “reversed-phase” in analogy to achiral separations. In several earlier and recent studies on neutral and basic chiral analytes it was shown by our and other groups that due to multiple type of interactions involved in selector-selectand binding and enantioselective recognition with polysaccharide derivatives, the above mentioned separation system may not always behave like a reversed-phase system. In the present study additional examples of non-reversed-phase behavior are described for the first time for weak acidic chiral analytes. In addition, the reversal of enantiomer elution order was observed again for the first time for several analytes based on water-content in the mobile phase. All rights reserved.

РАЗДЕЛЕНИЕ ЭНАНТИОМЕРОВ КИСЛОТЫ В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ СРЕДСТВАМИ ИЗ СТАЦИОНАРНЫХ ФАЗ И ОРГАНИЧЕСКИХ МОБИЛЬНЫХ ФАЗ

**ДАРЕДЖАН ГУГУНИШВИЛИ, МАИЯ ЦИНЦАДЗЕ
E-mail: darejan-g@hotmail.com**

Грузинский технический университет

ИЗ МАТАРАШВИЛИ

Тбилисский государственный университет им. И. Джавахишвили

Резюме

В данной работе описано разделение энантиомеров (4-х хиральных веществ с кислотными свойствами) посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением полисахаридов на основе хиральных колонок, 7 полисахаридных хиральных колонок, методом «обращенной фазы». Также описывается влияние движущейся фазы на стационарные полисахаридные колонки при обращении последовательности в ряду элюирования энантиомеров.