

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

საბაკალავრო ნაშრომი

FMOC-ამინომჟავების ენანტიომერების ანალიზი პოლისაქარიდული ქირალური
სელექტორებისა და პოლარულ-ორგანული მოძრავი ფაზების გამოყენებით

გოგოლაშვილი ანა

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

ხელმძღვანელი: ქიმიის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი, საქართველოს
მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის აკადემიკოსი ბეჟან ჭანკვეტაძე

თბილისი

2015

Summary

N-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) α -amino acids are important building blocks for the solid phase synthesis of peptides. After the development of Fmoc/tBu strategy for solid phase peptide syntheses, Fmoc α -amino acids have become the raw materials of choice for the preparation of synthetic peptides. Using this methodology, peptides can be prepared in a few days with high yield using a peptide synthesizer. As the number of amino acids residues increases the final purity and overall yield of the peptide produced is directly affected by the chemical and enantiomeric purity of the protected amino acids used. Currently, for standard protected α -amino acids, the expected enantiomeric purity is > 99% ee and sometimes even > 99.8% ee. This level of precision in measurement of enantiomeric purity can only be achieved by very few analytical techniques, chiral HPLC being one of them. The main advantages of chiral HPLC analysis over other techniques are speed (run less than 20 min), detection level and ease of use. In this study, the separation of the 19 standards Fmoc protected α -amino acids under polar organic separation mode using polysaccharide based chiral stationary phases is reported. As the mobile phase alcohols (methanol and ethanol) and acetonitrile with 0.1% (v/v) additive of formic acid were used. Five different polysaccharide-based chiral columns of Lux series, such as Lux Cellulose-1, Lux Cellulose-2, Lux Cellulose-3, Lux Cellulose-4 and Lux Amylose-2 from Phenomenex (Torrance, CA, USA) were used. The separations were performed using Agilent 1260 HPLC instrument equipped with a binary pump and variable wavelength UV-detector. In alcohols as mobile phases the best results were obtained on Lux Cellulose-1 and Lux Cellulose-4 columns. In particular, the enantiomers of almost all Fmoc-amino acids were separated on these columns. Few examples of enantiomer elution order reversal depending on the chiral selector and the mobile phase were observed.

ანოტაცია

ფლუორენილმეთოქსიკარბონილ-(Fmoc)-ჯგუფით დაცული α -ამინომჟავები წარმოადგენს მნიშვნელოვან სამშენებლო მასალას მყარფაზური სინთეზით ცილების მისაღებად. მას შემდეგ, რაც Fmoc/tBu-ით სინთეზის სტრატეგია იქნა აღმოჩენილი Fmoc-ჯგუფით დაცული α -ამინომჟავები სინთეზური პეპტიდების მიღების საუკეთესო მასალად იქნა აღიარებული. ამ მეთოდის გამოყენებით ცილა შეიძლება დასინთეზდეს რამდენიმე დღეში მაღალი გამოსავლიანობით. რეაქციაში გამოყენებული ამინომჟავების სისუფთავე მნიშვნელოვნად განაპირობებს მიღებული პროდუქტის ქიმიურ და ქირალურ სისუფთავეს. დღეისათვის სარეაქციოდ გამოყენებული ამინომჟავის მინიმალური სისუფთავე > 99% უნდა იყოს, ზოგიერთ შემთხვევაში კი მოთხოვნა არის > 99.8%-ზე უფრო მაღალ სისუფთავეზე. ენანტიომერული

სისუფთავის გაზომვის სიზუსტის ეს დონე მიღწევადია მხოლოდ მცირე რაოდენობის ანალიზური მეთოდებით, ქირალური მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია კი ერთ-ერთი მათგანია. ქირალური მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის გამოყენების ძირითადი უპირატესობებია: ანალიზის მოკლე დრო, აღმოჩენის დაბალი ზღვარი და გამოყენების სიმარტივე. ჩვენს მიერ ჩატარებულ კვლევებში ნაჩვენებია 19 სტანდარტული Fmoc დაცული α -ამინომჟავის ენანტიომერების დაყოფა პოლარულ ორგანულ გამხსნელებში სხვადასხვა ქირალური სტაციონარული ფაზის გამოყენებით. მოძრავ ფაზებად გამოყენებული იყო მეთანოლი, ეთანოლი და აცეტონიტრილი. ხუთი განსხვავებული Lux სერიის ქირალური სვეტი იყო გამოყენებული: Lux Cellulose-1, Lux Cellulose-2, Lux Cellulose-3, Lux Cellulose-4 and Lux Amylose-2, რომლებიც მოწოდებული იყო კომპანია Phenomenex-ის (Torrance, CA, USA) მიერ. დაყოფები ჩატარებულ იქნა Agilent 1260 HPLC სისტემის გამოყენებით, რომელიც შედგებოდა ბინარული ტუმბოსაგან და უი დეტექტორისაგან. სპირტების გამოყენების შემთხვევაში საუკეთესო შედეგები მიღებულ იქნა Lux Cellulose-1 სვეტზე, ფაქტობრივად ყველა ტესტ Fmoc-ამინომჟავა დაიყო ამ სვეტის გამოყენებით. უძრავი და მოძრავი ფაზების ცვლილების შედეგად ენანტიომერების მიგრაციის რიგის ცვლილების რამდენიმე შემთხვევა იქნა აღმოჩენილი.

შინაარსი

ანოტაცია	2
შინაარსი.....	4
1. შესავალი	5
2. ლიტერატურული ნაწილი	
2.1 ქირალური დაყოფის აქტუალურობა.....	6
2.2 ქირალური სტაციონარული ფაზები	7
2.3 სითხური ქრომატოგრაფია	9
2.4 ქრომატოგრაფიული პარამეტრები.....	10
3. ექსპერიმენტული ნაწილი	
3.1 მასალები და რეაგენტები.....	14
3.2 გამოყენებული ხელსაწყო	14
3.3 ელუენტები.....	14
3.4 ანალიზის პირობები	14
3.5 გამოყენებული ქირალური სტაციონარული ფაზები.....	16
3.6 საკვლევი FMOC-ამინომჟავები.....	16
4. შედეგები და განსჯა	16
5. დასკვნები	30
6. გამოყენებული ლიტერატურა	31

1. შესავალი

ამინომჟავები წარმოადგენს ცოცხალი ორგანიზმის ძირითად სამშენებლო მასალას, რადგან ისინი წარმოადგენს ცილის მონომერებს, ხოლო პოლიმერული ნაერთი ცილა ასრულებს თითქმის ყველა ძირითად ფუნქციას ცოცხალ ორგანიზმში.

N-დაცული ამინომჟავები ფართოდ გამოიყენება, როგორც მნიშვნელოვანი ქირალური სამშენებლო მასალა ფარმაცევტულ ქიმიაში და ბიოქიმიაში. ფტოროენილმეთოქსიკარბონილ-FMOC-ჯგუფის, როგორც α -ამინომჟავების დამცავი ჯგუფის ძირითად დადებით მხარედ ითვლება მაღალმგრძობიარობა ფლუორესცენტული დეტექტორების გამოყენებისას. FMOC დამცავი ჯგუფი განსაკუთრებით საინტერესოა, რადგან ის ხშირად გამოიყენება როგორც დამცავი ჯგუფი მყარფაზურ სინთეზსა და კომბინატორულ ქიმიაში.

ძალიან მნიშვნელოვანია რომ საწყისი პროდუქტი აღებულ იქნას ენანტიომერულად სუფთა სახით. სწორედ ამან გამოიწვია დიდი ინტერესი რათა დამუშავებულ იქნას დაყოფის ახალი, ოპტიმალური მეთოდები FMOC-ამინომჟავების ენანტიომერების დასაყოფად.

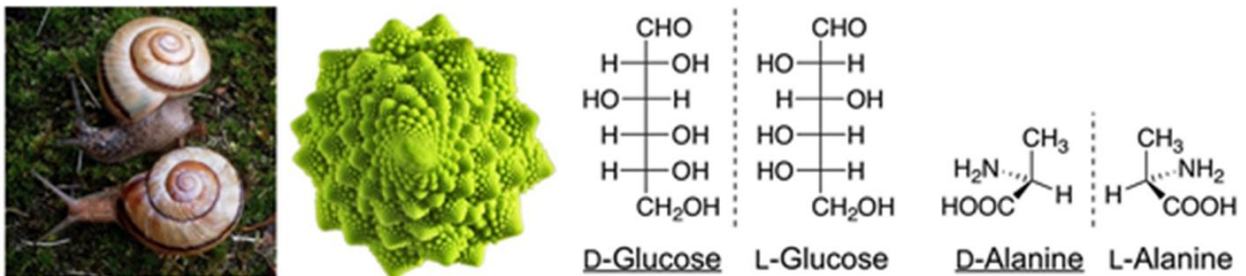
ჩვენს მიერ შესწავლილ იქნა FMOC-ამინომჟავების ენანტიომერების დაყოფა ახალი ქირალური სტაციონარული ფაზების და სუფთა ორგანული გამხსნელების გამოყენებით. დადგენილ იქნა ცალკეული უძრავი და მოძრავი ფაზის წყვილისათვის ენანტიომერების ელუირების რიგი, შესწავლილ იქნა დაყოფის პარამეტრებზე ტემპერატურის გავლენა.

ლიტერატურული მიმოხილვა

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 განსხვავებული ჩამნაცვლების მქონე ნახშირბადატომი, თუმცა არსებობს სხვა ატომებით ან ქირალობის სხვა ელემენტებით (ღერძი, სიბრტყე) განპირობებული ქირალობის შემთხვევებიც.

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



სურ. 1 ჰომოქირალობის მაგალითები ცოცხალ ორგანიზმებში

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

FMOC-L-ამინომჟავები პირველად მოხსენიებულ იქნა კაპრინოს მიერ 1970 წელს [4]. FMOC ჯგუფის ამინომჟავებისგან პეპტიდების სინთეზი საკმაოდ რბილ პირობებში არის შესაძლებელი, ხოლო შემდეგ FMOC ჯგუფის მოცილება შესაძლებელია პიპერიდინის გამოყენებით, რომელიც აშორებს რა FMOC ჯგუფის პეპტიდს, ურთიერთქმედებს დაუცველ ბიოპროდუქტთან და იცავს მას შემდგომი არასასურველი რეაგირებისაგან. სინთეზური ფტოროპეპტიდები ფარმაკოლოგიურად ფართოდ გამოყენებადი ნაერთებია, რადგან ისინი შესაძლებელია გამოყენებულ იქნას, როგორც მაღალი სელექტიურობის მქონე ანტიგენები. ფტოროპეპტიდებზე სწრაფად რეაგირებს იმუნური სისტემა არ წარმოიქმნება ე.წ. ადუვანტები, რომლებიც შესაძლებელია ტოქსიური იყოს ადამიანის ორგანიზმისათვის.

სწორედ ზემოთ აღნიშნულის გამო დიდი მნიშვნელობა ენიჭება ანალიზური მეოდების დამუშავებას, რომელიც საშუალებას მოგვცემს დავადგინოთ სინთეზირებული ამინომჟავების ენანტიომერული სისუფთავე და გარდა ამისა დამუშავდეს ახალი მეთოდები, რომლებიც ქირალური ამინომჟავებიდან ენანტიომერულად სუფთა სახის ამინომჟავის მიღების საშუალებას იძლევა.

2.2 ქირალური სტაციონარული ფაზები

სტერეოქიმიაში ქირალური დაყოფა ეწოდება რაცემული ნარევის ენანტიომერებად დაყოფის პროცესს [5]. ქირალური დაყოფა არის ძალიან მნიშვნელოვანი ქირალური ნივთიერებების ენანტიომერულად გამდიდრებული ან ენანტიომერულად სუფთა სახით მისაღებად.

ენანტიომერების დაყოფა წლების მანძილზე ურთულეს პრობლემად რჩებოდა. მხოლოდ გასული საუკუნის 60-იანი წლებიდან მოხერხდა ენანტიომერების პირველი ინსტრუმენტული დაყოფა გაზური ქრომატოგრაფიის მეთოდის გამოყენებით, ხოლო 70-იანი წლებიდან უკვე დაიწყო სითხური ქრომატოგრაფიის მეთოდების გამოყენება.

სხვა მეთოდებისგან განსხვავებით, სითხური ქრომატოგრაფია გვთავაზობს მეტ სიმარტივეს, სისწრაფეს, აღმოჩენის დაბალ ზღვრებს და მეთოდის სიზუსტეს, ასევე არსებობს ქირალური სტაციონარული ფაზების ფართო არჩევანი. გამოქვეყნებულია ბევრი შრომები სითხური ქრომატოგრაფიის გამოყენების შესახებ ქირალურ ანალიზში, შემოთავაზებულია ბევრი სტანდარტული მეთოდი, განსაკუთრებით, სუფთა რაცემატების ანალიზისთვის, თუმცა, მიუხედავად ამისა, მაინც რთულია ისეთი

ქირალური სტაციონალური ფაზების შერჩევა, რომელიც გამოსადეგი იქნება ქირალურ ნივთიერებათა ფართო სპექტრისათვის.

ფარმაცევტულ მრეწველობაში ბოლო წლებში ქირალური სამკურნალო საშუალებების სუფთა ენანტიომერული სახით გაყიდვის მაჩვენებელი გაიზარდა 27%-დან (U.S. \$74.4 billion)

1996 წელს, 29 %-მდე 1997 წელს, 30 %-მდე 1998 წელს, 32 %-მდე 1999 წელს, 34 %-მდე 2000 წელს, 38 %-მდე 2001 წელს და მან უკვე მიაღწია 39 %-ს (U.S. \$151.9 billion) 2002 წელში [6].

გარდა აღნიშნულისა 9 დასახელება მსოფლიოში ყველაზე გაყიდვადი 10 წამლიდან 2003- 2004 წლებში იყო ქირალური სამკურნალო საშუალება და მათგან მხოლოდ ნახევრის შეძენა იყო შესაძლებელი ენანტიომერულად სუფთა სახით. უკანასკნელი ორი ათეული წლის განმავლობაში ენანტიომერების დაყოფის მიმართულებით ფართო გამოყენება ჰპოვა ქრომატოგრაფიამ, როგორებიც არის: გაზური ქრომატოგრაფია, მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია, ზეკრიტიკული სითხეების ქრომატოგრაფია და ასევე კაპილარულმა ელექტროქრომატოგრაფიამ. ენანტიომერების პირდაპირი დაყოფა ქირალური სტაციონარული ფაზების გამოყენებით აღიარებულ იქნა როგორც საუკეთესო მეთოდი, როგორც ანალიზური ასევე საწარმო მასშტაბებით ენანტიომერულად სუფთა ქირალური ნივთიერებების მისაღებად [7].

წლების მანძილზე დიდი რაოდენობით ქირალური სტაციონარული ფაზები იქნა დასინთეზებული და გამოკვლეული, როგორებიც არის პროტეინები, ოლიგოსაქარიდები, პოლისაქარიდების ნაწარმები [8], ანტისხეულები, ხელატური სინთეზური პოლიმერები და ა.შ.. მათ შორის პოლისაქარიდული ქირალური სტაციონარული ფაზების გამოყენებით 500 სხვადასხვა ბუნების ტესტ რაცემატიდან შესაძლებელია 80%-ის დაყოფა, ხოლო საწარმო მასშტაბებით ქირალური სამკურნალო საშუალებების სუფთა ენანტიომერების 70%-ის მიღება სწორედ პოლისაქარიდული ქირალური სტაციონარული ფაზების გამოყენებით ხდება.

ქირალურ პოლიმერების ურთიერთქმედების ზუსტი მექანიზმების ახსნა რაცემული ნაერთის ცალკეულ ენანტიომერთან წარმოადგენს ძალიან რთულ ამოცანას იმის გამო, რომ ადგილი აქვს ბევრ სხვადასხვა ტიპის ურთიერთქმედებას სელექტორსა და სელექტანდს შორის. მრავალრიცხოვანი ქრომატოგრაფიული [10], კომპიუტერული მოდელირების [11] და სპექტროსკოპული [12] მეთოდების გამოყენებით ახსნილ იქნა, რომ ცელულოზას და ამილოზას ფენილკარბამატების ნაწარმების მაღალი ქირალური გამოცნობის უნარი ძირითადად აიხსნება ამ პოლიმერების სპირალური სტრუქტურებით.

ითველება რომ $3x$ და $4n$ არის $3/2$ და $4/3$ ბიჯის მქონე სპრალური აღნაგობის პოლიმერები, შესაბამისად. გლუკოზის ნაშთები მოწესრიგებულად (რეგულარულად) არის გნალაგებული სპირალის ღერძის გასწვრივ და მთავარ ჯაჭვის გასწვრივ არსებობს პოლარული კარბამატის ჯგუფით გარშემორტყმული ქირალური ღრუები. პოლარული კარბამატის ჯგუფი უმეტესად მოქცეულია შიგნითა მხარეს, მაშინ როდესაც ჰიდროფობური არომატული ჯგუფი მდებარეობს პოლიმერული ჯაჭვის გარეთ. სავარაუდოა, რომ ასეთი მოწესრიგებული სტრუქტურა ამილოზას ნაწარმებისთვის საკმაოდ დაბალ პოლიმერიზაციის ხარისხის დროს მიიღწევა, მაშინ როდესაც ცელულოზას ნაწარმებისთვის უფრო მაღალი პოლიმერიზაციის ხარისხის დროს არის შესაძლებელი [13]. პოლისაქარიდის ფენილკარბამატის კარბამატის ჯგუფი სავარაუდოა, რომ რაცემატთან ურთიერთქმედებს წყალბადური ბმების წარმოქმნით $NH = C$ და O , და დიპოლ-დიპოლური ურთიერთქმედებით $C = O$. ქირალურ გამოცნობაში ასევე შესაძლებელია დიდი როლი ითამაშოს $\Pi-\pi$ ურთიერთქმედებამ ფენილკარბამატის ფენილის ჯგუფსა და რაცემატის არომატულ ჯგუფებს შორის.

3.7 სითხური ქრომატოგრაფია

ქრომატოგრაფია წარმოადგენს ნარევების ცალკეულ კომპონენტებად დაყოფის მეთოდს, რომელიც დაფუძნებულია კომპონენტების განსხვავებულ განაწილებაზე ორ ერთმანეთთან შეურევად ფაზას შორის. ერთ-ერთი ამ ფაზებიდან უძრავია, ხოლო მეორე მოძრავი. უძრავ ფაზას უწოდებენ სტაციონარულ ფაზას. ნიმუშის კომპონენტები მოძრაობენ ქრომატოგრაფიულ სისტემაში მხოლოდ მაშინ, როდესაც ისინი არიან მოძრავ ფაზაში. მოძრაობის სწორხაზოვანი სიჩქარე წარმოადგენს ორ ფაზაში ამ წონასწორული განაწილების ფუნქციას. კომპონენტები, რომლებიც ძირითადად განაწილებულნი არიან სტაციონარულ ფაზაში, მოძრაობენ უფრო ნელა, ვიდრე კომპონენტები, რომლებიც ძირითადად განაწილებულნი არიან მოძრავ ფაზაში. ამგვარად დაყოფა გამოწვეულია მათი მოძრაობის სწორხაზოვან სიჩქარეებს შორის სხვაობით, რაც გამოწვეულია მათ წონასწორულ განაწილებათა შორის სხვაობით.

მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია (მესქ) გამოიყენება ორგანული და არაორგანული ნივთიერებების დაყოფისა და რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის სხვადასხვა ნარევებში. რაოდენობრივი გაანგარიშებისათვის გამოიყენება, როგორც შინაგანი ასევე გარეგანი სტანდარტები. მესქ-ს გამოყენება ძირითადად შემდეგი ტიპის ანალიზებისთვის:

1. ფარმაცევტულ საშუალებებში მოქმედი ნივთიერების და მინარევების განსაზღვრა;
2. ენანტიომერების დაყოფა;

3. კვების პროდუქტებში, ჩამდინარე და სასმელ წყლებში პესტიციდების რაოდენობრივი განსაზღვრა;
4. ამინომჟავების განსაზღვრა;
5. კვების პროდუქტებში ნარჩენი ანტიბიოტიკების, აფლატოქსინების და სხვა ტოქსიური ნივთიერებების განსაზღვრა;
6. კვების პროდუქტებში სტაბილიზატორების, არომატიზატორების, ემულგატორების, ვიტამინების და ა.შ. სხვა საკვებდანამატების რაოდენობრივი განსაზღვრა;
7. ბიოლოგიურ მატრიცებში სამკურნალო საშუალებების და მათი მეტაბოლიტების, ნარკოტიკული საშუალებების და მათი მეტაბოლიტების, ტოქსიური ნივთიერებების და მათი მეტაბოლიტების განსაზღვრა.

მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფის ხელსაწყო შემდეგი ძირითადი ბლოკებისაგან შედგება:

1. გამხსნელების შემრჩევი სისტემა;
2. დეგაზატორი;
3. ტუმბო;
4. ნიმუშების ინჟექტორი (ავტომატური ან მანუალური);
5. სვეტების თერმოსტატი;
6. დეტექტორი;
7. მონაცემთა დამუშავები მოწყობილობა (კომპიუტერი).



სურ. 2 მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფი

2.4 ქრომატოგრაფიული პარამეტრები

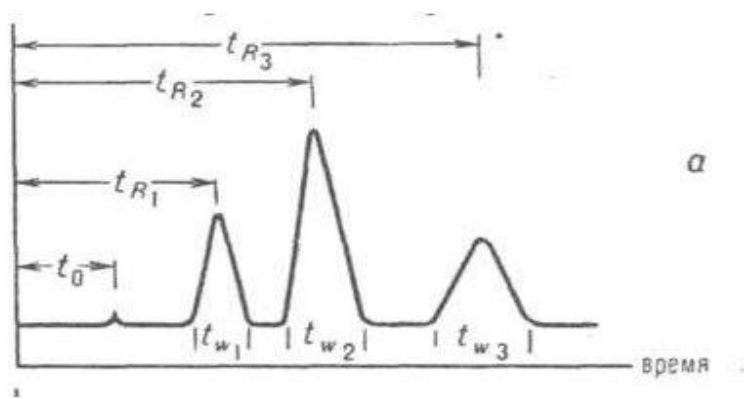
ქრომატოგრაფიული დაყოფის მახასიათებელი პარამეტრები არის:

- შეკავების ფაქტორი
- სელექტიურობა
- ეფექტურობა
- გარჩევითობა
- პიკის სიმეტრია

შეკავების ფაქტორი k გამოითვლება ფორმულით:

$$k_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

t_R და t_M იზომება ქრომატოგრამიდან. t_R არის შეკავების დრო მოცემული ნივთიერებისათვის, ხოლო t_M მკვდარი მოცულობის შეკავების დრო, ანუ დრო, როდესაც ნიმუში ელუირდება ელუენტთან ერთად.

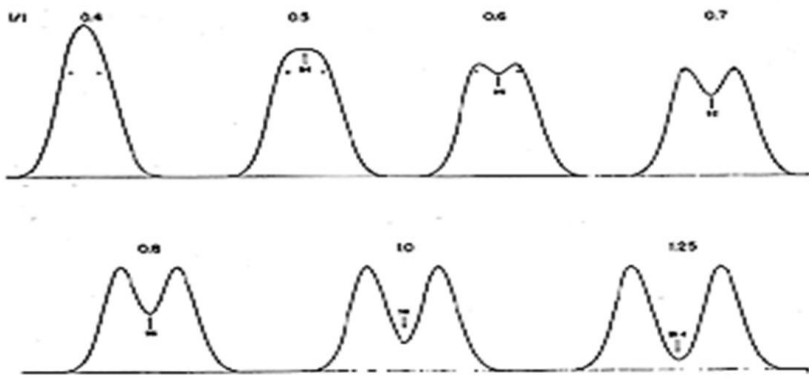


სელექტიურობა (α), არის დაყოფის ხარისხის რაოდენობრივი მახასიათებელი და წარმოადგენს ორი ნიმუშის შეკავების ფაქტორთა ფარდობას:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (2)$$

α დამოკიდებულია მხოლოდ საანალიზო კომპონენტების ბუნებაზე, ელუენტის ტიპზე, მის შემადგენლობაზე, ტემპერატურაზე და ადსორბენტის ბუნებაზე, მისი ზედაპირის ქიმიაზე.

სვეტის ეფექტურობა ხასიათდება თეორიული თეფშების რიცხვით N



$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

t_R მოცემული ნიშის შეკავების დროა, ხოლო W - პიკის სიგანე.

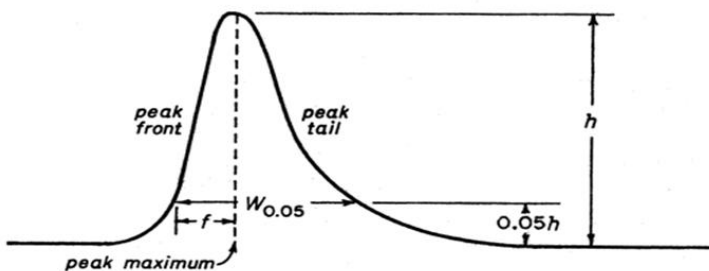
გარჩევითობა (R_s) წარმოადგენს ტევადობის ფაქტორის, სელექტიურობის და სვეტის ეფექტურობის გაერთიანებულ გამოსახულებას

$$R_s = \frac{(t_2 - t_1)}{0.5(W_1 + W_2)} \quad (4)$$

t_1 და t_2 - პირველი და მეორე ნიმუშის შეკავების დროებია, ხოლო W_1 და W_2 პირველი და მეორე ნიმუშის პიკის სიგანეები.

პიკის სიმეტრია:

$$A_s = W_{0.05} / 2f$$



როგორც ზემოთ აღნიშნულიდან ჩანს, ქრომატოგრაფიული ანალიზის მეთოდის დამუშავების პროცესში აუცილებელია სელექტიურობის და ეფექტურობის გაზრდის გზით გარჩევითობის მაქსიმალურად მაღალი (ცალკეულ შემთხვევაში ოპტიმალური) მნიშვნელობის მიღწევა.

ქრომატოგრაფიული გარჩევითობის გაზრდა შესაძლებელია მეთოდის ოპტიმიზაციის პროცესში შემდეგი ცვლილებების შეტანით :

- გამოვიყენოთ უფრო გრძელი სვეტები
- შევამციროთ სვეტის დიამეტრი
- მოვახდინოთ ელუენტის ნაკადის ოპტიმიზაცია
- გამოვიყენოთ უფრო მცირე ზომის ნაწილაკებით შევსებული ქრომატოგრაფიული სვეტი
- შევამციროთ ინიცირებული ნიმუშის მოცულობა
- შევცვალოთ უძრავი ფაზა
- სწორად შევარჩიოთ მოძრავი ფაზის შედგენილობა
- გამოვიყენოთ გრადიენტული ელუირება [14].

3. ექსპერიმენტული ნაწილი

3.1 მასალები და რეაგენტები

ყველა გამხსნელი და რეაგენტი გამოყენებული იყო ანალიზური ან ქრომატოგრაფიული სისუფთავის. მეთანოლი, აცეტონიტრილი, ეთანოლი, იზოპროპანოლი და ჭიანჭველმჟაა შეძენილი იყო კომპანია Carl Roth-დან, კარლსრუე, გერმანია. 19 FMOC ამინომჟავის D და L ენანტიომერები მოწოდებული იყო კომპანია Bachem-ის მიერ, შვეიცარია.

ცელულოზას საფუძველზე მომზადებული ქრომატოგრაფიული სვეტები ლაბორატორიას საჩუქრად გადმოეცა კომპანია Sepaserve-ს (გერმანია) და კომპანია Phenomenex-ის (აშშ) მიერ.

ექსპერიმენტისათვის მომზადებულ იქნა FMOC-ამინომჟავების ენანტიომერულად მონიშნული ნარეგების ხსნარები მეთანოლში, კონცენტრაციით 1/0,5 მგ/მლ, სადაც D ენანტიომერის რაოდენობა L-ენანტიომერთან ისე შეესაბამებოდა ერთმანეთს, როგორც 2/1-ს.

3.2 გამოყენებული ხელსაწყო

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

ქრომატოგრაფიული ანალიზი ჩატარებულ იქნა Agilent 1260 მაღალეფექტური ქრომატოგრაფის გამოყენებით (Agilent, აშშ) რომელიც შედგებოდა ოთხარხიანი ტუმბოს (ინტეგრირებული დეგაზატორით), ავტოსემპლერის, სვეტების თერმოსტატისა და ულტრაისფერი დეტექტორისაგან. ხელსაწყოს ოპერირება და მონაცემთა შენახვა-დამუშავება ხდებოდა პროგრამული უზრუნველყოფით ChemStation B.04.01

3.3. ელუენტები

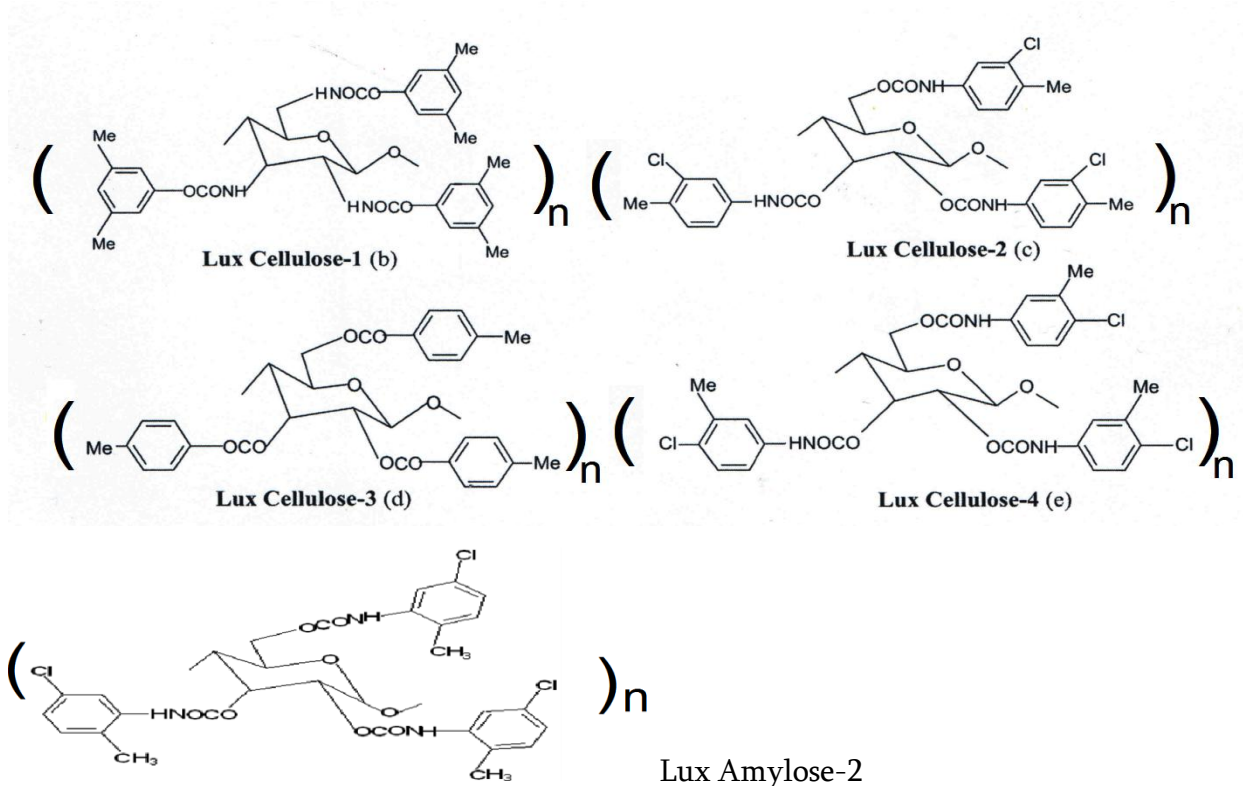
ელუენტებად გამოყენებული იყო მეთანოლი, აცეტონიტრილი, ეთანოლი და იზოპროპანოლი 0,1% ჭიანჭველაჟავას დანამატით.

3.4. ანალიზის პირობები

ელუენტის ნაკადი იყო 1 მლ/წთ, შესწავლილ იქნა სტანდარტული ანალიზური სვეტის ზომის სვეტები: 250 მმX 4,6მმ, დეტექტირება ხდებოდა 220 ნმ ტალღის სიგრძეზე. ინიცირებული ნიმუშის მოცულობა იყო 1მკლ. ანალიზები ტარდებოდა ორ ტემპერატურაზე 20°C და 60°C -ზე.

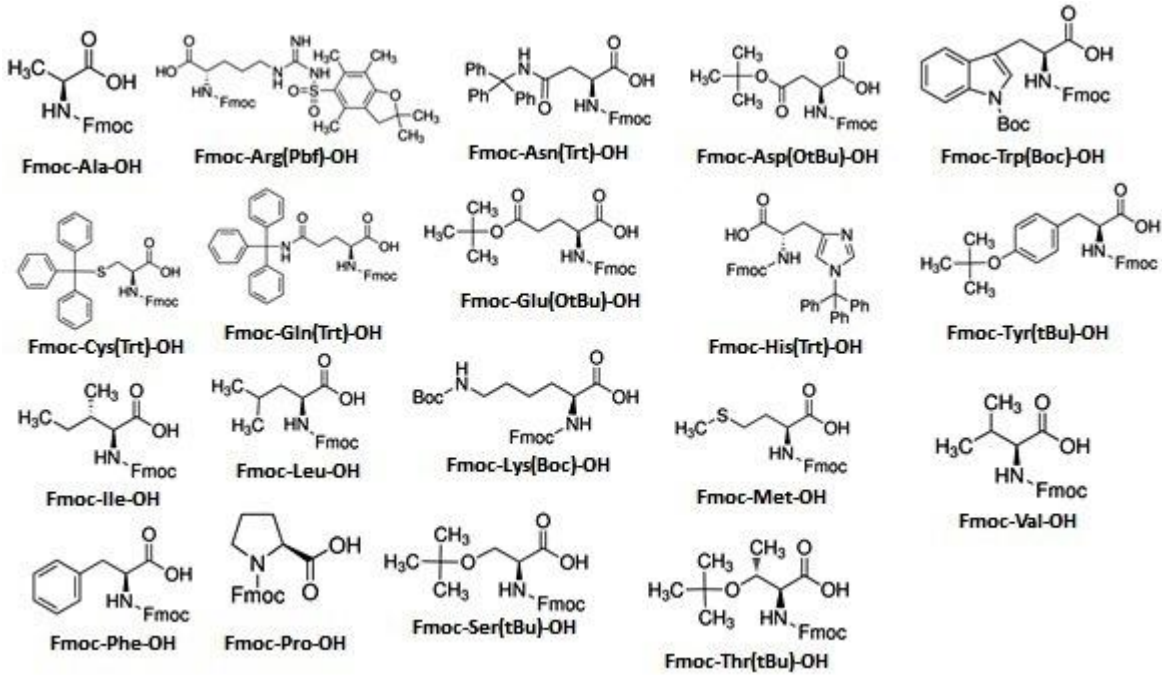
3.5 გამოყენებული ქირალური სტაციონარული ფაზები

ქრომატოგრაფიული ანალიზები ჩატარებულ იქნა ცელულოზას და ამილოზას საფუძველზე მომზადებული ხუთი სხვადასხვა ქირალური სტაციონარული ფაზის გამოყენებით, რომლებიც ერთმანეთისგან განსხვავდებოდა როგორც პოლიმერის ჩონჩხით, ასევე კარბამატის და ბენზოატის სტრუქტურაში ჩამნაცვლებლის ბუნებით და ჩამნაცვლებლის მდებარეობით. ქირალური გამოცნობის მექანიზმების კვლევა, განსაკუთრებით მოლეკულურ დონეზე ძალზე მნიშვნელოვანია, როგორც ქირალური დაყოფების, ასევე ახალი, უფრო ეფექტური ქირალური სტაციონარული ფაზების შექმნის მიზნით.



სურ. 3 ექსპერიმენტში გამოყენებული ქირალური სტაციონარული ფაზები

3.6 საკვლევი Fmoc-ამინომჟავები



სურ. 4 ექსპერიმენტში გამოყენებული Fmoc ამინომჟავები

4. მიღებული შედეგები და განსჯა

ჩვენს მიერ ჩატარებულ იქნა ახალი ქირალური სტაციონარული ფაზების სკრინინგი 19 ტესტ Fmoc ამინომჟავის ენანტიომერების დაყოფის მიზნით მოძრავ ფაზებად ორგანული გამხსნელების გამოყენებით.

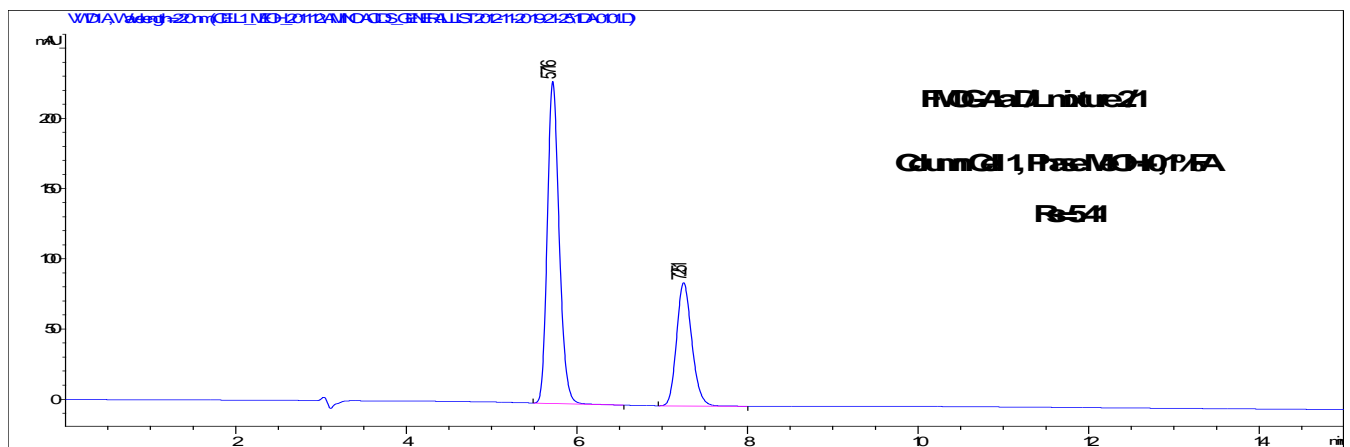
ექსპერიმენტის პირველ საფეხურზე ელუენტად გამოყენებულ იქნა მეთანოლი 0,1% ჭიანჭველაჟავას დანამატით. შესწავლილი 19 ტესტ Fmoc ამინომჟავის ენანტიომერების მიმართ ყველაზე მაღალი სელექტიურობა და გარჩევითობ გამოავლინა Lux Cellulose-1-მა სვეტმა, რომელშიც სტაციონარულ ფაზად გამოყენებულია ცელულოზა ტრის-(3,5-დიმეთილ ფენილ კარბამატი). აღნიშნულ ქირალურ სტაციონარულ ფაზაზე 20°C-ზე ელუენტად მეთანოლი 0,1% ჭიანჭველაჟავას დანამატით მხოლოდ Fmoc-ცისტეინის ენანტიომერების დაყოფა ვერ მოხერხდა აღნიშნული სვეტის გამოყენებით. ენანტიომერების ელუირების რიგი შენარჩუნებულ იქნა ცხრამეტივე ტესტ Fmoc ამინომჟავის შემთხვევაში და პირველი ელუირდებოდა D ენანტიომერი. 60°C-ზე სვეტის გარჩევითობა გაუარესდა ყველა ენანტიომერული ნარევის მიმართ.

ცხრილი 1 Lux Cellulose-1-ზე და Lux Cellulose-2-ზე მიღებული შედეგები, 200C-ზე. მოძრავი ფაზა მეთანოლი+0,1% ჰიანჭველამჟავა (v/v).

N	დასახელება	Lux Cellulose-1				Lux Cellulose-2			
		ენანტ.ელ უირების რიგი	t ₁ , წთ	t ₂ , წთ	Rs	ენანტ. ელუი რების რიგი	t ₁ , წთ	t ₂ , წთ	Rs
1.	FMOC-ალანინი N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-alanine	D/L	5,72	7,25	5,41	L/D	7,05	7,21	0,59
2.	FMOC-არგინინი Fmoc-Arg(Pbf)-OH N α -Fmoc-N ω -(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-arginine	D/L	7,71	9,39	3,40	-	11,87	-	-
3.	FMOC-ასპარგინი Fmoc-Asn(Trt)-OH N α -(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-N γ -trityl-L-asparagine	D/L	9,03	9,62	1,12	-	15,34	-	-
4.	Fmoc-ასპარტინი Fmoc-Asp(OtBu)-OH Fmoc-L-aspartic acid 4-tert-butyl ester	D/L	6,31	6,78	1,52	-	8,65	-	-
5.	Fmoc-ცისტეინი Fmoc-Cys(Trt)-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-S-trityl-L-cysteine	-	10,19	-	-	-	13,33	15,06	1,00
6.	Fmoc-გლუტამინი Fmoc-Gln(Trt)-OH N α -Fmoc-N δ -trityl-L-glutamine	D/L	7,17	7,87	1,77	-	10,48	-	-

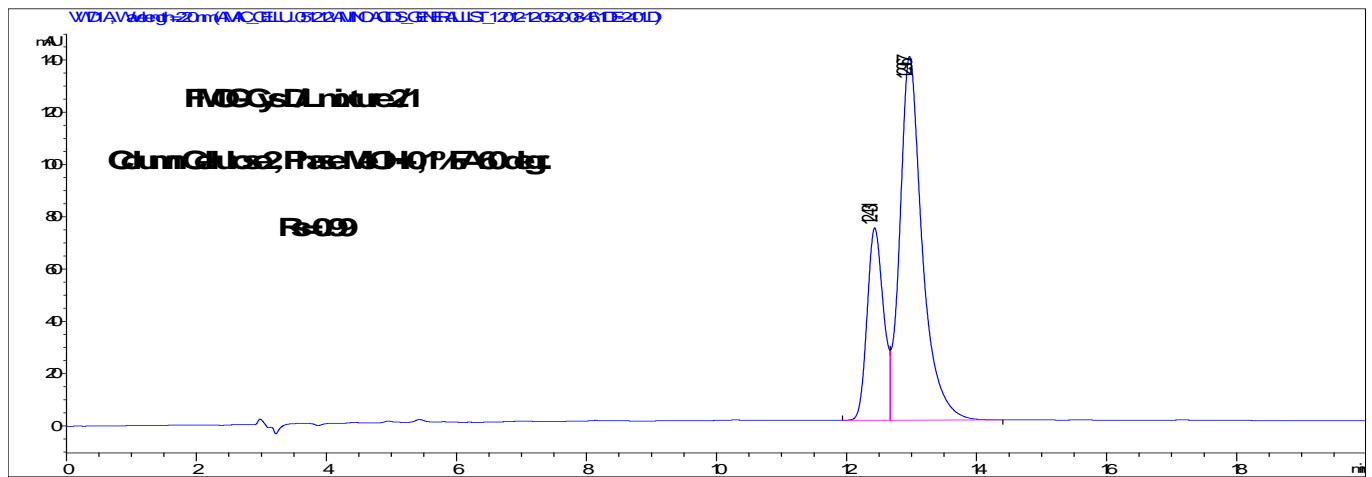
7.	Fmoc-გლუტამინის მჟავის ბუთილის ეთერი Fmoc-Glu(OtBu)-OH Fmoc-L-glutamic acid 5- tert-butyl ester	D/L	5,79	6,37	2,04	-	7,07	-	-
8.	Fmoc-ჰისტიდინი Fmoc-His(Trt)-OH N α -Fmoc-N(im)-trityl-L- histidine	D/L	2,75	2,88	0,59	-	7,65	-	-
9.	Fmoc-იზოლეიცინი Fmoc-Ile-OH N-(9- Fluorenylmethoxycarbony l)-L-isoleucine, Fmoc-L- isoleucine	D/L	5,21	5,97	3,03	-	5,6	-	-
10.	Fmoc-ლეიცინი Fmoc-Leu-OH N-(9- Fluorenylmethoxycarbony l)-L-leucine	D/L	5,08	5,36	1,16	L/D	5,32	5,50	0,72
11.	Fmoc-ლიზინი Fmoc-Lys(Boc)-OH N α -Fmoc-N ϵ -Boc-L-lysine	D/L	4,95	5,71	3,01	L/D	5,65	1,30	1,59
12.	Fmoc-მეთიონინი Fmoc-Met-OH Fmoc-L-methionine	D/L	6,41	6,92	1,70	-	6,94	-	-
13.	Fmoc-ფენილალანინი Fmoc-Phe-OH N-(9- Fluorenylmethoxycarbony l)-L-phenylalanine	D/L	7,30	8,14	2,17	-	8,98	-	-
14.	Fmoc-პროლინი Fmoc-Pro-OH N-(9- Fluorenylmethoxycarbony l)-L-proline	D/L	13,85	16,05	1,16	D/L	8,42	9,04	1,36

15.	Fmoc-სერინი Fmoc-Ser(tBu)-OH Fmoc-O-tert-butyl-L-serine	D/L	6,08	6,84	2,58	-	7,18	-	-
16.	Fmoc-თრეონინი Fmoc-Thr(tBu)-OH Fmoc-O-tert-butyl-L-threonine	D/L	5,36	6,10	2,91	-	5,78	-	-
17.	Fmoc-ტრიფტოვანი Fmoc-Trp(Boc)-OH N α -Fmoc-N(in)-Boc-L-tryptophan	D/L	7,66	9,04	3,36	L/D	9,83	11,04	1,21
18.	Fmoc-თიროზინი Fmoc-Tyr(tBu)-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-O-tert-butyl-L-tyrosine	D/L	6,72	7,99	3,44	D/L	8,89	9,32	1,14
19.	Fmoc-ვალინი Fmoc-Val-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-valine	D/L	5,30	6,12	3,23	D/L	5,99	-	-



ნახ. 1 Lux Cellulose-1-ზე FMOC-ალანინის ენანტიომერების დაყოფა, 20°C-ზე. მოძრავი ფაზა მეთანოლი+0,1% ჭიანჭველამჟავა (v/v).

Lux Cellulose-2-ზე 19 ტესტ Fmoc-ამინომჟავიდან მხოლოდ 7 ამინომჟავა დაიყო. Lux Cellulose-2-ზე Lux Cellulose-1-თან შედარებით მოხდა 4 ამინომჟავის ნაწარმის: Fmoc-ალანინის, Fmoc-ლეიცინის, Fmoc-ლიზინის და Fmoc-სერინის ენანტიომერების ელუირების რიგის შებრუნება.



ნახ. 2 Lux Cellulose-2-ზე Fmoc-ცისტეინის ენანტიომერების დაყოფა, 20°C-ზე. მოძრავი ფაზა მეთანოლი+0,1% ჭიანჭველამჟავა (v/v).

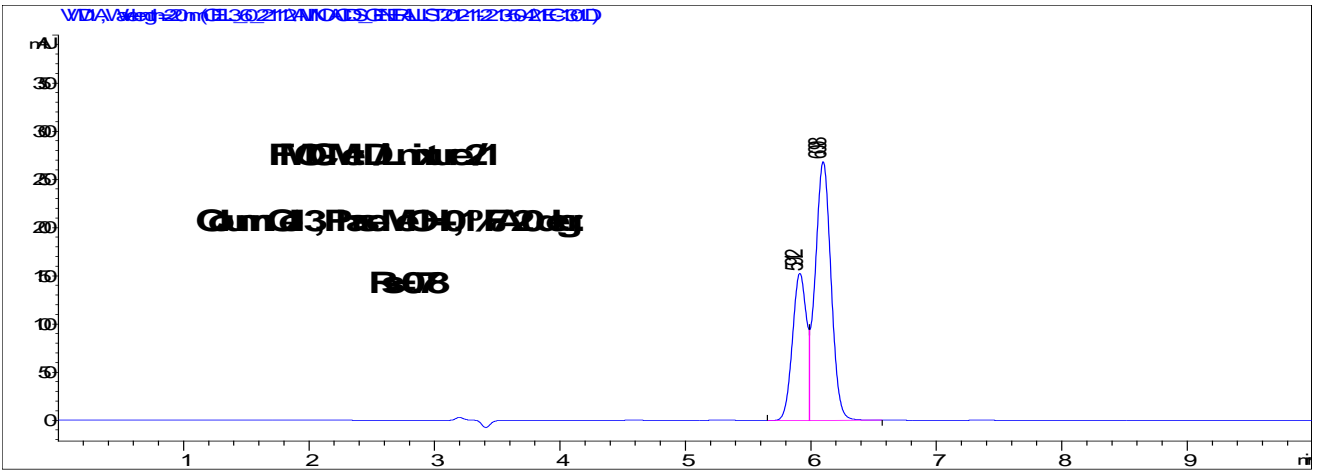
ცხრილი 2 Lux Cellulose-3-ზე და Lux Cellulose-4-ზე მიღებული შედეგები, 20°C-ზე. მოძრავი ფაზა მეთანოლი+0,1% ჭიანჭველამჟავა (v/v).

N	დასახელება	Lux Cellulose-3				Lux Cellulose-4			
		ენანტ. ელუირ.-ის რიგი	t ₁ , წთ	t ₂ , წთ	Rs	ენანტ. ელუირების რიგი	t ₁ , წთ	t ₂ , წთ	Rs
1.	Fmoc-ალანინი N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-alanine	L/D	5,16	5,58	2,21	D/L	5,75	6,04	1,21
2.	Fmoc-არგინინი Fmoc-Arg(Pbf)-OH Nα-Fmoc-Nω-(2,2,4,6,7-pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-arginine	-	6,53	-	-	D/L	11,10	12,69	2,12

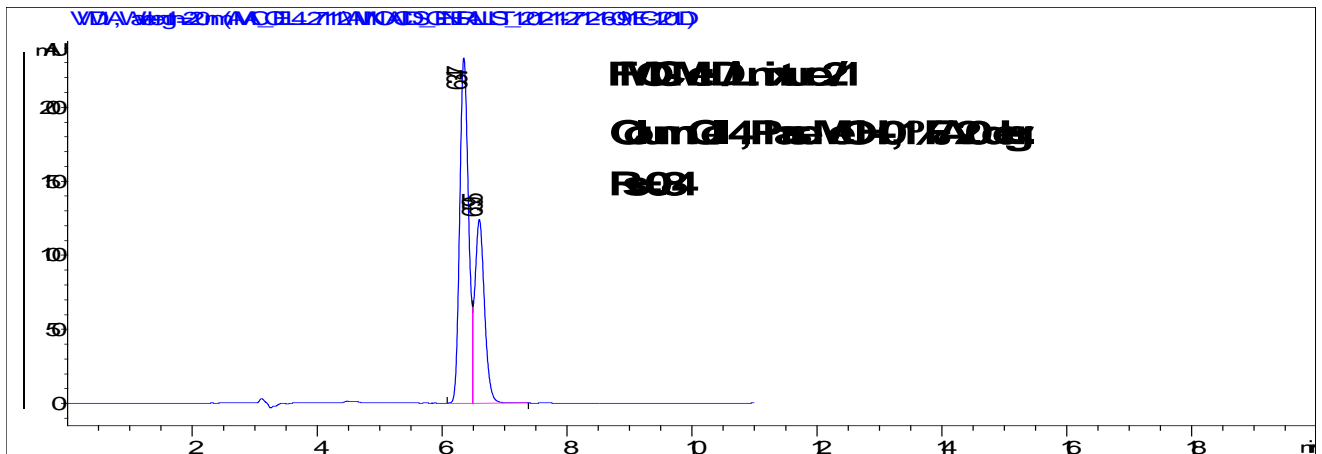
3.	Fmoc-ასპარგინი Fmoc-Asn(Trt)-OH N α -(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-N γ -trityl-L-asparagine	D/L	8,69	9,62	1,12	D/L	12,53	12,90	0,57
4.	Fmoc-ასპარტინი Fmoc-Asp(OtBu)-OH Fmoc-L-aspartic acid 4-tert-butyl ester	D/L	5,90	6,78	1,52	D/L	7,14	7,41	0,83
5.	Fmoc-ცისტეინი Fmoc-Cys(Trt)-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-S-trityl-L-cysteine	D/L	9,46	13,92	2,01	D/L	10,70	11,22	0,98
6.	Fmoc-გლუტამინი Fmoc-Gln(Trt)-OH N α -Fmoc-N δ -trityl-L-glutamine	D/L	6,69	7,25	0,75	D/L	8,61	9,71	1,94
7.	Fmoc-გლუტამინის მჟავის ბუთილის ეთერი Fmoc-Glu(OtBu)-OH Fmoc-L-glutamic acid 5-tert-butyl ester	D/L	5,25	5,63	1,75	D/L	5,94	6,34	1,34
8.	Fmoc-ჰისტიდინი Fmoc-His(Trt)-OH N α -Fmoc-N(im)-trityl-L-histidine	-	2,79	-	-	-	6,30	-	-
9.	Fmoc-იზოლეიცინი Fmoc-Ile-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-isoleucine, Fmoc-L-isoleucine	-	4,65	-	-	-	4,62	-	-
10.	Fmoc-ლეიცინი Fmoc-Leu-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-leucine	L/D	4,38	4,65	1,54	-	4,64	-	-

11.	Fmoc-ლიზინი Fmoc-Lys(Boc)-OH N α -Fmoc-N ϵ -Boc-L-lysine	L/D	4,62	5,99	3,40	-	4,90	-	-
12.	Fmoc-მეთიონინი Fmoc-Met-OH Fmoc-L-methionine	L/D	5,90	6,09	0,78	D/L	6,35	6,60	0,84
13.	Fmoc-ფენილალანინი Fmoc-Phe-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-phenylalanine	L/D	6,62	6,82	0,75	-	6,83	-	-
14.	Fmoc-პროლინი Fmoc-Pro-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-proline	-	5,58	-	-	D/L	8,11	8,37	0,56
15.	Fmoc-სერინი Fmoc-Ser(tBu)-OH Fmoc-O-tert-butyl-L-serine	-	5,08	-	-	D/L	6,29	6,96	2,44
16.	Fmoc-თრეონინი Fmoc-Thr(tBu)-OH Fmoc-O-tert-butyl-L-threonine	-	4,04	-	-	-	5,32	-	-
17.	Fmoc-ტრიფტოვანი Fmoc-Trp(Boc)-OH N α -Fmoc-N(in)-Boc-L-tryptophan	D/L	7,17	10,07	2,53	-	8,32	-	-
18.	Fmoc-თიროზინი Fmoc-Tyr(tBu)-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-O-tert-butyl-L-tyrosine	D/L	7,07	8,64	3,08	-	7,09	-	-
19.	Fmoc-ვალინი Fmoc-Val-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-valine	L/D	4,79	4,96	0,91	-	4,99	-	-

Lux Cellulose-3-ზე 19 ტესტ Fmoc-ამინომჟავიდან 13 ამინომჟავა დაიყო. Lux Cellulose-3-ის გამოყენების შემთხვევაში ენანტიომერების ელუირების რიგი ასევე მნიშვნელოვნად განსხვავდებოდა Lux Cellulose-1-ზე ენანტიომერების ელუირების რიგისგან. როგორც ჩანს, ფენილკარბამატი და ბენზოატი განსხვავებული მექანიზმებით ურთიერთქმედებს საკვლევი ამინომჟავების ენანტიომერებთან, მიუხედავად იმისა, რომ ორივე შემთხვევაში ჩამნაცვლებელი გვაქვს ელექტრონების დონორი მეთილის რადიკალი.



ა)

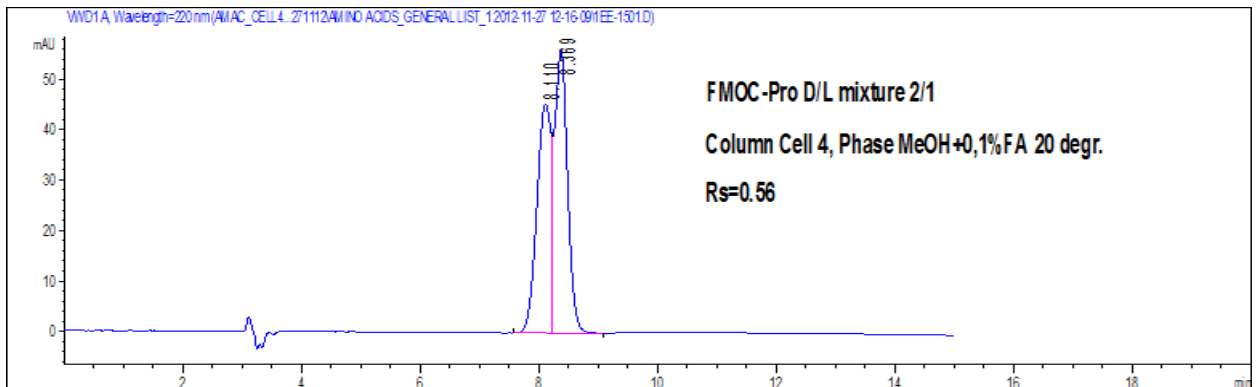


ბ)

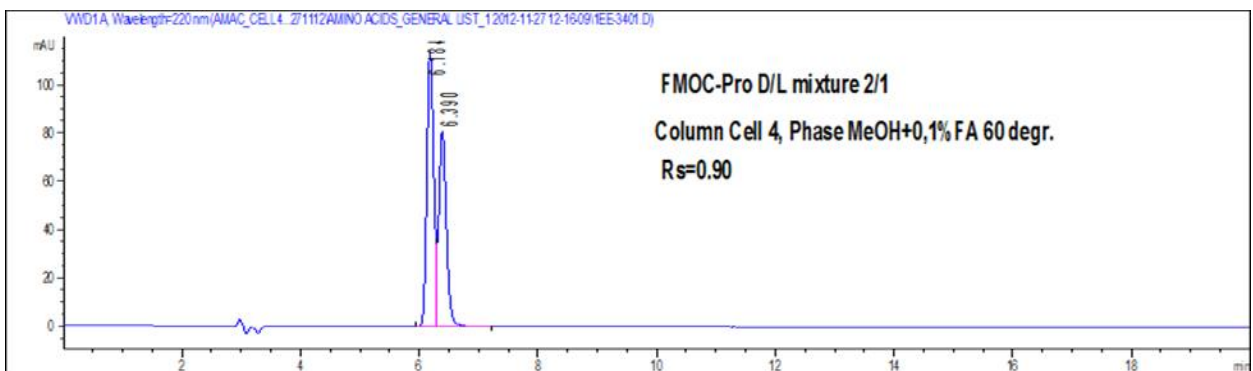
ნახ. 3 Lux Cellulose-3-სა (ა) და Lux Cellulose-4-ზე (ბ) Fmoc-მეთიონინის ენანტიომერების ელუირების რიგის ცვლილება 20°C-ზე. მოძრავი ფაზა მეთანოლი+0,1% ჭიანჭველამჟავა (v/v).

ტემპერატურაზე დამოკიდებული საინტერესო შედეგი გამოვლინდა Lux Cellulose-4-ზე Fmoc-პროლინის ენანტიომერების დაყოფის შემთხვევაში. 20°C-ზე პირველი ელუირდებოდა L

ენანტიომერი, ხოლო მეორე D ენანტიომერი. 60°C-ზე პირველი ელუირდა D ენანტიომერი, ხოლო მეორე L ენანტიომერი. რაც იმაზე მეტყველებს, რომ ტემპერატურის ცვლილებამ სრულად შეცვალა ქირალური სტაციონარული ფაზის გამოცნობის მექანიზმი Fmoc-პროლინის ენანტიომერების დაყოფის შემთხვევაში

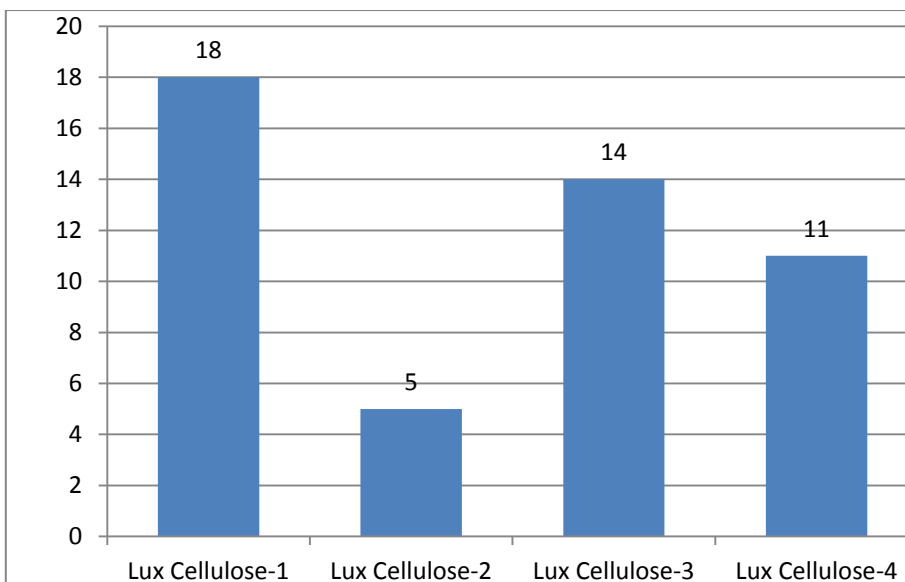


ა)



ბ)

ნახ. 4 Lux Cellulose-4-ზე (ბ) Fmoc-პროლინის ენანტიომერების ელუირების რიგის ცვლილება ტემპერატურის გავლენით, 20°C (ა) და 60°C (ბ). მოძრავი ფაზა მეთანოლი+0,1% ჭიანჭველამჟავა (v/v).



ნახ. 5 სხვადასხვა ქირალური სტაციონარულ ფაზებზე ელუენტად მეთანოლი 0,1% ჭიანჭველაჟავას დანამატით დაყოფილი FMOC- ამინომჟავების პროცენტული მაჩვენებლები.

შემდგომ ეტაპზე ჩვენს მიერ ჩატარდა იგივე ქირალური სტაციონარული ფაზების სკრინინგი FMOC-ამინომჟავისათვის ელუენტად ეთანოლი 0,1% ჭიანჭველაჟავას დანამატით გამოყენებით. საინტერესო იყო მოახდენდა თუ არა ენანტიომერების ელუირების რიგის შებრუნებას ერთსა და იმავე სტაციონარულ ფაზაზე განსხვავებული მოძრავი ფაზის გამოყენება. მეთანოლიდან ეთანოლზე გადასვლით მნიშვნელოვნად შემცირდა ენანტიომერების დასაყოფად საჭირო ანალიზის დრო, მაშინ როდესაც გაიზარდა დაყოფის გარჩევითობა. ანალიზის დროის შემცირება და გარჩევითობის გაზრდა ორივე ითვლება დადებით შედეგად. მაშინ როდესაც ერთი და იმავე ელუენტის გამოყენების შემთხვევაში ანალიზის დროის შემცირებასთან ერთად თითქმის ყოველთვის ხდება გარჩევითობის შემცირება. ხოლო როდესაც გამოვიყენეთ მეთანოლის ნაცვლად ეთანოლი, მოხდა სვეტის ეფექტურობის გაზრდა, პიკები დავიწროვდა და შესაბამისად მოკლე დროში მივიღეთ მაღალი გარჩევითობა მაღალი თეორიული თეფშების მიღწევის ხარჯზე.

ცხრ. 3 FMOC ამინომჟავების ენანტიომერების დაყოფის შედეგები სხვადასხვა ქირალურ სტაციონარულ ფაზებზე ელუენტად ეთანოლი 0,1% ჭიანჭველაჟავას დანამატით გამოყენებით

N	დასახელება	Lux Cellulose-1		Lux Cellulose-2		Lux Cellulose-3		Lux Cellulose-4		Lux Amylose-2	
		ენანტიომ. ელუირ. რიგი	Rs	ენანტიომ. ელუირ. რიგი	Rs	ენანტიომ. ელუირ. რიგი	Rs	ენანტიომ. ელუირ. რიგი	Rs	ენანტიომ. ელუირ. რიგი	Rs
1.	FMOC-ალანინი N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-alanine	D/L	2,01	D/L	1,03	L/D	1,87	-	-	-	-
2.	FMOC-არგინინი Fmoc-Arg(Pbf)-OH N α -Fmoc-N ω -(2,2,4,6,7-	D/L	1,79	-	-	-	-	D/L	1,33	-	-

	pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-arginine										
3.	Fmoc- ასპარგინი Fmoc-Asn(Trt)-OH N α -(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-N γ -trityl-L-asparagine	D/L	1,30	-	-	L/D	1,20	-	-	-	-
4.	Fmoc- ასპარტინი Fmoc-Asp(OtBu)-OH Fmoc-L-aspartic acid 4-tert-butyl ester	D/L	1,27	-	-	-	-	-	-	D/L	0,57
5.	Fmoc- ცისტეინი Fmoc-Cys(Trt)-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-S-trityl-L-cysteine	D/L	1,07	-	-	L/D	3,18	-	-	-	-
6.	Fmoc- გლუტამინი Fmoc-Gln(Trt)-OH N α -Fmoc-N δ -trityl-L-glutamine	D/L	1,46	-	-	-	-	D/L	1,63	-	-
7.	Fmoc- გლუტამინის მჟავის ბუტილის ეთერი Fmoc-Glu(OtBu)-OH Fmoc-L-	D/L	1,37	-	-	-	-	D/L	1,15	-	-

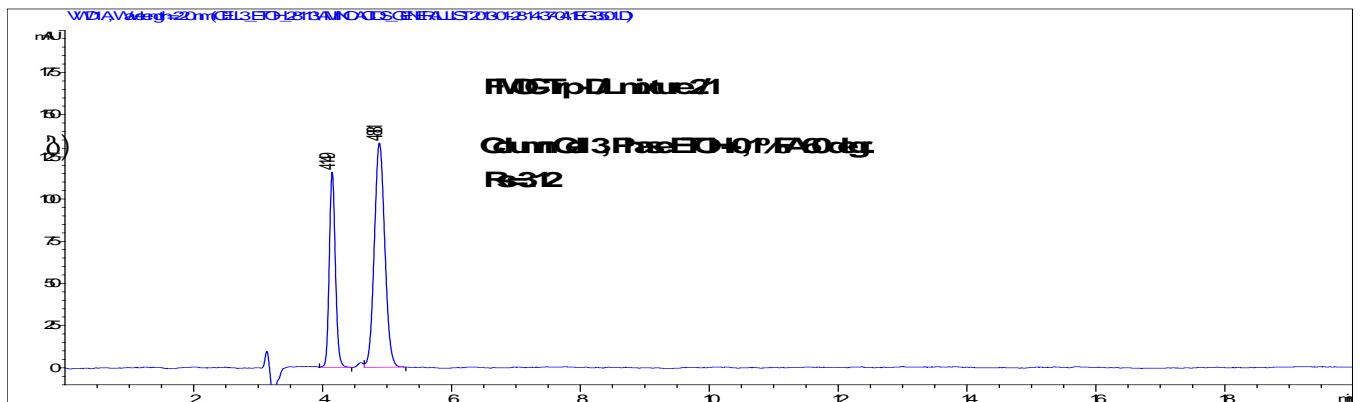
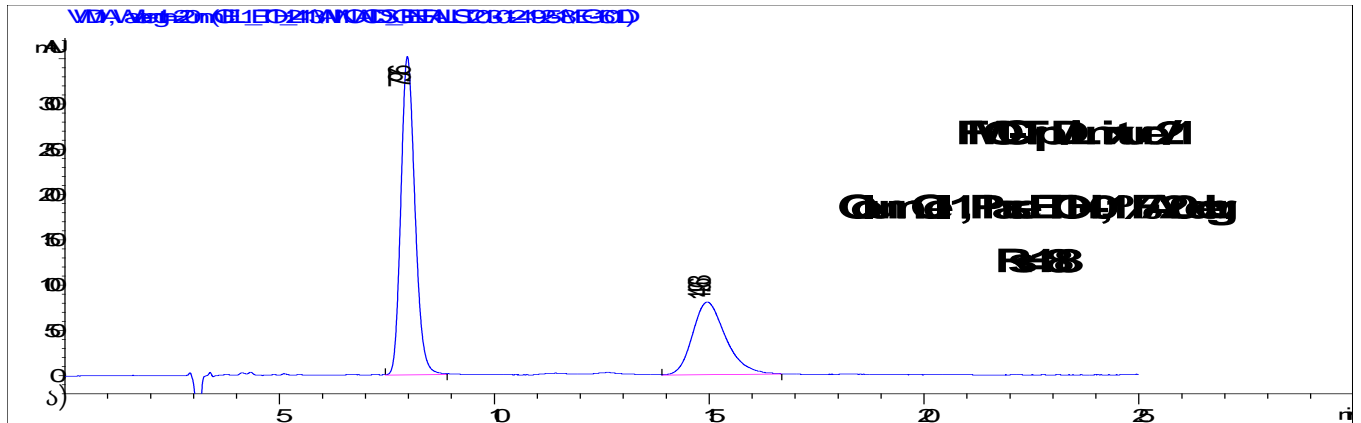
	glutamic acid 5-tert-butyl ester										
8.	Fmoc-ჰისტიდინი Fmoc-His(Trt)-OH N α -Fmoc-N(im)-trityl-L-histidine	D/L	1,80	D/L	1,65	-	-	D/L	1,23	D/L	2,23
9.	Fmoc-იზოლეიცინი Fmoc-Ile-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-isoleucine, Fmoc-L-isoleucine	D/L	1,77	L/D	1,36	L/D	2.01	-	-	L/D	0,67
10.	Fmoc-ლეიცინი Fmoc-Leu-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-leucine	D/L	1,40	L/D	1,39	L/D	1,80	-	-	L/D	0,53
11.	Fmoc-ლიზინი Fmoc-Lys(Boc)-OH N α -Fmoc-N ϵ -Boc-L-lysine	D/L	1,76	-	-	D/L	1,84	-	-	-	-
12.	Fmoc-მეთიონინი Fmoc-Met-OH Fmoc-L-methionine	D/L	1,41	L/D	0,61	L/D	1,23	D/L	0,96	-	-
13.	Fmoc-ფენილალანინი Fmoc-Phe-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-phenylalanine	D/L	1,53	L/D	0,91	L/D	0,54	-	-	-	-
14.	Fmoc-პროლინი	D/L	1,45	D/L	3,51	-	-	D/L	1,09	D/L	0,5

	Fmoc-Pro-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-proline										
15.	Fmoc-სერინი Fmoc-Ser(tBu)-OH Fmoc-O-tert-butyl-L-serine	D/L	1,47	L/D	0,78	-	-	D/L	1,61	-	-
16.	Fmoc-თრეონინი Fmoc-Thr(tBu)-OH Fmoc-O-tert-butyl-L-threonine	D/L	1,88	-	-	-	-	-	-	-	-
17.	Fmoc-ტრიფტოფანი Fmoc-Trp(Boc)-OH N α -Fmoc-N(in)-Boc-L-tryptophan	D/L	1,27	L/D	0,73	L/D	3,12	-	-	-	-
18.	Fmoc-თიროზინი Fmoc-Tyr(tBu)-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-O-tert-butyl-L-tyrosine	D/L	1,80	L/D	1,60	D/L	2,11	-	-	-	-
19.	Fmoc-ვალინი Fmoc-Val-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-valine	D/L	1,78	L/D	1,10	L/D	1,13	D/L	0,56	-	-

როგორც ცხ. 3-დან ჩანს Lux Cellulose-1 სვეტი საუკეთესო სელექტიურობით გამოირჩევა შესწავლილი 19 ტესტ Fmoc ამინომჟავის ენანტიომერების მიმართ ელუენტად ეთანოლი 0,1% ჭიანჭველაჟავას გამოყენების შემთხვევაშიც. ენანტიომერების ელუირების რიგი შენარჩუნებულ იქნა ცხრამეტივე ტესტ Fmoc ამინომჟავის შემთხვევაში და პირველი ელუირდებოდა D

ენანტიომერი. 60°C-ზე სვეტის გარჩევითობა გაუარესდა ყველა ენანტიომერული ნარევის მიმართ. ტემპერატურის გავლენით ენანტიომერების მელურიების რიგის შებრუნებას უძრავი და მოძრავი ფაზების ამ წყვილის შემთხვევაში ადგილი არ ჰქონია.

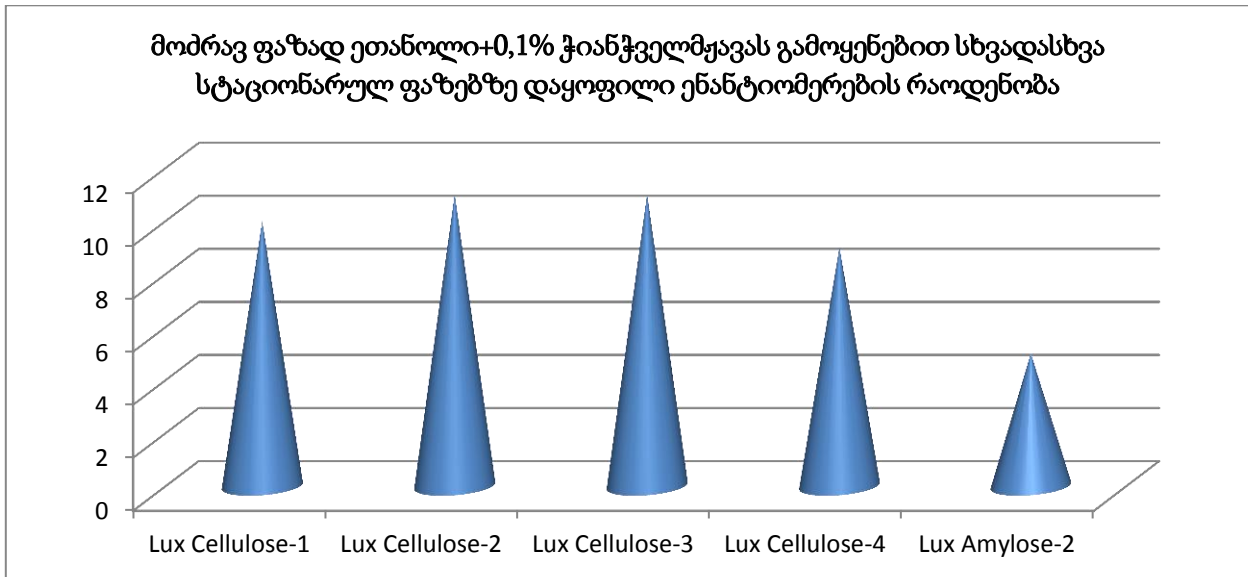
ელუენტად ეთანოლი 0,1% ჭიანჭველამჟავას გამოყენების შემთხვევაში განსაკუთრებით მაღალი სელექტივობით მოხდა FMOC -ტრიფტოფანის ენანტიომერების დაყოფა და ასევე საინტერესოა ის ფაქტი, რომ Lux Cellulose-3 სვეტზე Lux Cellulose-1-თან შედარებით მოხდა ენანტიომერების ელურიების რიგის შებრუნება.



ნახ. 5 Lux Cellulose-1-ზე (ა) და Lux Cellulose-3-ზე (ბ) FMOC-ტრიფტოფანის ენანტიომერების ელურიების რიგის ცვლილება ქირალური სტაციონარული ფაზის გავლენით, მოძრავი ფაზა ეთანოლი+0,1% ჭიანჭველამჟავა (v/v).

ნახ. 8-დან თვალსაჩინოდ ჩანს, რომ თუ Lux Cellulose-1-ზე ანალიზის დასრულებას დასჭირდა 17 წთ. და გარჩევითობა კი მხოლოდ 1,88 იყო, Lux Cellulose-3-ზე 5 წთ.-ში დასრულდა ანალიზი,

ხოლო გარჩევითობამ 3,12-ს მიაღწია. ამასთანავე თუ სუფთა სახით L ენანტიომერის შეგროვება არის საჭირო ეს მეთოდი უკეთესია, რადგან აღნიშნული ენანტიომერი პირველად ელუირდება.



ნახ. 6 მოძრავ ფაზად ეთანოლი+0,1% ჭიანჭველმჟავა (v/v) გამოყენებით სხვადასხვა ქირალურ სტაციონარულ ფაზებზე ენანტიომერების დაყოფის % მაჩვენებლები.

როგორ დიაგრამიდან ჩანს Lux Cellulose-1 გამოირჩევა განსაკუთრებულად მაღალი გარჩევითობის უნარით მოძრავ ფაზად ეთანოლი+0,1% ჭიანჭველმჟავას გამოყენების შემთხვევაში, 19 ტესტ რაცემატიდან მოხდა ყველა რაცემატის ენანტიომერების ფუძისეული დაყოფა.

მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ Lux Cellulose-ზე უმეტეს შემთხვევაში Lux Cellulose-1-თან შედარებით უმეტესი დაყოფილი რაცემატის ენანტიომერების ელუირების რიგი შებრუნდა მოძრავ ფაზად ეთანოლი+0,1% ჭიანჭველმჟავას გამოყენების შემთხვევაში.

ექსპერიმენტის შემდეგ საფეხურზე ჩატარებულ იქნა ქირალური სტაციონარული ფაზების სკრინინგი მოძრავ ფაზად აცეტონიტრილი 0,1% ჭიანჭველმჟავას (v/v) დანამატით გამოყენებით.

ცხრ. 4 FMOC ამინომჟავების ენანტიომერების დაყოფის შედეგები სხვადასხვა ქირალურ სტაციონარულ ფაზებზე ელუენტად აცეტონიტრილი 0,1% ჭიანჭველმჟავას დანამატით გამოყენებით.

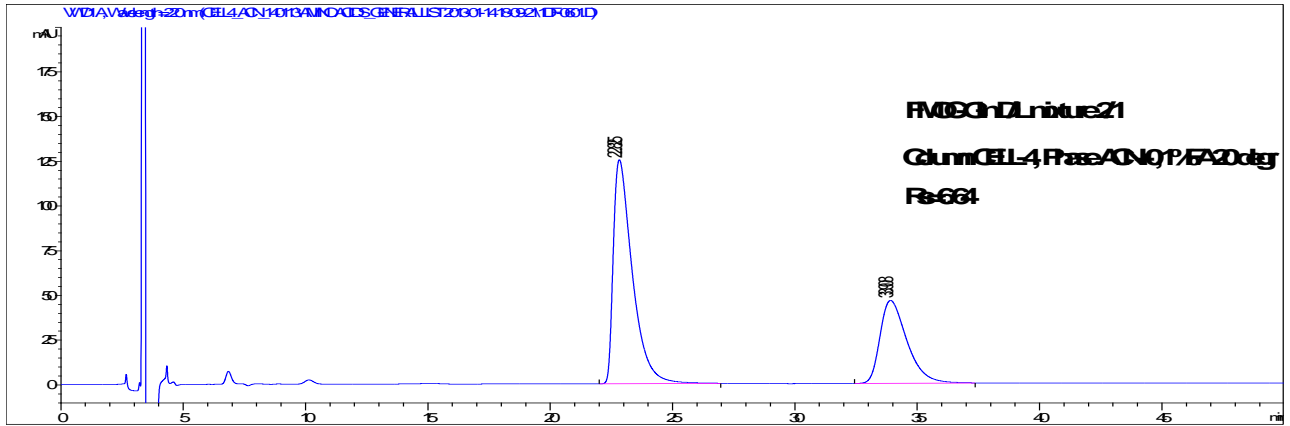
N	დასახელება	Lux Cellulose-1		Lux Cellulose-2		Lux Cellulose-3		Lux Cellulose-4		Lux Amylose-2	
		ენანტ. მიგრ. რიგი	Rs	ენანტ. მიგრ. რიგი	Rs	ენანტ. მიგრ. რიგი	Rs	ენანტ. მიგრ. რიგი	Rs	ენანტ. მიგრ. რიგი	Rs

						რ. რიგ ო		რ. რიგ ი		რ. რიგ ი	
1.	Fmoc-ალანინი N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-alanine	D/L	1,77	-	-	-	-	D/L	2.36	-	-
2.	Fmoc-არგინინი Fmoc-Arg(Pbf)-OH N α -Fmoc-N ω -2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-arginine	-	-	-	-	-	-	D/L	1.38	-	-
3.	Fmoc-ასპარგინი Fmoc-Asn(Trt)-OH N α -(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-N γ -trityl-L-asparagine	-	-	-	-	-	-	D/L	1.37	-	-
4.	Fmoc-ასპარტინი Fmoc-Asp(OtBu)-OH Fmoc-L-aspartic acid 4-tert-butyl ester	-	-	-	-	-	-	L/D	0.59	D/L	0.86
5.	Fmoc-ცისტეინი Fmoc-Cys(Trt)-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-S-trityl-L-cysteine	-	-	-	-	-	-	D/L	1.41	-	-
6.	Fmoc-გლუტამინი Fmoc-Gln(Trt)-OH N α -Fmoc-N δ -trityl-L-glutamine	-	-	D/L	2,62	-	-	D/L	6.64	-	-
7.	Fmoc-გლუტამინის მჟავის ბუთილის ეთერი Fmoc-Glu(OtBu)-OH Fmoc-L-glutamic acid 5-tert-butyl ester	D/L	0,39	-	-	-	-	D/L	0.67	-	-

8.	Fmoc-ჰისტიდინი Fmoc-His(Trt)-OH N α -Fmoc-N(im)-trityl-L-histidine	D/L	1,15	-	-	-	-	L/D	0.60	-	-
9.	Fmoc- ობოლეიცინი Fmoc-Ile-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L- isoleucine, Fmoc-L- isoleucine	-	-	-	-	-	-	D/L	1.50	D/L	2.32
10.	Fmoc-ლეიცინი Fmoc-Leu-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-leucine	L/D	0,49	-	-	-	-	L/D	0.42	D/L	3.34
11.	Fmoc-ლიზინი Fmoc-Lys(Boc)-OH N α -Fmoc-N ϵ -Boc-L-lysine	D/L	0,61	-	-	-	-	D/L	1.34	-	-
12.	Fmoc-მეთიონინი Fmoc-Met-OH Fmoc-L-methionine	-	-	-	-	-	-	D/L	1.41	D/L	2.57
13.	Fmoc- ფენილალანინი Fmoc-Phe-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L- phenylalanine	D/L	0,59	D/L	0,82	-	-	D/L	1.44	D/L	1.53
14.	Fmoc-პროლინი Fmoc-Pro-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-proline	D/L	1,45	D/L	2,8	-	-	-	-	L/D	2.05
15.	Fmoc-სერინი Fmoc-Ser(tBu)-OH Fmoc-O-tert-butyl-L-serine	D/L	0,89	-	-	-	-	D/L	2.40	-	-
16.	Fmoc- თრეონინი Fmoc-Thr(tBu)-OH Fmoc-O-tert-butyl-	-	-	-	-	-	-	D/L	1.25	-	-

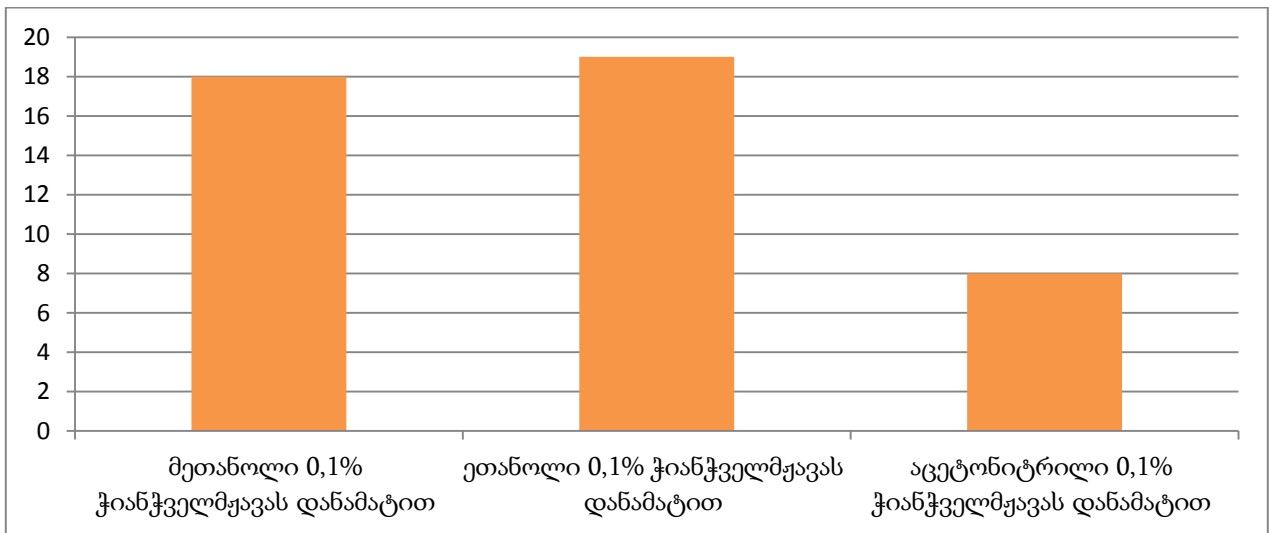
	L-threonine										
17.	Fmoc-ტრიფტოფანი Fmoc-Trp(Boc)-OH N α -Fmoc-N(in)-Boc-L-tryptophan	-	-	D/L	1,31	-	-	D/L	2.35	-	-
18.	Fmoc-თიროზინი Fmoc-Tyr(tBu)-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-O-tert-butyl-L-tyrosine	D/L	0,62	-	-	-	-	L/D	0.81	-	-
19.	Fmoc-ვალინი Fmoc-Val-OH N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-valine	-	-	-	-	D/L	0,39	D/L	1.38	D/L	1.23

როგორც ცხ. 4-ში წარმოდგენილი შედეგებიდან ჩანს, მოძრავი ფაზა აცეტონიტრილი 0,1% ჭიანჭველმჟავას დანამატით ძალიან მცირე რაოდენობის FMOC ამინომჟავების ენანტიომერების დაყოფა გახდა შესაძლებელი. Lux Cellulose-2 და Lux Cellulose-3 ქირალურმა სტაციონარულმა ფაზებმა თითქმის სრულად დაკარგა გარჩევითობა FMOC ამინომჟავების ენანტიომერების მიმართ ამ უკანასკნელი ელუენტის გამოყენების შემთხვევაში. როგორც ექსპერიმენტმა უჩვენა FMOC ამინომჟავების განაწილების კოეფიციენტი მოძრავ ფაზაში აცეტონიტრილი 0,1% ჭიანჭველმჟავას დანამატით გაცილებით მაღალია, ვიდრე მათი შეკავება ქირალურ სტაციონარულ ფაზაზე. აქვე აუცილებლად უნდა აღინიშნოს, რომ ქირალურმა სტაციონარულმა ფაზამ Lux Cellulose-4-მა მოძრავ ფაზაში აცეტონიტრილი 0,1% ჭიანჭველმჟავას დანამატით გამოავლინა განსაკუთრებულად მაღალი გარჩევითობის უნარი ნახ. 9 (დ), მაშინ როდესაც 19 ტესტ FMOC ამინომჟავების ენანტიომერების დაყოფა ამ ქირალურ სტაციონარულ ფაზაზე არ აღემატებოდა 10-ს, აცეტონიტრილის გამოყენებისას 19 ტესტ რაცემატიდან 18-ის ენანტიომერების დაყოფა მოხერხდა. Lux Cellulose-4-ზე მოძრავ ფაზაში აცეტონიტრილი 0,1% ჭიანჭველმჟავას დანამატით გამოყენების დროს FMOC-გლუტამინის ენანტიომერები განსაკუთრებულად მაღალი გარჩევითობით დაიყო Rs=6,64, იხ. ნახ.7.

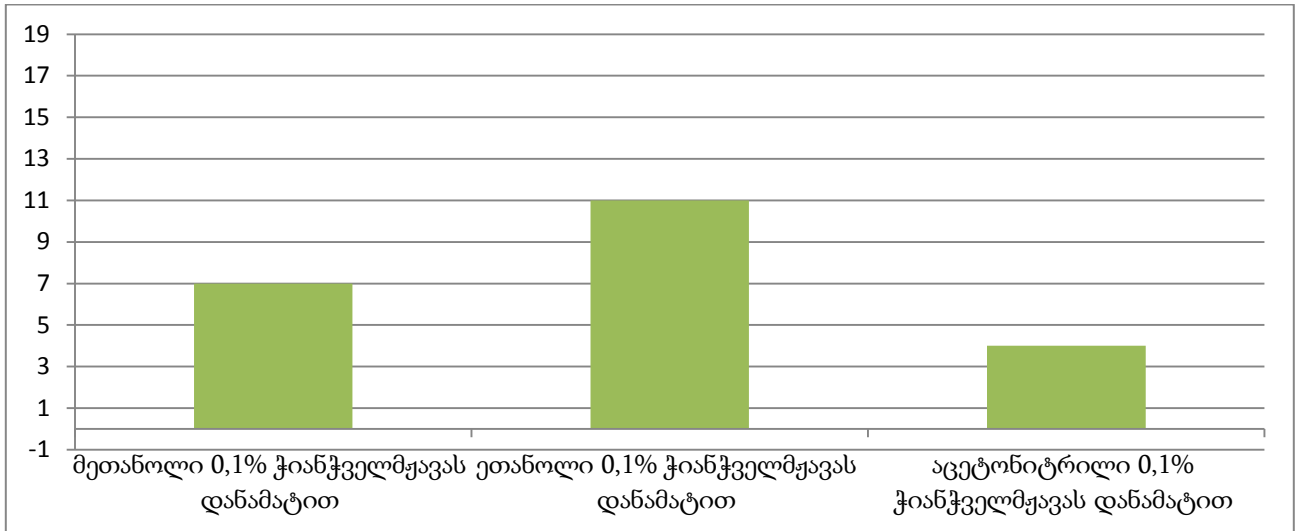


ნახ. 7 Fmoc-გლუტამინის ენანტიომერების დაყოფა Lux Cellulose-4 სვეტზე მოძრავ ფაზად აცეტონიტრილი+0,1% ჭიანჭველმუჟავა (v/v) გამოყენებით.

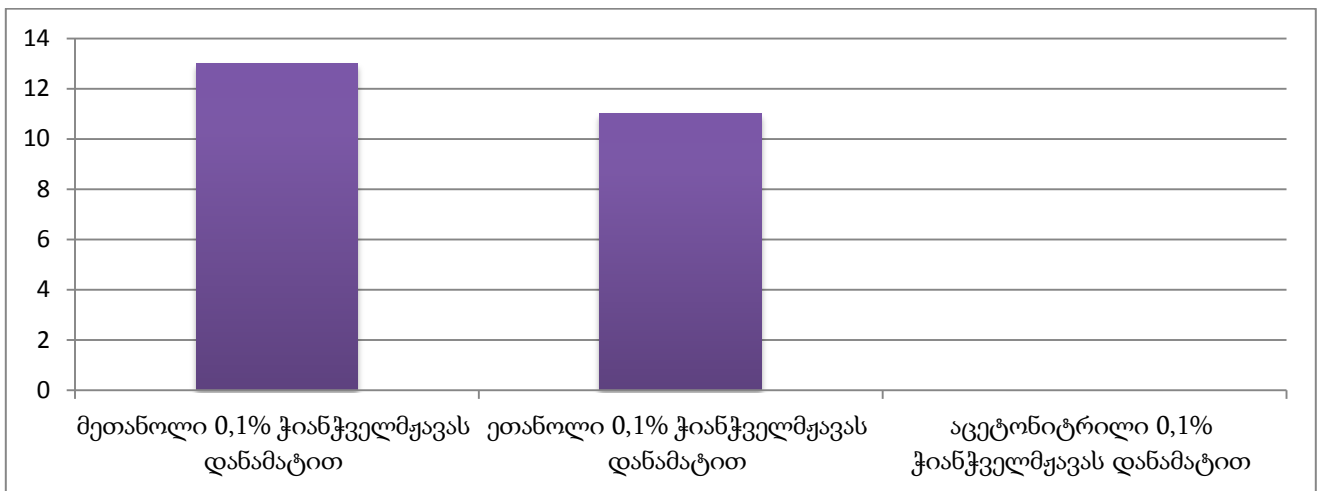
ჩვენს მიერ ჩატარებულმა ახალი ქირალური სტაციონარული ფაზების სკრინინგის პროცესში სხვადასხვა ორგანული გამხსნელების გამოყენებით 19 ტესტ Fmoc ამინომჟავის ენანტიომერების დასაყოფად შემდეგი შედეგები გვაჩვენა.



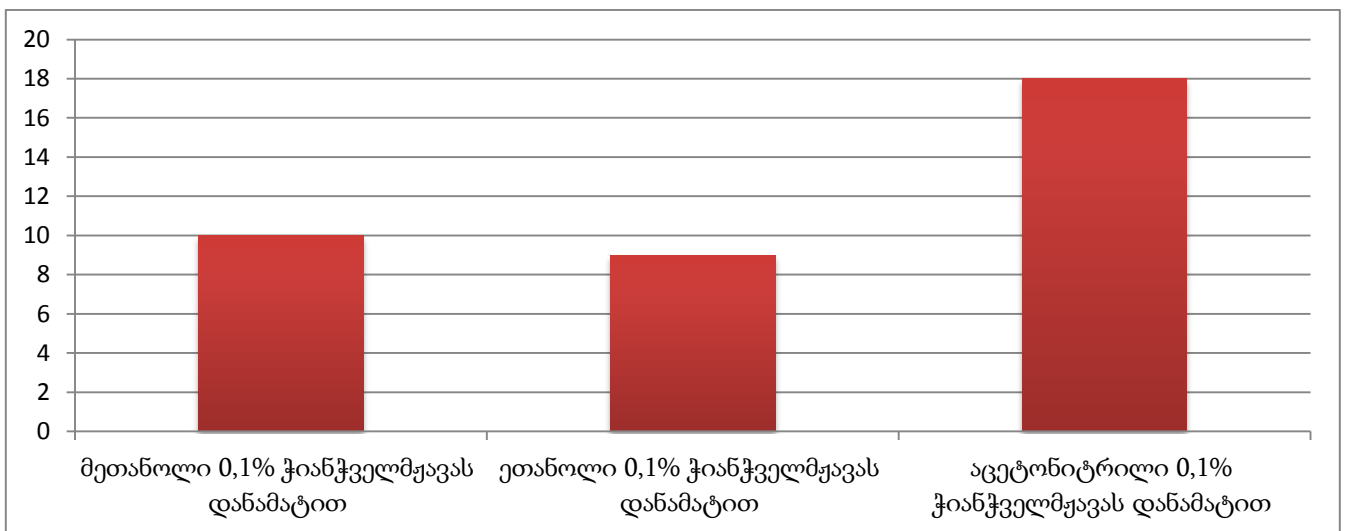
ა)



ბ)



გ)



დ)

ნახ. 8 FMOC-ამინომჟავების დაყოფის დიაგრამები ქირალური სტაციონარული ფაზების: Lux-Cellulose 1 (ა), Lux-Cellulose 2 (ბ), Lux-Cellulose 3 (გ), Lux-Cellulose 4 (დ) -და მოძრავი ფაზების სხვადასხვა კომბინაციით.

ჩვენს მიერ მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ FMOC-ამინომჟავების ენანტიომერების დაყოფის პროცესზე ძალიან დიდ გავლენას ახდენს ქირალური სტაციონარული ფაზის ფენილკარბამატის ან ბენზოატის სტრუქტურაში ჩანაცვლებლის ტიპი (ელექტრონების დონორი-მეთილი ან ელექტრონების აქცეპტორი-ქლორი) და მათი მდებარეობა. მაშინ როდესაც როდესაც 3 და 5 მდგომარეობაში ჩანაცვლებულია მეთილის ჯგუფები ანუ Lux Cellulose-1-ის შემთხვევაში დაყოფის მაღალი მაჩვენებლები იქნა მიღებული მოძრავ ფაზად ეთანოლი 0,1% ჭიანჭველმჟავას დანამატით და მეთანოლი 0,1% ჭიანჭველმჟავას დანამატით გამოყენების შემთხვევაში, ხოლო როდესაც 3 მდგომარეობაში ჩანაცვლებული იყო ქლორი, ხოლო 4 მდგომარეობაში მეთილის რადიკალი დაყოფის მაღალი მაჩვენებელი მიღწეულ იქნა მოძრავ ფაზად აცეტონიტრილი 0,1% ჭიანჭველმჟავას დანამატით გამოყენების შემთხვევაში. უნდა აღინიშნოს რომ ფაქტობრივად არცერთ მოძრავ ფაზაში არ გამოირჩეოდა დაყოფის მაღალი მაჩვენებლებით FMOC-ამინომჟავების ენანტიომერების დაყოფის მიმართ Lux Cellulose-2, რომელშიც 3 მდგომარეობაში ჩანაცვლებული იყო მეთილის რადიკალი, ხოლო 4 მდგომარეობაში ქლორი. თუმცა ამ უკანასკნელზე ხშირად მოხდა ენანტიომერების ელუირების რიგის შებრუნება Lux Cellulose-1-თან შედარებით.

5. დასკვნები

1. ჩატარებულ იქნა 19 ტესტ FMOC-ამინომჟავების ენანტიომერების დაყოფის სკრინინგი ახალი ქირალური სტაციონარული ფაზების და სუფთა ორგანული გამხსნელების, როგორც მოძრავი ფაზების გამოყენებით;
2. Lux Cellulose-1 სვეტზე მოძრავა ფაზად ეთანოლი 0,1% ჭიანჭველმჟავას დანამატით გამოყენებისას 19 ტესტ FMOC-ამინომჟავიდან ყველას ენანტიომერი დაიყო;
3. Lux Cellulose-4 სვეტზე მოძრავა ფაზად აცეტონიტრილი 0,1% ჭიანჭველმჟავას დანამატით გამოყენებისას 19 ტესტ FMOC-ამინომჟავიდან 18-ის ენანტიომერები დაიყო;
4. Lux Cellulose-1-დან Lux Cellulose-2-ზე გადასვლისას მოძრავ ფაზად მეთანოლი 0,1% ჭიანჭველმჟავას დანამატით გამოყენებისას მოხდა 4 FMOC-ამინომჟავის ენანტიომერების ელუირების რიგის შებრუნება;
5. FMOC-ამინომჟავის ენანტიომერების მიმართ განსაკუთრებით მაღალი გარჩევითობით გამორჩეული ფაზები კომბინაცია არის ქრომატოგრაფიული სვეტი Lux Cellulose-1 და მოძრავი ფაზა ეთანოლი ან მეთანოლი 0,1% ჭიანჭველმჟავას დანამატით და სვეტი Lux Cellulose-4 მოძრავი ფაზა აცეტონიტრილი 0,1% ჭიანჭველმჟავას დანამატით;

6. გამოყენებული ლიტერატურა

1. Bodansky, M.; Bodansky, A. The Practice of Peptide Synthesis; Springer: New York, 1984.
2. E. L. Eliel, S. H. Wilen, M. P. Doyle, Chiroptical properties, in Basic Organic Stereochemistry, John Wiley & Sons, New York, 2001, Chapter 12, pp. 534–609
3. B. Chankvetadze, L. Chankvetadze, Sh. Sidamonidze, E. Yashima, Y. Okamoto, J. Pharm. Biomed. Anal., 14, 1996, pp. 1295-1303.
4. Carpino, L.A. and Han, G.Y. J. Am. Chem. Soc. 1970, 92, pp. 5748
5. E. Francotte, R. Mannhold, H. Kubinyi, G. Folkers. Chirality in Drug research, Wiley-VCH. 2006, pp. 155.
6. H. Caner, E. Groner, L. Levy, I. Agranat. Drug Discov. Today 9, 2004, pp. 105.
7. V. Schurig. J. Chromatogr., A 906, 2001, pp. 275.
8. B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, Chirality, 8, 1996, pp. 402-407.
9. B. Chankvetadze, L. Chankvetadze, Sh. Sidamonidze, E. Kasashima, E. Yashima and Y. Okamoto, J. Chromatog. A, 787, 1997, pp. 67-77.
10. K. S. S. Dossou, P. Chiap, B. Chankvetadze, A. C. Servais, M. Fillet, J. Crommen. J. Chromatogr. A, 1216, 2009, pp. 7450-7455.
11. Zukowski, J.; Pawlowska, M.; Armstrong, D. W. J. Chromatogr. 1992, 623, pp. 33..
12. B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto. J. Chromatogr., A 670, 1994, pp. 39.
13. D. N. Theodorou, U. W. Suter. Macromolecules 18, 1985, pp. 1467.
14. ლალი ჭანკვეტაძე „სითხური ქრომატოგრაფია“-სალექციო კურსი