ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

მეთორფანის და მისი O-დემეთილ-მეტაბოლიტის შემცველობის ენანტიოსელექტიური შესწავლა სისხლის ნიმუშებში სითხური ქრომატოგრაფია-ტანდემური მას სპექტომეტრიის გამოყენებით

ნაშრომი შესრულებულია ქიმიის მაგისტრის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

დიანა თაგვიაშვილი

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი, ქიმიის დეპარტამენტი

ხელმძღვანელი:

ქიმიის მეცნიერებათა დოქტორი, საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის აკადემიკოსი, ფიზიკური და ანალიზური ქიმიის კათედრის გამგე, სრული პროფესორი - ბეჟან ჭანკვეტაძე

თბილისი

2023 წელი

სარჩევი

ანოტაცია 1
Abstract 2
შესავალი 3
2. ლიტერატურული მიმოხილვა 4
2.1 ნარკოტიკების გამოყენება, ანალიზი და თანამედროვე გამოწვევები 4
2.1.1 ნარკოტიკების ზოგადი მიმოხილვა 4
2.1.2 ნარკოტიკების ანალიზი 8
2.1.3 თანამედროვე გამოწვევები 8
2.2 მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია 9
2.3 ძირითადი ქრომატოგრაფიული მახასიათებლები 11
2.3 მას-სპექტრომეტრიული მეთოდი 14
2.4 ენანტიოსელექტიური სითხური ქრომატოგრაფია და ნარკოტიკების 20
ენანტიოსელექტიური ანალიზი 20
3. ექსპერიმენტული ნაწილი 24
3.1 გამოყენებული სტაციონარული და მოძრავი ფაზა 24
3.2 გამოყენებული აპარატურა 25
3.3 ნიმუშის მომზადება 25
3.4 ნიმუშის ანალიზი და შედეგების დამუშავება 26
4. მიღებული შედეგები და განსჯა 29
5. დასკვნები 34
6. გამოყენებული ლიტერატურა 35
7. დანართი 38

ანოტაცია

ნაშრომის მიზანია ადამიანის სისხლის ნიმუშებში მეთორფანის ენანტიომერებისა და მათი მეტაბოლიტების ენანტიოსელექტიური შესწავლა მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია - ტანდემური მას სპექტომეტრიის გამოყენებით. დღეისათვის სიღრმისეულად არ არის შესწავლილი აღნიშნული საკითხი, რომელსაც დიდი მნიშვნელობა აქვს კრიმინალური ექსპერტიზისათვის. კერძოდ, ეს მეთოდი დაეხმარება ექსპერტს აღმოაჩინოს მეთორფანის ენანტიომერების კვალი ბიოლოგიურ ნიმუშებში და ამის საფუძველზე გააკეთოს შემდგომი დასკვნები.

ნაშრომის მთავარი საკვლევი კითხვა შემდეგნაირადაა დასმული: რამდენად არის შესაძლებელი მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია - ტანდემური მას სპექტრომეტრიის გამოყენები სისხლის ნიმუშებში მეთორფანის ენანტიომერებისა და მათი მეტაბოლიეტბის კვალის განსაზღვრა?

საკვლევ კითხვაზე პასუხის გასაცემად ექსპერიმეტი ჩატარდა გარდაცვლილი ადამიანების სისხლის ნიმუშებზე. რის შედეგების საფუძველზეც, კონტროლირებადი ნარკოტიკული ნივთიერება, ლევომეთორფანი და მისი მეტაბოლიტი ლევორფანოლი, 50 სისხლის ნიმუშიდან 7 მათგანში აღმოჩნდა. არსებულ ინფორმაციაზე დაყრდნობით სავარაუდო არის, რომ სისხლში სწორედ ამ ნივთიერებების არსებობა გახდა მათი სიკვდილის მიზეზი.

ამგვარად, ექსპერიმენტის შედეგად დგინდება, რომ მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია - ტანდემური მას სპექტრომეტრიის გამოყენებით შესაძლებელია სისხლის ნიმუშებში მეთორფანის, მისი ენანტიომერებისა და მათი მეტაბოლიტების განსაზღვრა.

Abstract

This master thesis aims to investigate the enantioselective analysis of methorphan enantiomers and their metabolites in post mortem blood samples utilizing high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The in-depth exploration of this issue has not been undertaken yet, despite its significant importance within the field of forensic toxicology. By employing this method, experts can effectively detect traces of methorphan enantiomers in biological samples, enabling them to draw further conclusions based on these findings.

The central research question addressed in this thesis is: Can the identification of methorphan enantiomers and their metabolites in post mortem blood samples be achieved through the application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry?

To address this research question, an experiment was conducted using post mortem blood samples. The results revealed the presence of the controlled drug, levomethorphan, and its metabolite, levorphanol, in 7 out of 50 blood samples. Based on the available information, it is hypothesized that the presence of these substances in the blood may have contributed to the fatal outcome.

Consequently, the experiment establishes that high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry can successfully identify methorphan, its enantiomers, and their metabolites in post-mortem blood samples.

შესავალი

დღესდღეობით ერთ-ერთ მნიშვნელოვან პრობლემას წარმოადგენს ნარკოტიკების მოხმარება და მისი ანალიზი. ნარკოტიკების მოხმარება ძირითადად რამოდენიმე ფაქტორით არის გამოწვეული, ესენია: სოციალური, ფსიქოლოგიური და ზოგ შემთვევაში ბიოლოგიურიც.

ნარკოტიკების უმრავლესობა არის ქირალური ნივთიერებები და მის ენანტიომერებს სხვადასხვა გავლენა აქვთ ორგანიზმზე. ენანტიომერებს აქვთ მსგავსი ქიმიური ფორმულა და განსხვავდებიან სივრცეში ატომთა ჯგუფის განლაგებით. ენანტიომერების მოქმედება ორგანიზმე შეიძლება მნიშვნელოვნად განსხვავდებოდეს მათი განსხვავებული სივრცული განლაგების გამო, ერთ ენანტიომერს შეიძლება ჰქონდეს სასურველი თერაპიული ეფექტი, თუმცა მეორემ შეიძლება გამოიწვიოს არასასურველი უკუჩვენება. ასევე ენანტიომერები შესაძლებელია სხვაგვარად მეტაბოლიზდეს ორგანიზმში ფერმენტებით, რომლებიც ასევე ქირალურები არიან. მათ შეუძლიათ ამოიცნონ და გარდაქმნან ენანტიომერები განსხვავებული სიჩქარით და მეტაბოლური გზებით. ამან შეიძლება გავლენა მოახდინოს პრეპარატის მოქმედების ხანგრძლივობასა და ინტენსივობაზე, ასევე გავლენა იქონიოს მის მთლიან მეტაბოლიზმზე და ორგანიზმიდან გამოდევნაზე [1].

ნარკოტიკი მეთორფანი (3-მეთოქსი-17-მეთილმორფინანი)არის ქირალური ნაერთი, რომელიც არსებობს ორი ენანტიომერის, დექსტრომეთორფანისა და ლევომეთორფანის, სახით. მათი ფარმაკოლოგიური ეფექტი ერთმანეთისგან ძალიან განსხვავებულია. დექსტრომეთორფანი დაბალი დოზით არის ხველების საწინააღმდეგო საშუალება, ხოლო მაღალი დოზით ჰალუცინოგენი. რაც შეეხება ლევომეთორფანს, იგი მორფინზე ძლიერი ნარკოტიკია. მათ გამოყენებასთან დაკავშირებული საკმაოდ განსხვავებული ფარმაკოლოგიური რისკების გამო აქვთ განსხვავებული სამართლებრივი სტატუსიც, დექსტრომეთორფანი არის ფარმაცევტული ნივთიერება, რომელიც ურეცეპტოდაც კი გაიცემა, ხოლო ლევომეთორფანი კონტროლირებადი ნივთიერებაა. ამიტომ მეთორფანის ენანტიოსელექტიური ანალიზი ბიოლოგიურ ნიმუშებში მნიშვნელოვანი და საჭიროა კრიმინალისტური ექსპერტიზისთვის. მეთორფანის - O-დემეთილირებულ მეტაბოლიტს გააჩნია მნიშვნელოვანი ფარმაკოლოგიური მოქმედება. აქედან გამომდინარე საინტერესოა ერთდროულად გავზომოთ სისხლში როგორც მეთორფანის, ასევე მისი O-დემეთილირებული მეტაბოლიტის კონცენტრაცია. ლევომეთორფანის O-დემეთილირებულ მეტაბოლიტს, ლევორფანოლს, აქვს იგივე თვისებები რაც მორფინს, იწვევს დამოკიდებულებას, ეჩვევა ორგანიზმი და ითხოვს უფრო მეტ დოზას, რთულია მისგან თავის დაღწევა, რადგან

ორგანიზმს აქვს რეაქცია, ითხოვს წამალს, თუმცა ლევორფანოლი მორფინზე 4-5-ჯერ უფრო ძლიერია და აქვს უფრო გრძელი ნახევრადგარდაქმნის პერიოდი. მეთორფანის O-დემეთილირებული მეტაბოლიტის, დექსტრორფანის და ლევორფანოლის რაცემატულ ნარევს ეწოდება რაცემორფანი. ისიც ასევე ნარკოტიკული საშუალებაა და კონტროლირებად ნივთიერებებს მიეკუთვნება მსოფლიო მასშტაბით [2].

2. ლიტერატურული მიმოხილვა

2.1 ნარკოტიკების გამოყენება, ანალიზი და თანამედროვე გამოწვევები

2.1.1 ნარკოტიკების ზოგადი მიმოხილვა

ნარკოტიკებს, იგივე ფსიქოტროპულ საშუალებებს იყენებენ არასამედიცინო მიზნებისთვის. ყველაზე გავრცელებულ ფსიქოტროპულ წამლებს შორისაა: ოპიატები (ოპიუმი, მორფინი და ჰეროინი), ჰალუცინოგენები (LSD, მესკალინი და ფსილოციბინი), ბარბიტურატები, კოკაინი, ამფეტამინები, დამამშვიდებლები და კანაფი. მათ ახასიათებთ მძიმე ფიზიოლოგიური და ფსიქოლოგიური, ასევე სოციალური ეფექტი. ამიტომ ბევრ ქვეყანაში ხდება მათი კონტროლი და რეგულირება.

ოპიატებს ახასიათებთ ტკივილის შემამსუბუქებელი მოქმედება. მას იღებენ ოპიუმის ყაყაჩოს მოუმწიფებელი თესლიდან, რომელიც ბუნებრივად იზრდება ბევრ ქვეყანაში. ოპიუმში 20-ზე მეტი ალკალოიდია აღმოჩენილი და მათგან მხოლოდ რამოდენიმეა ფარმაკოლოგიურად აქტიური. მისი მნიშვნელოვანი შემადგენელი კომპონენტებია: მორფინი (10%), პაპავერინი (1%), კოდეინი (0.5%) და თებაინი (0.2%). აღსანიშნავია რომ პაპავერინი ფარმაკოლოგიურად განსხვავდება ნარკოტიკული აგენტებისგან და არსებითად მოკლებულია გავლენას ცენტრალურ ნერვულ სისტემაზე. კოდეინი ნაკლებად ძლიერია და მას იღებენ მორფინიდან. ასევე მორფინისგან მიიღეს ჰეროინიც, რომელიც მასზე 5-10-ჯერ ძლიერია, “ბაიერში”, გერმანულ კომპანიაში, 1898 წელს. მორფინის და ჰეროინის მიღების შემთხვევაში ორგანიზმი ხდება დამოკიდებული და მას და აქვს მეტის მიღების მოთხოვნილება. ჩამოთვლილი ნარკოტიკული საშუალებები იწვევენ სუნთქვის გაძნელებას და შედეგად უმეტეს შემთხვევაში იწვევენ გულისრევასა და ღებინებას. სწორედ ამიტომ მუდმივად ეძებდნენ სინთეზურ შემცვლელებს, როგორებიცაა: მეპერიდინი(დემეროლი), რომელიც სინთეზირდა გერმანიაში 1939 წელს და მორფინზე 10-ჯერ ნაკლები სიძლიერით ხასიათდება; ალფაპროდინი (ნისენტილი), მორფინზე 5-ჯერ სუსტი, თუმცა მას ახასიათებს სწრაფი მოქმედება; მეთადონი, რომელიც სინთეზირდა გერმანიაში მეორე მსოფლიო ომის დროს, უტოლდება მორფინს;

ლევორფანოლი, მნიშვნელოვანი სინთეზური ნივთიერება, იგი 5-ჯერ აღემატება მორფინის მოქმედებით. ზემოთ ჩამოთვლილი ნარკოტიკული საშუალებებიდან ყველაზე ნაკლებად დამოკიდებულებას იწვევს კოდეინი, ყველაზე მეტად კი ჰეროინი.

ჰალუცინოგენები, ამ ტიპის ნარკოტიკულ საშუალებებს მიეკუთვნება ლსდ-ის ტიპის ნარკოტიკები, რომლებიც იწვევენ ქცევის მკვეთრ ცვლილებას. მათგან ყველაზე მნიშვნელოვანია: დ-ლიზერგინის მჟავა დიეთილამიდი, ყველასთვის ცნობილი როგორც ლსდ-25, მას იღებენ ჭვავის და ხორბლის სოკოსგან; მესკალინი, რომელსაც იღებენ კაქტუსი მესკალისგან, იგი იზრდება აშშ-სა და მექსიკაში; ფსილოციბინი და ფსილოცინი, რომლებიც მიიღება მექსიკური სოკოდან. ჩვეულებრივ ამ ნარკოტიკების მიღებისას წინასწარ ცოდნის გარეშე არ შეუძლიათ განასხვავონ თუ რომელ ნარკოტიკს მოიხმარენ, რადგან ყველა ჩამოთვლილს აქვს ერთნაირი რეაქცია ორგანიზმზე, ისინი იწვევენ წნევის მომატებას, გუგების გაფართოებას, ტვინის აღგზნებას და ა.შ.

ბარბიტურატების დაბალი დოზით მიღება ხსნის შფოთვასა და დაძაბულობას, უმეტეს შემთვევაში არ იწვევს ძილიანობას. პრეპარატის მიღების შემდეგ მომხმარებელი ხდება სოციალური და აქტიური. იშვიათად, ბარბიტურატები იწვევენ არასასურველ რეაქციებს, დაწყებული მარტივი ნერვიულობით, შფოთვით, გულისრევით და დიარეით დამთავრებული ფსიქიკური დაბნევით, ეიფორიით და ბოდვით. დაბალი დოზით მიღება 200 მგ-მდე არ იწვევს დამოკიდებულებას, რასაც ვერ ვიტყვით მაღალ დოზებზე.

კოკაინი არის ალკალოიდი, რომელსაც იღებენ კოკას მცენარის ფოთლებიდან. ეს მცენარე ბუნებრივად იზრდება ბოლივიაში, ჩილესა და პერუში ანდების მთების დასავლეთ ფერდობებზე. კოკაინი მოქმედებს ცენტრალურ ნერვულ სისტემაზე და აღაგზნებს მას. მცირე რაოდენობით მიღებისას ორგანიზმს ათავისუფლებს დაღლილობისგან, გონებას აფხიზლებს და მადას აქვეითებს, ხოლო დიდი რაოდენობით მიღებისას კოკაინი ტოქსიკური ნივთიერებაა და იწვევს დაბნეულობასა და კრუნჩხვებს. კოკაინის ხშირი მოხმარება იწვევს უძილობას, მადის დაკარგვას, დაღლილობას, ძალადობისაკენ მიდრეკილებას, ანტისოციალურ ქმედებებს და ჰალუცინაციებს.

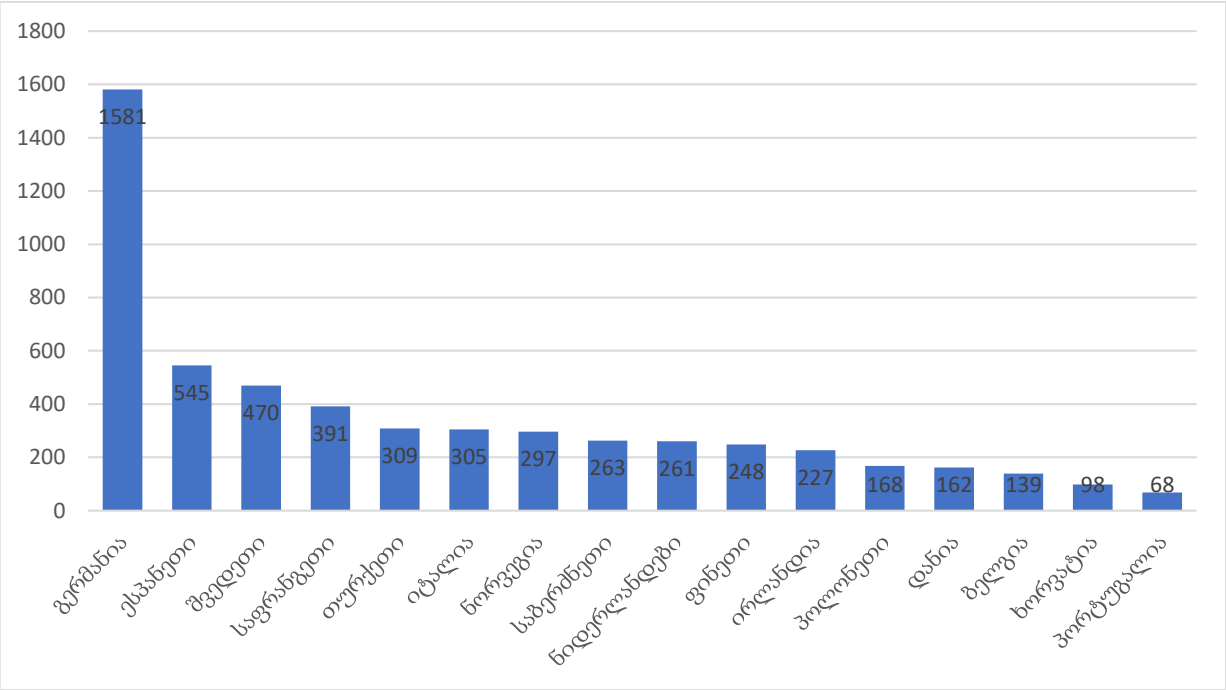
ამფეტამინი (ბენზედრინი), მისი ერთ-ერთი იზომერი (დექსედრინი) და მეტამფეტამინი (მეთედრინი) მოქმედებენ ნერვულ სისტემაზე. ამფეტამინებს იყენებდნენ მედიცინაში დეპრესიის, დაღლილობის, პოსტენცეფალური პარკინსონიზმის, ენურეზის და ორსულებში გულისრევის შესამსუბუქებლად. მეტიც, ამფეტამინს ბარბიტურატთან ერთად იყენებდნენ განწყობის ასამაღლებლადაც. სწორედ მისმა ამ თვისებამ გამოიწვია მისი ფართოდ

გავრცელება და მოხმარება. თუ ორგანიზმი არ არის მიჩვეული წამალს, 50 მგ საკმარისია რომ გამოიწვიოს ჰალუცინაციები და ბოდვა. ზრდასრული ადამიანისთვის, რომელიც არ მოიხმარს ამფეტამინს, სასიკვდილო დოზა არის დაახლოებით 900 მგ, ამ ნივთერებაზე დამოკიდებული ადამიანისთვის კი დღიურ დოზას წარმოადგენს დაახლოებით 1000 მგ. ამფეტამინის დიდი რაოდენობით მოხმარება იწვევს ფსიქოზს, რომელიც ჰგავს შიზოფრენიას. პრეპარატის მიღების შეწყვეტის შემდეგაც კი შეიძლება დიდი ხნით გაგრძელდეს ისეთი სიმპტომები როგორებიცაა: ინიციატივის დაკარგვა, აპათია და ემოციების დათრგუნვა.

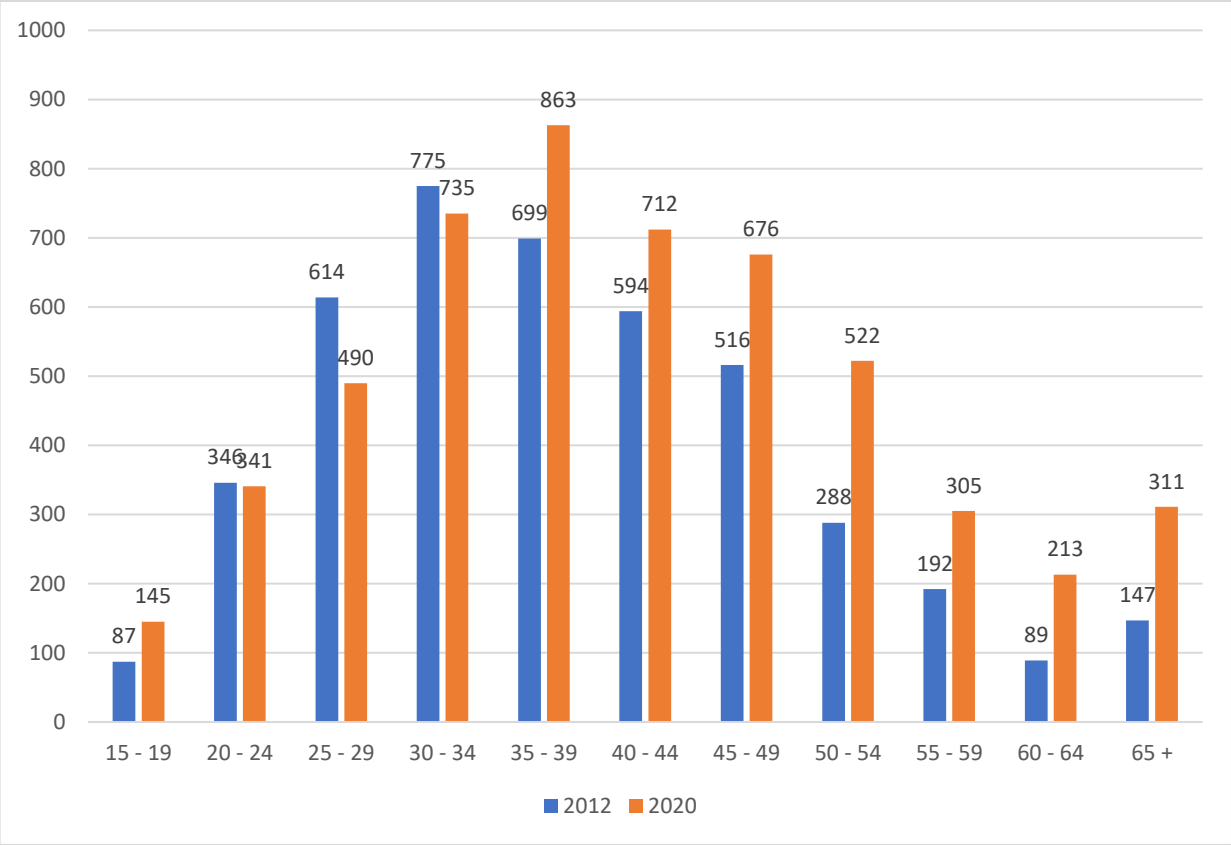
ნარკოტიკების უკანონო მოხმარების ძირითადი გავლენა საზოგადოებაზე უარყოფითია. ნარკოტიკების მოხმარებამ შეიძლება სერიოზული გავლენა მოახდინოს ჯანმრთელობაზე. მაგალითად: კოკაინს შეუძლია ინსულტის გამოწვევა; ამფეტამინს შეუძლია გამოიწვიოს ლეტალური არითმიები ან ჰიპერთერმია პირველი ზემოქმედებისას; კანაფის ქრონიკულმა გამოყენებამ შეიძლება გამოიწვიოს შფოთვა ან დეპრესია. საშიშია ნარკოტიკების არაპირდაპირი ზემოქმედებაც, რაც გულისხმობს ინფექციური დაავადებების გავრცელებას ნარკოტიკების მომხმარებლებს შორის, რაც შემდგომ იწვევს ისეთ დაავადებებს, როგორიცაა: გულ-სისხლძარღვთა დისფუნქციები, ფილტვების დაავადებები, თირკმელების ფუნქციის დარღვევა და ენდოკრინული დისფუნქციები.

ნარკოტიკების უკანონო მოხმარება ასევე მჭიდროდ არის დაკავშირებული დანაშაულთან. ნარკომომხმარებლები ხშირად არღვევენ კანონებს და არაკანონიერად ცდილობენ ნარკოტიკის მოპოვებას. ასევე ნარკოტიკის მოხმარება ზრდის აგრესიას და მიდრეკილებას ძალადობისადმი [1].

ევროპის ქვეყნებში ნაროკტიკებით გამოწვეული სიკვდილიანობის სტატისტიკის სანახავად იხილეთ დიაგრამა 1 და დიაგრამა 2 [3].



დიაგრამა 1. ნარკოტიკებით გამოწვეული სიკვდილიანობა ევროპის ქვეყნებში, 15 - დან 64 წლამდე ასაკის შუალედში, 2020 წელს



დიაგრამა 2. ნარკოტიკებით გამოწვეული სიკვდილიანობა ევროპის ქვეყნებში 2012 და 2020 წლებში ასაკის მიხედვით

2.1.2 ნარკოტიკების ანალიზი

ანალიზური ქიმია გვაძლევს შესაძლებლობას ნარკოტიკების ანალიზისთვის შევიმუშაოთ მეთოდები. ამისათვის თავდაპირველად უნდა მოვიძიოთ ინფორმაცია საანალიზო ნივთიერების შესახებ, უნდა ვიცოდეთ მისი სტრუქტურა და ფიზიკურქიმიური თვისებები. სწორად უნდა შევარჩიოთ გამხსნელი, მოძრავი ფაზა, დეტექტორი. მნიშვნელოვანი საფეხურია ნიმუშის დამუშავება საანალიზოდ, რომელიც შეიძლება მოიცავდეს ცენტრიფუგირებასა და გაფილტვრას. ყველა ეს და სხვა მრავალი ფაქტორი უნდა იყოს გათვალისწინებული, ოპტიმიზირებული, დამტკიცებული. მხოლოდ ამის შემდეგ შევძლებთ მეთოდის გამოყენებას. ანალიზური მეთოდები მოიცავს: სპექტროფოტომეტრიულ მეთოდს, კოლორიმეტრიულ მეთოდსა და ქრომატოგრაფიულ მეთოდს.

მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია არის ყველაზე ხშირად გამოყენებული მეთოდი ნარკოტიკების რაოდენობრივი ანალიზისთვის. მისი უპირატესობა სვეტის ქრომატოგრაფიასთან შედარებით არის გაუმჯობესებული გარჩევითობა, უფრო სწრაფი დაყოფა და გაზრდილი სიზუსტე და მგრძნობელობა. ამ მეთოდის შემუშავებისა და შესაბამისი სვეტის შესარჩევად, ანალიტიკოსმა უნდა იცოდეს: წამლისთვის შესაფერისი გამხსნელი, მოლეკულური სტრუქტურა, ნივთიერების ბუნება [4].

2.1.3 თანამედროვე გამოწვევები

თანამედროვე გამოწვევები ნარკოტიკებთან დაკავშირებით თანდათან მატულობს. ბოლო წლებში ბევრ ქვეყანაში აქტუალურია ოპიოიდური კრიზისი. მაგალითად, ამერიკის შეერთებულ შტატებში ოპიოიდების ზედოზირებით დღეში დაახლოებით 91 ადამიანი იღუპება, აქედან დაახლოებით 40% მოდის ექიმის მიერ დანიშნულ ოპიოიდებზე [5]. ზედოზირების მაღალი პროცენტია ასევე სხვა სახის ნარკოტიკებზეც. ასევე, მასშტაბურ პრობლემას წარმოადგენს ნარკოტიკების არაპირდაპირი მოხმარება, რაც გულისხმობს ინექციური გზით მოხმარების შედეგად ინფექციური დაავადებების გავრცელებას. ამის მაგალითია, აივ ინფექცია, რამაც შეიძლება სიკვდილიც კი გამოიწვიოს იმუნური დეფიციტის ფონზე სხვა დაავადებების განვითარების გამო; B ჰეპატიტი, რომელიც ღვიძლის ინფექციური დაავადებაა და არის დიდი რისკი რომ გადაიზარდოს ქრონიკულ მდგომარეობაში; C ჰეპატიტი, რომელიც ასევე გადადის ქრონიკულ ფორმაში და ზოგ შემთხვევაში იწვევს ღვიძლის ციროზსა და კიბოს. ბოლო წლებში უმეტეს ქვეყანაში აქტიურად დაიწყეს ამ საკითხებზე მუშაობა და გარდა კანონის ფარგლებში ნარკოტიკების წინააღმდეგ ბრძოლისა,

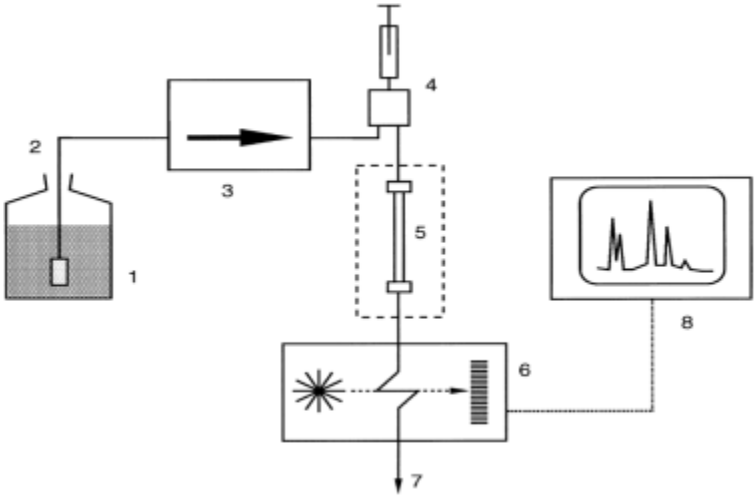
დაიწყეს პრევენციული სამუშაოები, როგორიცაა მაგალითად საზოგადოებაში ინფორმაციის გავრცელება, მხარდამჭერი ჯგუფების ჩამოყალიბება და სხვა [6].

2.2 მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია

სითხური ქრომატოგრაფიის განვითარება დაიწყო XX საუკუნის 50-იან წლებში და მალევე იგი ორგანული ნივთიერებების დაყოფისა და ანალიზის საყოველთაოდ აღიარებული მეთოდი გახდა. მოგვიანებით კი განვითარდა მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია, რომელმაც როგორც თხელფენოვანი და ქაღალდის ქრომატოგრაფია, ასევე გაზური ქრომატოგრაფიაც ჩამოიტოვა. მისი სწრაფი განვითარება განაპირობა საკვლევი ნივთიერებების მოლეკულური მასების ფართო სპექტრმა. მაგალითად, თუ გაზური ქრომატოგრაფიით შესაძლებელია 500-600 ნ.ე. მასის მქონდე ნივთიერებების ნარევის დაყოფა, მესქ-ის გამოყენებით ეს რიცხვი მილიონამდე იზრდება და მათ შორისაა პოლიმერების რთული მაკრომოლეკულები, ნუკლეინის მჟავები, ცილები და სხვა რთული ნაერთები. აღსანიშნავია რომ ეს მეთოდი გვაძლევს შესაძლებლობას დაყოფა განვახორციელოთ ოთახის ტემპერატურაზე, ჰაერთან კონტაქტის გარეშე, რაც მნიშვნელოვანია ისეთი ნაერთების კვლევისას, როგორებიცაა ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებები და ბიოპოლიმერები.

ნახ.1 წარმოდგენილია მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფის სქემა. მოძრავი ფაზა გამხსნელების რეზერვუარიდან (1) ტუმბოს (3) საშუალებით გადაადგილდება სისტემაში, სადაც უზრუნველყოფს საანალიზო ნიმუშის (4) გავლას ქრომატოგრაფიულ სვეტში (5). სვეტზე იყოფა ნარევი მის შემადგენელ კომპონენტებად, დეტექტორის (6) საშუალებით კი სვეტიდან გამოსული ცალკეული კომპონენტები რეგისტრირდება, საბოლოო შედეგი კი კომპიუტერის საშუალებით იწერება გაუსის მრუდის სახით, სადაც აბსცისათა ღერძზე გადაზომილია დრო, ორდინატთა ღერძზე კი სიგნალის ინტენსივობა. ამგვარად ჩაწერილ სურათს ვუწოდებთ ქრომატოგრამას, რომელიც გაზომილი სიგნალის ინტენსივობის დროზე დამოკიდებულების გრაფიკია. ნივთიერებათა იდენტიფიკაცია შეგვიძლია მიღებული პიკის რეგისტრაციის დროითა და ფართობით, ასევე შეგვიძლია მათი კონცენტრაციის შეფასება. შესაბამისად, მოცემული ინსტუმენტული მეთოდი იძლევა იმის საშუალებას, რომ ჩავატაროთ როგორც თვისობრივი, ასევე რაოდენობრივი ანალიზი. ქრომატოგრამაზე პიკების განაწილება ხდება მარცხნიდან მარჯვნივ შეკავების დროის ზრდის მიხედვით, რაც ნიშნავს რომ პირველი პიკი იმ კომპონენტს შეესაბამება, რომელიც ყველაზე პირველი ელუირდება სვეტიდან, ბოლო პიკი კი მას, რომელიც ყველაზე გვიან ელუირდება.

რაც შეეხება ქრომატოგრაფიულ სვეტს, ის არის ცილინდრული მილი, რომელიც შევსებულია მცირე ზომის, 1,5-5 მკმ დიამეტრის, სფერული ნაწილაკებით. ეს ნაწილაკები ძირითადად სხვადასხვაგვარად მოდიფიცირებული ფოროვანი სილიკაგელია.



ნახაზი 1. მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფის სქემა

1-გამხსნელის რეზერვუარი, 2-გამხსნელის გამანაწილებელი, 3-ტუმბო, 4-ნიმუშის შესაყვანი სისტემა, 5-სვეტი თერმოსტატით, 6-დეტექტორი, 7-ნარჩენები, 8-მონაცემთა დამუშავების ბლოკი.

სითხური ქრომატოგრაფია ენანტიომერული ანალიზის ერთ-ერთი უძლიერესი მეთოდია, როგორც ანალიზური, ისე პრეპარატული დაყოფისათვის. ეს მეთოდი, გაზური ქრომატოგრაფიისგან განსხვავებით, შესაძლებლობას იძლევა გავაანალიზოთ არააქროლადი და თერმოლაბილური ნივთიერებები. ენანტიომერულ ანალიზში იყენებენ როგორც ნორმალურ/პირდაპირ, ისე შებრუნებულფაზიან ქრომატოგრაფიას, პოლარულ ორგანულ მოძრავ ფაზებს. დღეისათვის 200-მდე ქირალური უძრავი ფაზაა აღწერილი ლიტერატურაში, თუმცა ოპტიმალური სტაციონარული ფაზა არ არსებობს, თითოეული ქირალური ნივთიერების ენანტიომერების ქრომატოგრაფიული დაყოფისათვის საჭიროა სელექტორისა და მოძრავის ფაზის უშუალოდ საკვლევ კომპონენტზე მორგება.

მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია მრავალ დარგში გამოიყენება როგორც ანალიზის მეთოდი. ცნობილია რომ, სამკურნალწამლო საშუალებების მნიშვნელოვანი ნაწილი

ქირალური ბუნებისაა და შესაბამისად, სანამ ბაზარზე გავა უნდა შემოწმდეს, რადგან იმ შემთხვევაში თუ მასში აღმოჩნდება მავნე ზემოქმედების ენანტიომერი მოაცილონ.

მესქ-ს ძირითადად შემდეგი ტიპის ანალიზებისათვის იყენებენ:

1. ენანტიომერების დასაყოფად;

2. ფარმაცევტულ საშუალებებში მოქმედი ნივთიერებების და მინარევების განსასაზღვრად;

3. ამინომჟავების განსასაზღვრად;

4. პესტიციდების რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის კვების პროდუქტებში, ჩამდინარე და სასმელ წყლებში;

5. კვების პროდუქტებში ნარჩენი ანტიბიოტიკების, აფლატოქსინებისა და სხვა ტოქსიკური ნივთიერებების განსასაზღვრად;

6. კვების პროდუქტებში საკვებდანამატების, როგორებიცაა ვიტამინები, არომატიზატორები, სტაბილიზატორები, ემულგატორები და სხვა, რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის;

7. ბიოლოგიურ მატრიცებში სამკურნალო საშუალებებისა და მათი მეტაბოლიტების, ნარკოტიკული საშუალებებისა და მათი მეტაბოლიტების, ტოქსიკური ნივთიერებებისა და მათი მეტაბოლიტების განსაზღვირსთვის.

2.3 ძირითადი ქრომატოგრაფიული მახასიათებლები

ნიმუში - ეს არის საანალიზო ნივთიერება, ან ნივთიერებათა ნარევი.

უძრავი (სტაციონარული) ფაზა - განსაზღვრული შედგენილობის და სტრუქტურის მასალა., რომელსაც აქვს ადსორბციული უნარი. მასზე საანალიზო კომპონენტების შეკავება ხდება განსხვავებული დროით.

მოძრავი ფაზა (ელუენტი) - ეს არის ორგანული ან არაორგანული გამხსნელი, ან მათი ნარევი. ქრომატოგრაფიული ანალიზის პროცესში მისი მიწოდება ხდება უწყვეტად. სწორედ მოძრავი ფაზის საშუალებით გადაადგილდებიან სისტემაში კომპონენტები ინიცირების მომენტიდან.

მოძრავი ფაზა არსებობს პოლარული და არაპოლარული ბუნების და მისი შერჩევა დამოკიდებულია შესასრულებელ ამოცანაზე.

ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი პარამეტრი ქრომატოგრამაზე არის შეკავების დრო. იგი ნივთიერების თვისებრივი მახასიათებელია და მისი გამოყენება შესაძლებელია ნივთიერების გამოსაცნობად. სინათლის ინტენსივობა კი ნიმუშში არსებული მოცემული კომპონენტის რაოდენობაზეა დამოკიდებული და რაოდენობის საზომად შეგვიძლია მისი საგმოყენება.

ქრომატოგრამის ძირითადი მახასიათებლები:

შეკავების დრო t_R - არის დროის მონაკვეთი ნიმუშის სვეტში შეყვანის მომენტიდან დეტექტორში გავლის ჩათვლით. ქრომატოგრამაზე მას შეესაბამება პიკის მაქსიმუმის მართობი აბსცისათა ღერძზე. საანალიზო ნივთიერების ყველა კომპონენტს აქვს სხვადასხვა შეკავების დრო, რომელიც არაა დამოკიდებული ნიმუშის რაოდენობაზე, სამაგიეროდ t_R მოძრავი ფაზის წრფივი სიჩქარის ფუნქციაა, იგი სვეტის სიგრძეზეა დამოკიდებული. მისი გამოთვლა შეიძლება ფორმულით:

$$t_R = t_o + t_R^{/}$$

t_0 - არაადსორბირებადი კომპონენტის ელუირების დრო;

$t_R^{/}$ არის სტაციონარულ ფაზაზე ყოფნის დრო კომოპონენტისთვის.

შეკავების მოცულობა V_R - შეკავების ზოგადი პარამეტრია, ის მოძრავი ფაზის მილილიტრების რიცხვია, რომელიც უნდა გავატაროთ სვეტში, რათა ნიმუში ელუირდეს. იგი გამოითვლება ფორმულით:

$$V_R = F \times t_R$$

სადაც F - მოძრავი ფაზის მოცულობითი სიჩქარეა (მლ/წ). სითხეების არაკუმშვადობის გამო F=v სადაც v მოძრავი ფაზის ხაზოვანი სიჩქარეა. **სვეტის მკვდარი მოცულობა** V_M – არის სვეტში მოძრავი ფაზის საერთო მოცულობა დეტექტორის ფანჯრის (კიუვეტის მოცულობის) ჩათვლით .

$$V_M = t_0 \times F$$

შეეკავების ფაქტორი k – არის შეკავების ძირითადი პარამეტრი და უფრო მისაღებია ნივთიერების დახასიათება მის მიხედვით, რადგან ის არაა დამოკიდებული მოძრავი ფაზის

სიჩქარეზე და სვეტის სიგრძეზე. თუ მოძრავი ფაზა ნელა გადაადგილდება ან სვეტი გრძელია მაშინ ერთნაირად იზრდება t0 და შესაბამისად t_R -იც.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

სხვაგვარად რომ ვთქავთ, k წარმოადგენს ნივთიერების მოლური კონცენტრაციების ფარდობას სტაციონარულ და მოძრავ ფაზებში. სასურველია პარამეტრი k იყოს 1÷5 შუალედში, თუ k<1 ნიშნავს, რომ ნიმუშმა სვეტი ძალიან მალე გაიარა ანუ არ შეკავდა სტაციონარულ ფაზაზე, ხოლო თუ k>5 ნიშნავს, რომ ანალიზს სჭირდება დიდი დრო, რაც კომერციული და სხვა ფაქტორების თვალსაზრისით არაა სასურველი. თუ ადსორბენტი წვრილფოროვანია მაშინ k-ს აქვს დიდი მნიშვნელობა, ნაკლებად ფოროვან და უფორო ადსორბენტებზე k მცირეა.

დაყოფის ფაქტორი ანუ სელექტიურობა α - შეკავების ფაქტორების ფარდობაა, შესაბამისად თუ კომპონენტებს აქვთ ერთნაირი k-ს მნიშვნელობა ისინი ვერ დაიყოფა.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

სადაც k2>k1 თუ α=1, ნიშნავს რომ ნარევი არ დაიყო. α-ზე გავლენას ახდენს სტაციონარული და მოძრავი ფაზები, მათი ცვლილებით α იცვლება.

გარჩევითობა Rs - არის პარამეტრი, რომელიც გვიჩვენებს ორი მეზობელი პიკის გარჩევის, გამიჯვნის დონეს. ის გამოითვლება მეზობელი პიკების მაქსიმუმებს შორის მანძილის ფარდობით პიკების სიგანეების ჯამთან:

$$R_s = 2\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_z + W_2}$$

$$\text{ან} \quad R_s = 1.18\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{\frac{1}{2}(1)} + W_{\frac{1}{2}(2)}}$$

სადაც W არის პიკის სიგანე ფუძესთან ხოლო W(1/2) არის პიკის სიგანე პიკის ნახევარ სიგანეზე. თუ Rs=1.25 მაშინ დაყოფა სრულია, თუ Rs>1.5 ნიშნავს, რომ ანალიზს სჭირდება დიდი დრო. ხოლო თუ Rs<1.25 ნიშნავს, რომ პიკები ან არ დაიყო საერთოდ ან დაიყო ნაწილობრივ(არაფუძისეულად).

თეორიული თეფშების რიცხვი N - ამ პარამეტრით ფასდება სვეტის ეფექტურობა. სვეტი არის გარკვეული სიგრძის და დიამეტრის მქონე მეტალის მილი, რომელშიც ჩატვირთულია

სტაციონარული ფაზა. ქრომატოგრაფში ის თერმოსტატის ბლოკშია მოთავსებული და სწორედ მისი საშუალებით ხდება დაყოფის პროცესის ჩატარება. ცნება თეორიული თეფში აღებულია გადადენის თეორიიდან. ქრომატოგრაფიული სვეტის მათემატიკური 11 ეკვივალენტი წარმოადგენს სვეტს თეფშებით, რომელთაგან თითოეულზე ხდება კომპონენტის წონასწორული განაწილება თეფშსა და მოძრავ ფაზას შორის. თეორიული თეფშების რიცხვი დამოკიდებულია სვეტის სიგრძეზე. მისი გამოთვლა შეიძლება ორი გზით:

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

$$\text{ან } \boldsymbol{N = 5.54(\frac{t_R}{W_{\frac{1}{2}}})^2}$$

$$\boldsymbol{N = \frac{L}{H}}$$

სადაც L არის სვეტის სიგრძე, H არის თეორიული თეფშების ექვივალენტური სიმაღლე.

თეორიული თეფშების ექვივალენტური სიმაღლე H – არის მანძილი, რომელზედაც მიიღწევა ქრომატოგრაფიული წონასწორობა. ის უკუპროპორციულ დამოკიდებულებაშია თეორიული თეფშების რიცხვთან.

$$\boldsymbol{H = \frac{L}{N}}$$

თეორიული თეფშების ექვივალენტური სიმაღლე უკავშირდება ვან-დეემტერის განტოლებას:

$$\boldsymbol{H = A + \frac{B}{U} + CU}$$

სადაც u არის მოძრავი ფაზის სიჩქარე, A - გრიგალისებური დიფუზია; B - დიფუზია ქრომატოგრაფიული სვეტის გასწვრივ (ლონგიტუდინალური დიფუზია); C - მასის გადატანა [7,8].

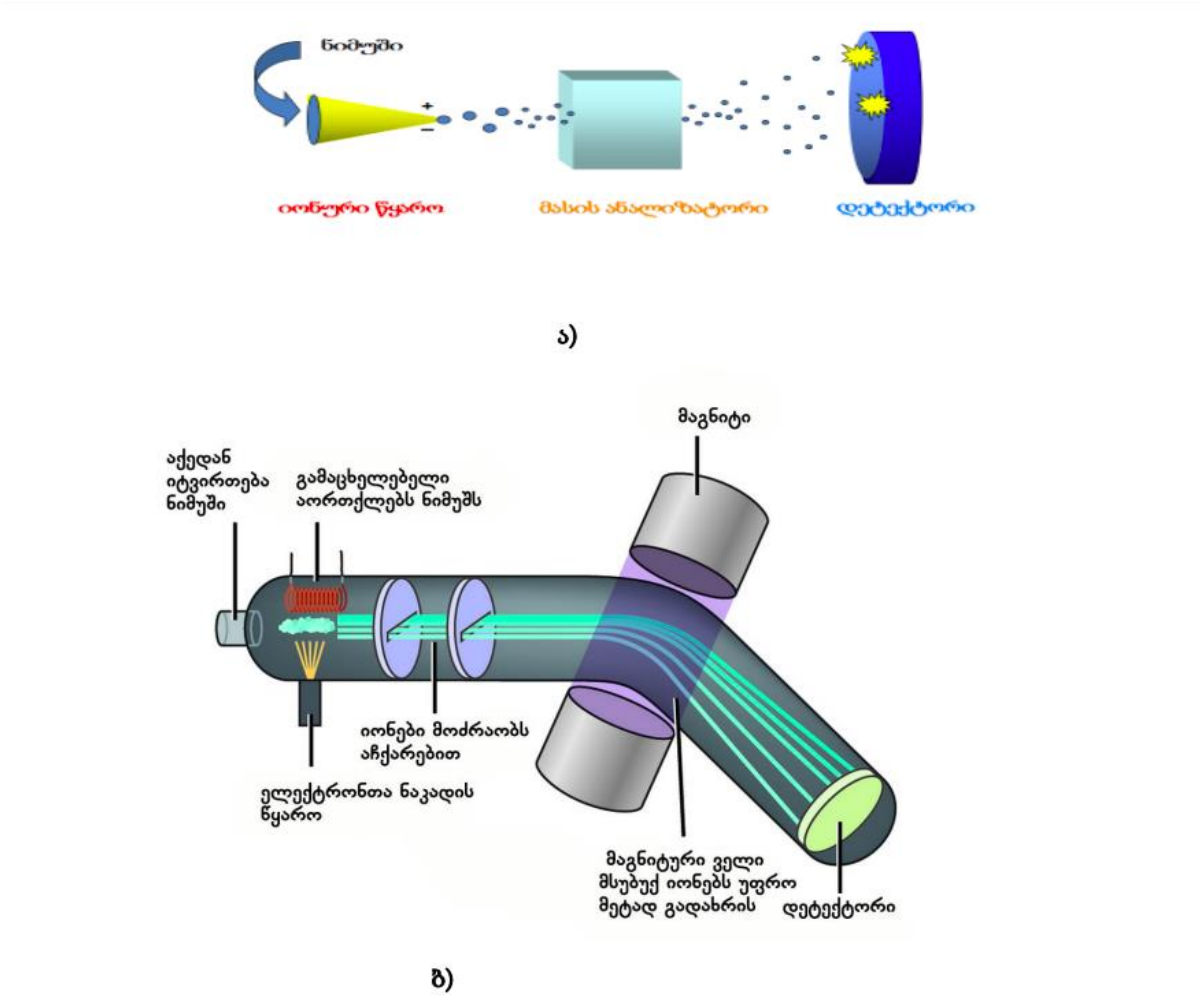
2.3 მას-სპექტრომეტრიული მეთოდი

მას სპექტრომეტრია ეს არის ანალიზური მეთოდი, რომელიც გვაძლევს შესაძლებლობას განვსაზღვროთ ნიმუშების მოლეკულური ან ატომური მასები. მოცემულ მეთოდი მოიცავს იონების წარმოქმნას, დაყოფასა და დახასიათებას მათი ფარდობითი მასების მიხედვით, როგორც მუხტის ფუნქცია, გაზურ ფაზაში. ამ მეთოდითა და თანამედროვე იონიზაციური ტექნიკის გამოყენებით, ნიმუშის ორთქლის მდგომარეობაში გადაყვანის გარეშე,

შესაძლებელია არააქროლადი მოლეკულების, ცილებისა და ნუკლეოტიდების გამოკვლევა. მეთოდი გამოირჩმძლავრია თვისობრივი და რაოდენობრივი ანალიზისთვის. მას იყენებენ: მედიცინაში, კრიმინალისტიკაში, მოლეკულურ ბიოლოგიაში, გეოლოგიაში, მეტალურგიაში, არქეოლოგიაში და ა.შ. მეთოდი გამოიყენება ჩვენთვის უცნობი მოლეკულების და ნაერთების ქიმიური ფორმულების და სტრუქტურის დასადგენადმას სპექტრომეტრიაში ელექტრონების ნაკადით ხდება აირადი ნიმუშების ბომბარდირება, რის შედეგადაც საწყისი ნივთიერებებიდან წარმოიქმნება იონიზირებული მოლეკულები და ფრაგმენტები. ამის შემდეგ, ამაჩქარებელი ძაბვის ელექტროდით გაზის ნაკადიდან გამოიწოვება ნაწილაკების ნაკადი და იყოფა იონების მასის მათ მუხტთან (m/z) ფარდობის შესაბამისად. შედეგად ვიღებთ მას სპექტრომეტრის მიერ დარეგისტრირებულ დამუხტული ნაწილაკების განაწილებას მასის მიხედვით და მის შესაბამის პიკების ფარდობით ინტენსივობას. ამგვარად ვიღებთ მას-სპექტრს, რომლისგანაც ვიღებთ ინფორმაციას საკვლევი მოლეკულების შესახებ. მას სპექტრის შესწავლით შესაძლებელია განვსაზღვროთ მოლეკულის ზუსტი ფორმულები და მისი ზუსტი მასები. ზოგ შემთხვევაში შესაძლებელია ნივთიერების სტრუქტურის გაშიფვრაც. მოცემული მეთოდი ზუსტი და მგრძნობიარეა.

მას სპექტომეტრი ასრულებს სამ ფუნქციას:

1. იონების წარმოქმნა - ნიმუშის მოლეკულების იონებად გარდაქმნა ხდება ნიმუშზე ელექტრონების მარალი ენერგიის სხივის დაცემით.
2. იონების დაყოფა - ელექტრულ ველში იონები განიცდიან აჩქარებას და ხვდებიან მაგნიტურ ველში, აქ კი ნეიტრალური ნაწილაკები მოძრაობის მიმართულებას არ იცვლიან, იონები კი შეიცვლიან მოძრაობის ტრაქეტორიას და დაიყოფიან მასა-მუხტის ფარდობის შესაბამისად.
3. იონების დეტექტირება - სპექტრომეტრი დაყოფილ იონებს თვისებითად და რაოდენობითად აფასებს.



ნახაზი 2. მას-სპექტრომეტრის პრინციპული სქემები

ნიმუშს, რომელიც შეიცავს ჩვენთვის საინტერესო ატომებსა და მოლეკულებს, ვათავსებთ მასურ სპექტრომეტრში, სადაც წყალში ან ორგანულ გამხსნელში გახსნილი ნიმუში ორთქლდება გამაცხელებლით და შემდეგ ორთქლადქცეული "იბომბება" მაღალენერგეტიკული ელექტრონებით, რომლებსაც გააჩნიათ საკმარისი ენერგია ატომებიდან ელექტრონების მოსახლეჩად, რის შედეგადაც მიიღება დადებითად დამუხტული იონები. მიღებული იონები აჩქარდებიან და ელექტრული ფირფიტების გავლით გადაიხრებიან მაგნიტურ ველში. გადახრა დამოკიდებულია იონის მუხტსა და სიჩქარეზე, შესაბამისად ნელა მოძრავი იონები ნაკლებად გადაიხრებიან, სწრაფად მოძრავები კი მეტად. ამის გარდა, მაგნიტური ველი მაღალი მუხტის მქონე იონებს უფრო მეტად გადახრის, ვიდრე დაბალი მუხტისას.

იონის გადახრის ხარისხი მაგნიტურ ველში მისი მასისა და მუხტის ფარდობის უკუპროპორციულია - m/z, აქ m - იონის მასაა, z - კი მისი მუხტი. გადახრის შემდეგ იონები მიაღწევენ დეტექტორს, რომელიც ზომავს ორ სიდიდეს: თითოეუული იონისთვის m/z

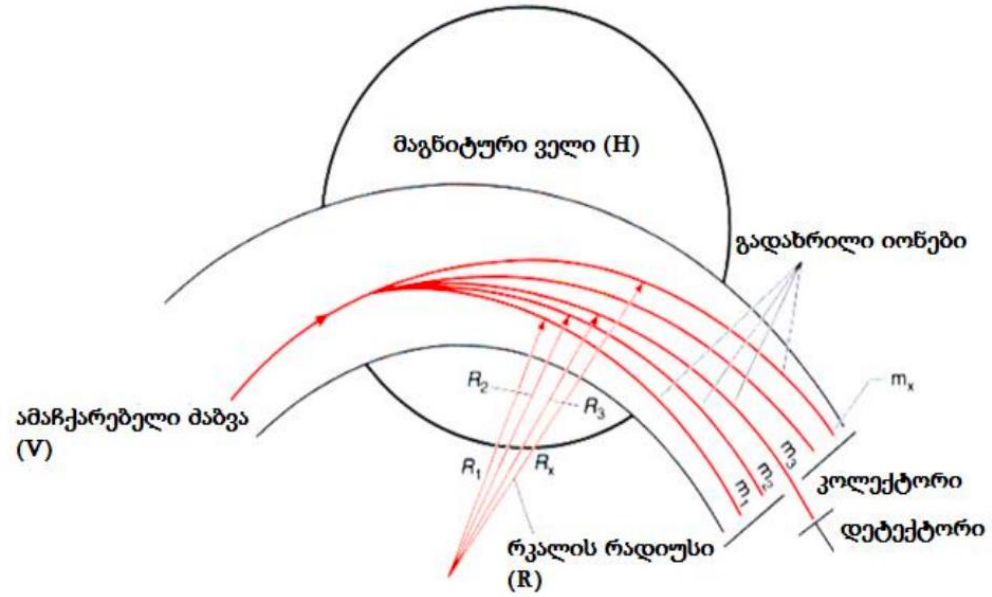
თანაფარდობასა და იმას თუ რამდენი იონია კონკრეტული m/z თანაფარდობით. ნიმუშში შემავალი კონკრეტული იონის ფარდობითი შემცველოობის დათვლა ხდება შემდეგნაირად: კონკრეტული m/z თანაფარდობის მქონე იონების რაოდენობა იყოფა იმ იონების მთლიან რაოდენობაზე, რომელიც შევიდა დეტექტორში. საბოლოოდ ხელსაწყო გვაძლევს სპექტრს, რომელიც ფარდობით შემცველობასა და m/z - შორის დამოკიდებულებას ასახავს გრაფიკულად.

მას სპექტრომეტრულ ანალიზებში გამოიყენება რამოდენიმე სახის იონური წყაროები, ესენია: ელექტრონული იონიზაციის, სწრაფი ატომური ბომბარდირების, ქიმიური იონიზაციის, მატრიცული ლაზერული დესორბცია/იონიზაცია და იონიზაცია ელექტროგაფრქვევით.

მას - ანალიზატორებად გამოიყენება: კვადროპოლური, ელექტრული სექტორის ველის, მაგნიტური სექტორის ველის, იონ ციკლოტრონული რეზონანსული და კვადრუპოლური იონური ჩაჭერის მასს ანალიზატორი.

დეტექტორებად გამოიყენება: ელექტრონული გამამრავლებელი, ფარადეის ცილინდრი, მრავალარციანი ფირფიტა და ფოტოგამაძლიერებელი იგივე სცინტილაციური მთვლელი.

არსებობს ერთფოკუსიანი და ორმაგი ფოკუსირების მას სპექტრომეტრები. განვიხილოთ ერთფოკუსიანი მას სპექტომეტრი, რომლის სქემაც მოცემულია ნახზზე 3. ნიმუში შეგვყავს მცირე რაოდენობით, რომელიც მაღალი ვაკუუმის ქვეშ ორთქლდება, რის შემდეგაც 25 – 80 ელექტრონვოლტის ენერგიის ელექტრონებით ბომბარდირდება. ელექტრონი დაეცემა მოლეკულას და წარმოიქმნება იონი. ამ მოცემულ პოტენციალზე დეტექტორის მიმართულებით გადანაცვლების სწორი რადიუსი ექნება მხოლოდ ერთი გარკვეული მასის მქონდე იონს მაგნიტში გასავლელად , ხოლო “არასწორი” მასის მქონე ნაწილაკები შეეჯახებიან მაგნიტს. თითოეული იონი აჩქარდება პოტენციალთა სხვაობის ცვლილებით, სხვადასხვა მასების გარჩევა კი მოხდება მაფოკუსირებელი მაგნიტით. დეტექტორი, რომელიც არის მთვლელი, მასზე დაცემული იონების პროპორციულ დენს წარმოქმნის. ამ მონაცემების დამუშავება კი ხდება კომოიუტერში მას სპექტრის გრაფიკული ანალიზისთვის.



ნახაზი 3. ერთფოკუსიანი მას სპექტრომეტრის პრინციპული სქემა.

მას სპექტრომეტრული ხელსაწყოს გარჩევითობას გვიჩვენებს პიკების სიგანე. მასების გარჩევითობა ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი პარამეტრია მას სპექტრების განსჯისთვის. ხელსაწყო და მასის სისწორე უკეთესია, თუ მეტი აქვს გარჩევითობა. გარჩევითობა განისაზღვრება ფორმულით R = M/ΔM, სადაც M საანალიზო ნაწილაკი მასაა, ΔM კი განსხვავება მასებს შორის, M-სა და მის შემდეგ უფრო მაღალი მასის მქონე ნაწილაკს შორის, რომელიც იყოფა. R სიდიდის, დაახლოებით 2000 მნიშვნელობით, წარმოქმნა შეუძლიათ დაბალი გარჩევითობის ინსტრუმეტებსაც. თუ გვჭირდება უფრო მაღალი გარჩევითობა, ამ შემთხვევაში, ერთფოკუსიან მას სპექტრომეტრზე შესრულებული იონების დაუმთავრებელი დაყოფა შეგვიძლია ჩავატაროთ ორმაგი ფოკუსირების მას სპექტრომეტრზე. მსგავს სპექტრომეტრებში მაფოკუსირებელი მაგნიტიდან შერჩეული იონები ფოკუსირდებიან ახლიდან ელექტროსტატიკური ანალიზატორით, სადაც ხდება იდენტური მასის იონების დაყოფა განსხვავებული ენერგიების საფუძველზე.მეორადი ფოკუსირების დროს გარჩევითობა იზრდება, თუმცა მცირდება მგრძნობიარობა, რადგან "იკარგება" მეტი იონი.

მას-სპექტრი - ეს არის იონის ფარდობითი შემცველობის მასა/მუხტი (m/e) ფარდობაზე დამოკიდებულება.

მას სპექტრში ყველაზე მაღალ პიკს ეწოდება ძირითადი პიკი, ამ პიკს კი იძლევა იონიზაციის პროცესში წარმოქმნილი ყველაზე მაღალი შემცველობის იონი. სხვა დანარჩენი პიკის ინტენსიურობა ფარდობითი სიდიდეა ძირითადი პიკის პროცენტული შემცველობის მიმართ. იონიზაციისას თუ მოლეკულა მხოლოდ ერთ ელექრონს კარგავს, მაშინ დაიკვირვება

მოლეკულური იონი, რომელიც მის მოლეკულურ წონას გვაძლევს და სპექტრზე აღინიშნება M^+-ით. როდესაც მოლეკულა სავალენტო ელექტრონს კარგავს, ბმები წყდება ე.ი. იონი სწრაფად წარმოქმნის ფრაგმენტს დაბალი ენერგიის იონებისკენ. სპექტრომეტრი არეგისტრირებს დამუხტული იონების მასებს, როგორც იონების ფრაგმენტებს. აღსანიშნავია, რომ ნეიტრალური ფრაგმენტები არ რეგისტრირდება.

მოლეკულური იონი და ფრაგმენტაცია. როდესაც ორგანული ნაერთის მოლეკულა დაიბომბემა ნივთიერების იონიზაციის პირველი პოტენციალის ეკვივალენტური ენერგიის მქონე ელექტრონებით, მოლეკულას მოწყდება ელექტრონი:

$M: + e^- \rightarrow M.^+ + 2e^-$

ელექტრონის მოხლეჩას ეწოდება იონიზაცია, მიღებულ ნაწილაკს კი $M.^+$-მოლეკულური იონი. მას აქვს ერთი გაუწყვილებელი ელექტრონი და დადებითი მუხტი აქვს, ე.ი. ის კატიონ-რადიკალია. თუ ელექტრონის მასა ჩავთვლით ნულის ტოლად, მაშინ მოლეკულური იონის მასა გაუტოლდება იმ მოლეკულის მასა, რომელსაც მოსწყდა ელექტრონი. მაგრამ, თუ მოლეკულა უფრო დიდი ენერგიის ელექტრონებით დაიბომბემა, მაშინ მოლეკულური იონი შეიძენს ისეთი რაოდენობის ენერგიას, რომელიც გაწყვეტს ბმებს. ამის შედეგად მოლეკულური იონი დაიშლება უფრო მცირე ზომის ფრაგმენტებად: რადიკალებადა და კატიონებად. სწორედ ამ პროცესს ეწოდება ფრაგმენტაცია. ბმების გაწყვეტასთან ერთად ხდება შიგამოლეკულური გადაჯგუფებაც და შესაბამისად მიიღება გადაჯგუფებული იონები და რადიკალები.

მაღალი ენერგიის ელექტრონებით დაბომბვისას მოლეკულა მცირე ზომის დამუხტულ იონებად და ნეიტრალურ რადიკალებად იშლება. როგორც უკვე აღვნიშნეთ, მას სპექტრომეტრზე მხოლოდ დამუხტული ნაწილაკები რეგისტრირდება. იმისათვის რომ დავადგინოთ მოლეკულური მასა, ამისათვის საჭიროა მას სპექტრში მოვძებნოთ მოლეკულური იონის პიკი, რომლის m/z მნიშვნელობა ნივთიერების მოლეკულურ მასას შეესაბამება. მოლეკულური იონის პიკის ინტენსიურობა მოლეკულური იონის სტაბილურობაზეა დამოკიდებული. ფრაგმენტაციის დროს იონის პიკის ინტენსიურობა მცირდება, მოლეკულის იონიზაციის დროს პიკის კი ინტენსიურობა იზრდება. შესაბამისად, ყველაზე ინტენსიური პიკი ყოველთვის მოლეკულურ იონს არ შეესაბამება. თუ ფრაგმენტაციისას უფრო მდგრადი კარბ-კატიონი წარმოიქმნება, მაშინ მოლეკულური იონის პიკს უფრო მცირე ინტენსივობა აქვს. ფრაგმენტაციისას პირველად ის ბმები წყდება, რომლებსაც დაბალი ენერგია აქვთ. ჯერადი ბმები ხასიათდება უფრო მაღალი ენერგიით, ვიდრე ერთმაგი ბმები. ასევე, მოლეკულური იონის ფრაგმენტციას, ფრაგმენტაციისას

მიღებული იონების სტაბილურობა განსაზღვრავს. გაზრდილი სტაბილურობა ახასიათებთ არომატული ნაერთების მოლეკულურ იონებს, შემცირებული სტაბილურობით კი ხასიათდებიან ამინების, კარბონმჟავებისა და სპირტების მოლეკულური იონები. როდესაც გვაქვს მცირე ინტენსიურობის მოლეკულური იონები, მაშინ უნდა ვიცოდეთ, რომ: თუ ნივთიერება C, H, O, S და ჰალოგენებს შეიცავს, მაშინ მისი მასური რიცხვი წყვილია; თუ მოლეკულაში აზოტი კენტი რაოდენობითაა, მაშინ მოლეკულური იონის მასური რიცხვი კეტნია, ხოლო თუ აზოტი ლუწი რაოდენობითაა, მაშინ მასური რიცხვიც ლუწია. იმისათვის რომ დავადგინოთ ორგანული ნაერთის სტრუქტურა აუცილებელია ვიცოდეთ მოლეკულური იონის დაშლის სქემა [9].

2.4 ენანტიოსელექტიური სითხური ქრომატოგრაფია და ნარკოტიკების ენანტიოსელექტიური ანალიზი

ქირალური ეწოდება ისეთ სხეულს ან მოლეკულას, რომელსაც საკუთარ სტრუქტურასთან არაიდენტური სარკული გამოსახულება გააჩნია. სიტყვა ქირალობა ბერძნულის სიტყვაა და ნიშნავს ხელს. ქირალური მოლეკულა, მარჯვენა და მარცხენა ხელის მსგავსად, მისი სარკული გამოსახულების არაიდენტურია, შესაბამისად საწყისი მოლეკულისგან განსხვავებულია მისი სარკული გამოსახულება. არაიდენტური სარკული გამოსახულების წყვილს კი ენანტიომერები ეწოდება [10].

სინთეზურ ფარმაცევტულ მოქმედ საფუძველთა უმრავლესობა, რომლებსაც დღესდღეობით იყენებენ, ქირალური ნივთიერებებია და ხშირად გამოიყენება რაცემული ნარევის, ეს არის ორი ენანტიომერის ნარევი 1:1 თანაფარდობით, სახით. ენანტიომერებს ხშირად ახასიათებთ განსხვავებული მეტაბოლიზმი, რადგანაც ისინი ერთმანეთისგან განსხვავდება ბიოშეთვისებით, ცილებთან შეკავშირების, განაწილების და რეცეპტორებთან ურთიერთქმედების უნარით [11] .

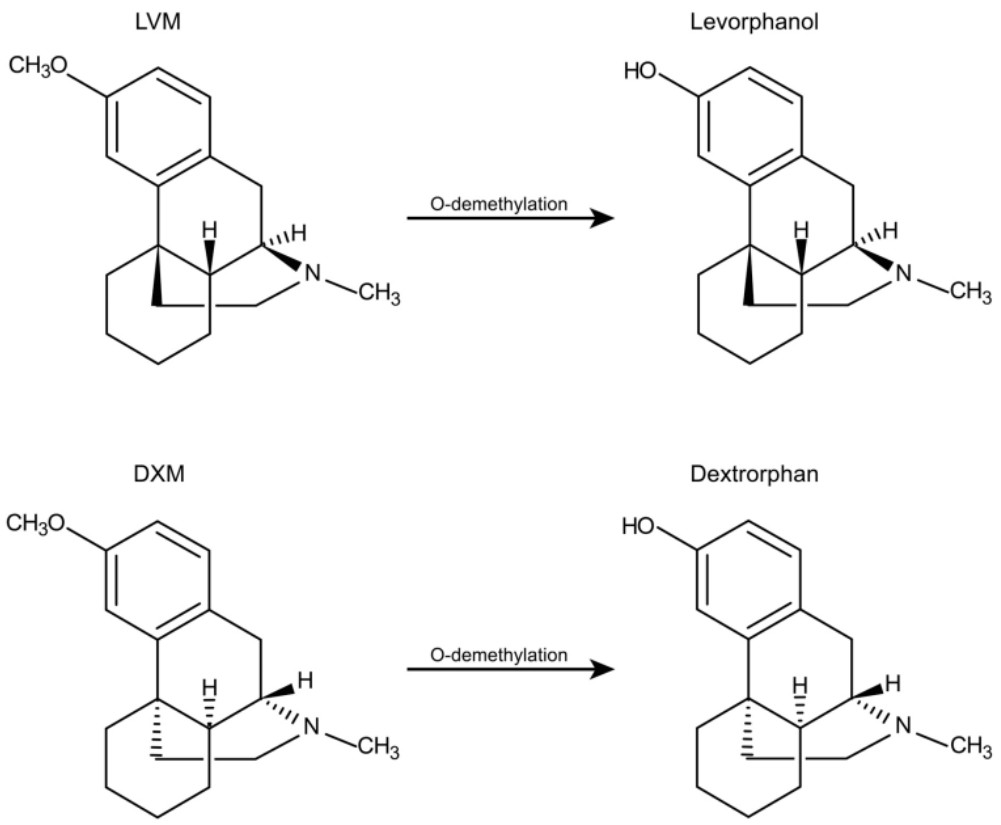
დღესდღეობით თანამედროვე ქიმიის ამოცანაა ენანტიომერული ნარევების დაყოფა. ამ საკითხის აქტუალურობა პრაქტიკული თვალსაზრისით გამოწვეულია იმით, რომ სამკურნალწამლო საშუალებების, საკვები დანამატების და სხვა ბიოლოგიურად აქტიური ქირალური ნივთიერებების ენანტიომერები ერთმანეთისგან განსხვავდება ბიოლოგიური აქტივობით, მეტაბოლიზმის უნარით, ტოქსიკურობითა და ა.შ. [12]. დღეისათვის სამკურნალწამლო საშუალებების დაახლოებით 40% ქირალური ნივთიერებებია, მათგან კი სუფთა ენანტიომერის სახით მხოლოდ 25% გამოიყენება. ადამიანის ორგანიზმში დიდი

რაოდენობით ჰომოქირალური ნაერთებია, რის გამოც ის მძლავრი ქირალური სელექტორია, რომელიც განსხვავებულად რეაგირებს სხვადასხვა ენანტიომერზე და შეუძლია რაცემატის ცალკეული ენანტიომერის გამოცნობა, შესაბამისად თითოეული განსხვავებულ მეტაბოლიზმს განიცდის და აქვს განსხვავებული ფარმაკოლოგიური მოქმედება [13]. აქედან გამომდინარე, შეიძლება ერთ ენანტიომერს დადებითი ფარმაკოლოგიური და თერაპიული მოქმედება გააჩნდეს, მეორეს კი ტოქსიკური. სწორედ ამიტომ, ევროპის სამედიცინო სააგენტომ (EMA), ამერიკის შეერთებული შტატების საკვებისა და ფარმაცევტული საშუალებების რეგისტრაციის სააგენტომ (FDA), იაპონიის და სხვა ქვეყნების შესაბამისი სამსახურები ითხოვენ მანამ , სანამ მოხდება ქირალური სამკურნალწამლო საშულაბების რეგისტრაცია ჩატარდეს თითოეული ენანტიომერის შესწავლა და შესაბამისად, მხოლოდ იმ ენანტიომერის გამოყენება სუფთა სახით, რომელსაც დადებითი თერაპიული ეფექტი ექნება [14].

ქირალური დაყოფის ერთ-ერთი ძლიერი მეთოდებს მიეკუთვნება ქრომატოგრაფიული მეთოდები და ელექტროფორეზი. ამ მეთოდებს თავისი უპირატესობები გააჩნია: მათი საშუალებით ხდება ქირალური დაყოფა, ასევე შესაძლებელია ვაკონტროლოთ ენანტიომერული სისუფთავე სხვადასხვა ეტაპზე და რაცემიზაციის პროცესი. ქირალური დაყოფის შედარებით ახალი მეთოდებია კაპილარული ელექტროქრომატოგრაფია, რომელიც აერთიანებს კაპილარული ელექტროფორეზისა და ქრომატოგრაფიის უპირატესობებს, და სითხური ქრომატოგრაფია-ტანდემური მას სპექტომეტრია, რომელიც ქრომატოგრაფიასა და მას სპექტპმეტრიას აერთიანებს [15].

მიუხედავად იმისა, რომ ბიოანალიზის ბევრი მეთოდი არსებობს სითხური ქრომატოგრაფია მასის ანალიზატორით გახდა ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი მეთოდი თავისი უპირატესობებიდან, მაღალი გარჩევითობა და მაღალმგრძნობიარე, გამომდინარე [16].

მეთორფანის ორი ენანტიომერია დექსტომეთორფანი და ლევომეთორფანი, რომელთაც განსხვავებული ფარმაკოლოგიური მოქმედება ახასიათებთ და ამიტომ აუცილებელია მისი ენანტიოსელექტიური ანალიზი. რადგანაც ორგანიზმში მეთორფანის მეტაბოლიზმის შედეგად მიიღება მისი მეტაბოლიტები, საინტერესოა მათი რაცემატული ნარევის გაზომვა სისხლის ნიმუშებში.



ნახაზი 4. მეთორფანის ენანტიომერებისა და მათი O-დემეთილირებული მეტაბოლიტები. დექსტომეთორფანი, (DXM); ლევომეთორფანი, (LVM).

საერთაშორისო ფარმაკოპეას, შეერთებული შტატების ფარმაკოპეასა და ევროპის ფარმაკოეპეას აქვს მეთოდი, რომელიც რეკომენდირებულია ლევომეთორფანისა და დექსტრომეთორფანის ენანტიოსელექტიური განსაზღვრისთვის ცელულოზა(4-მეთილბენზოატი)-ის სვეტზე [17,18]. სამეცნიერო ლიტერატურაში რამდენიმე მეთოდია აღწერილი დექტრომეთორფანისა და მისი მეტაბოლიტების აქირალური განსაზღვირასთვის, [19]. ლიტერატურაში მწირი ინფორმაციაა ლევომეთორფანისა და მისი მეტაბოლიტის ლევორფანოლის ერთროულ განსაზღვრის შესახებ. მოცემული მეთოდები დაფუძნებულია მაღაეფექტური სითხური ქრომატოგრაფისა და მას სპექტომეტრის ტანდემზე, ან მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფსა და ფლუოროსცენტულ დეტექტორზე [20]. დექსტრომეთორფანისა და მისი მთავარი მეტაბოლიტების ერთროული განსაზღვრისათვის გამოყენებულია ასევე კაპილარული ელექტროფორეზი ულტრაიისფერ-ხილული დეტექტორით [21]. 2005 წელს, ფილაინენმა და კოსტიაინენმა გამოაქვეყნეს ამფეტამინის და მისი ანალოგების, ისევე როგორც მეთორფანისა და პროპოქსიფენის ენანტიომერების დაყოფის მეთოდი ორ სხვადასხვა ქირალურ სვეტზე, ვანკომიცინისა და ბუნებრივი ბეტა-ციკლოდექსტრინის ქირალური უძრავი ფაზის გამოყენებით [22]. ასევე, კიმმა და სხვებმა

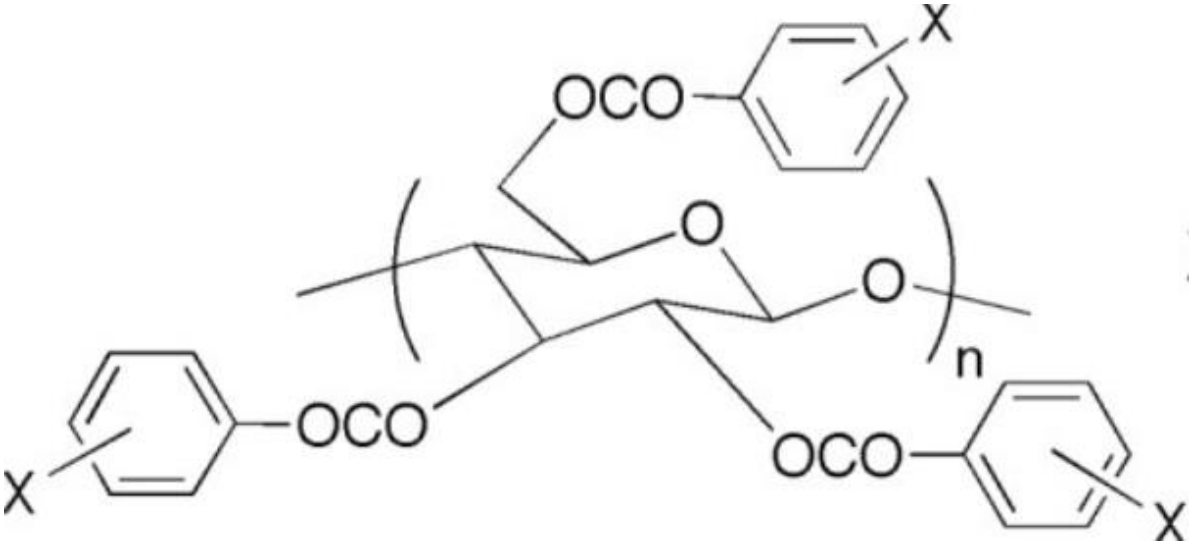
გამოაქვეყნეს მეთორფანის ენანტიოსელექტიური ანალიზისთვის მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის მეთოდი, ამ მეთოდით გაანალიზდა მეთორფანის შემცველი 32 ნიმუში [23]. ტოდესკოსა და თანაავტორების მიერ შემოთავაზებულ მეთოდში მეთორფანის ენანტიომერების დასაყოფად გამოყენებულია პოლისაქარიდზე დაფუძნებული ქირალური სელექტორი ცელულოზა ტრის (4-მეთილფენილბენზოატი) ალკოჰოლ-ნახშირწყალბადის მოძრავი ფაზით. ეს მეთოდი გამოიყენეს ჰეროინის ნიმუშების ანალიზისათვის [24]. რადგანაც მოძრავი ფაზა არის აალებადი, ეს მეთოდი შესაძლოა პრობლემური იყოს მას სპექტომეტრიულ დეტექტორთან გამოყენებისას. სკრიბასა და სხვების მიერ გამოქვეყნებულია დექსტრომეთორფანისა და ლევომეთორფანის განსაზღვრა ნარკოტიკებში ენანტიოსელექტიური კაპილარული ელექტროფორეზით [25]. ასევე, ამოღებულ ნარკოტიკებში მეთორფანის ენანტიომერების სტერეოსელექტიური ანალიზი ჩატარებულია არაპირდაპირი მეთოდით, გაზური ქრომატოგრაფისა და მას სპექტრომეტრიის გამოყენებით [26]. 1990-იან წლებში გამოქვეყნდა ორი კვლევა მეთორფანის ენანტიოსელექტიურ ანალიზზე ადამიანის შარდში ციკლოდექსტრინებზე დაფუძნებული მიცერლარული ელექტროკინეტიკური ქრომატოგრაფის გამოყენებით. პირველში ულტრაიისფერი დეტექტორის გამოყენებით განსაზღვრეს O-დემეთილ მეტაბოლიტიც. ნიმუშად აღებული ჰქონდათ მოხალისის შარდი, რომელსაც მიღებული ჰქონდა 30 მგ-იანი დექსტრომეთორფანის ჰიდრობრომიდი [27]. მეორე კვლევაში კი გაანალიზებული ჰქონდათ რაცემორფანი MEKC-MALDI TOF MS გამოყენებით [28]. ორივე კვლევაში ნიმუშის გასუფთავებსთვისა და წინასწარი კონცენტრირებისთვის გამოიყენეს ექსტრაქცია. 2011 წელს კიკურა-ჰანაჯირმა და სხვებმა გამოაქვეყნეს დექსტრომეთორფანის, ლევომეთორფანისა და მათი მეტაბოლიტების დაყოფა ვირთაგვებისს პლაზმაში, შარდში და თმაში, ასევე ვირთაგვებისა და ადამიანის ღვიძლის მიკროსომულ ინკუბაციებში. დაყოფას მიაღწიეს ქირალურ CD-Ph სვეტზე, მოძრავ ფაზად იყენებდნენ 0.1% ჭიანჭველმჟავას-აცეტონიტრილში. გამოვლენილი მეტაბოლიტები ვირთაგვების პლაზმასა და შარდში იყო O-დემეთილ და N,O-დიდემეთილ მეტაბოლიტები. აშკარა განსხვავება ამ მეტაბოლიტების რაოდენობაში იყო დექსტრო- და ლევო- ფორმებს შორის. ადამიანის მიკროსომულ ინკუბაციებში ჩატარებულ ანალიზებზე დაყრდნობით ავტორებმა ივარაუდეს, რომ მეთორფანი შეიძლება გარდაიქმნებოდა ენანტიოსელექტიურ მეტაბოლიზმით, თუმცა არ არსებობს კვლევები ადამიანის ავთენტური ნიმუშების გამოყენებით [29]. ტალიაროსა და მის თანამშრომლებს აქვთ გამოქვეყნებული მეთოდი დექსტრომეთორფანისა და ლევომეთორფანის ენანტიოსელექტიური განსაზღვრის ადამიანის პლაზმაში კაპილარული ელექტროფორეზზე ულტრაიისფერი დეტექტორის გამოყენებით. დღეისათვის ეს არის ერთადერთი კვლევითი ჯგუფი, რომელმაც აჩვენა ვალიდური მეთოდი

დექსტრომეთორფანისა და ლევომეთორფანის ენანტიოსელექტიური ანალიზისთვის ადამიანის ნიმუშებში სასამართლო ექსპერტიზისთვის [30, 31]. მიუხედავად იმისა, რომ კაპილარული ელექტროფორეზი მიმზიდველი მინიატურული მეთოდია, მისი წარმატებული გამოყენება მოითხოვს სპეციალურ უნარებს. გარდა ამისა, მეთოდის განმეორებადობა შეიძლება იყოს პრობლემატური, განსაკუთრებით მაშინ, როდესაც ქირალური სელექტორებად გამოიყენება ციკლოდექსტრინების ნარევი.. ასევე, ულტრაიისფერი დეტექტორი შეიძლება არ იყოს საკმარისად მგრძნობიარე , როდესაც ნიმუშში გვაქვს მცირე კონცენტრაცია მცირე მოცულობის ბიოლოგიურ ნიმუშში, განსაკუთრებით მეტაბოლიტებისთვის. ამრიგად, ბიოლოგიური სითხეებისთვის შემუშავებული კაპილარული ელექტროფორეზის მეთოდი საჭიროა შერწყმული იყოს მას-სპექტრომეტრიულ დეტექტორთან. ამ კვლევებში არ ჩატარებულა ცდა მეთორფანის მეტაბოლიტების აღმოსაჩენად. ზემოაღნიშნული არსებული ანალიზური მეთოდებიდან გამომდინარე, ჩავატარებთ რაოდენობრივ ანალიზს მეთორფანის ენანტიომერების დექსტრომეთორფანის, ლევომეთორფანისა და მათი O-დემეთილირებულ მეტაბოლიტების, დექსტროფანისა და ლევორფანოლის განსასაზღვრავად გარდაცვლილ ადამიანთა სისხლის ნიმუშებში.

3. ექსპერიმენტული ნაწილი

3.1 გამოყენებული სტაციონარული და მოძრავი ფაზა

ექსპერიმენტში გამოყენებული გვაქვს ცელულოზას წარმოებული ცელულოზა ტრის (4-მეთილბენზოატი)(ცელულოზა 3).



ნახაზი 5. ცელულოზა 3 (4-მეთილბენზოატი)

მოცემულ ექსპერიმენტში მოძრავ ფაზად ვიყენებთ მეთანოლსა და წყლის ნარევი 97/3 თანაფარდობით. მოძრავ ფაზას ვამატებთ 5 mM ამონიუმის აცეტატს.

საანალიზო ნივთიერება ჩვენს ექსპერიმენტში არის მეთორფანი, მისი ენანტიომერები, დექსტრომეთორფანი და ლევომეთორფანი, და მათი მეტაბოლიტები, დექსტროფანი და ლევორფანოლი.

3.2 გამოყენებული აპარატურა

ექსპერიმენტში გამოვიყენეთ Agilent Technologies 1200 Series მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფი და Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS მას-სპექტრომეტრი, რომელიც ნაჩვენებია სურათი 1-ზე.

სურათი 1. მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფი, ტანდემური მას სპეტრომეტრი

3.3 ნიმუშის მომზადება

ავიღეთ 10 საცენტრიფუგო სინჯარა და თითოეულში შეგვაქვს 1 მლ სისხლის ნიმუში, ვუმატებთ 5 მლ ქლოროფორმი:ეთილაცეტატი 9:1 თანაფარდობით და 100 მკლ 1% მარილმჟავას, რათა თავიდან ავიცილოთ დანაკარგი აორთქლებისას. ამის შემდეგ ვანჯღრევთ 5 წუთი, ვათავსებთ ულტრაბგერით აბაზანაში 10 წუთით და შემდეგ ვათავსებთ ცენტრიფუგაში 6500 ბრუნით 10 წუთის განმავლობაში. ამის შემდეგ ორგანული ფაზა გადაგვაქვს სინჯარებში და ამოვაშრობთ. მშრალ ნაშთს ვხსნით 100 მკლ მეთანოლში, ვფილტრავთ ბამბის ფილტრით და გადაგვაქვს ნიმუში პატარა ვიალებში გასაანალიზებლად.

3.4 ნიმუშის ანალიზი და შედეგების დამუშავება

ნიმუში ვაანალიზებთ ქირალურ სვეტზე Lux Cellulose-3და მოძრავ ფაზად ვიყენებთ მეთანოლსა და წყლის ნარევს, 97/3 თანაფარდობით 5 mM ამონიუმის აცეტატთან ერთად, ინიცირება 1 მკლ, MRM მეთოდით (იხილეთ ცხრილი 1.) შინაგან სტანდარტად ვიყენებთ დექსტრორფან D-3 და ლევორფანოლ D-3.

ცხრილი 1. მას სპექტრომეტრიის პარამეტრები ანალიზისთვის.

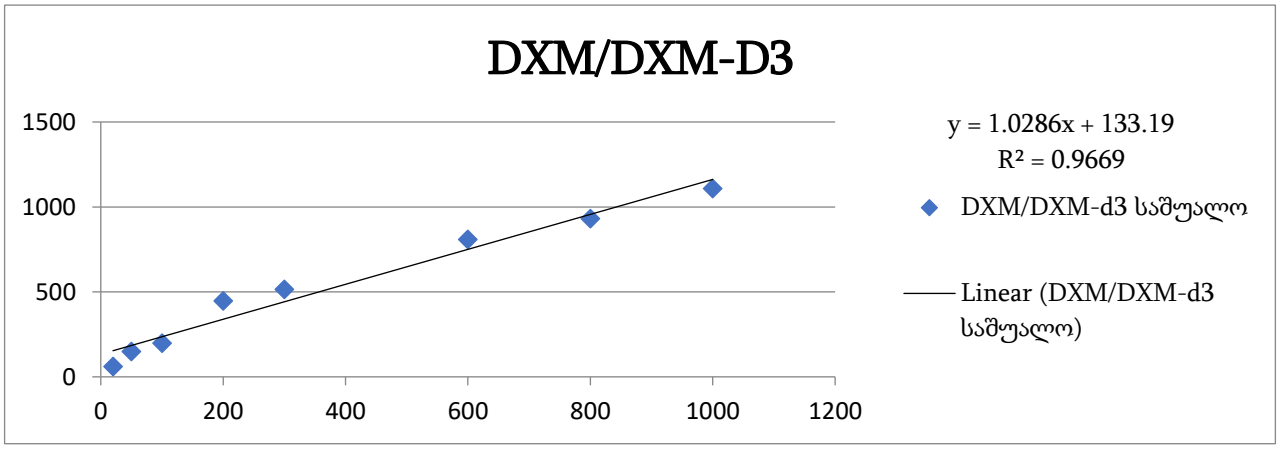
საანალიზო ნივთიერება	მოლეკულური მასა გ/მოლი	მთავარი იონი m/z	პროდაქტ იონი m/z
დექსტრომეთორფანი	271,4	272,4	215,1
			213,1
			171,1
			147,1
ლევომეთორფანი	271,4	272,4	215,1
			213,1
			171,1
			147,1
დექსტრორფანი	257,4	258,0	201,0
			199,0
			157,1
			258,4
ლევორფანოლი	257,4	258,0	196,1
			151,1
დექსტრომეთორფან-d3	274,4	275,4	218,2
			216,1
			174,1
			150,1
ლევორფანოლ-d3	260,4	261,0	199,1
			157,1
დექსტრორფან-d3	260,4	261,0	157,1
			133,2

საკალიბრო გრაფიკის ასაგებად ვამზადებთ ნიმუშებს მზარდი კონცენტრაციებით იხილეთ ცხრილი 2.

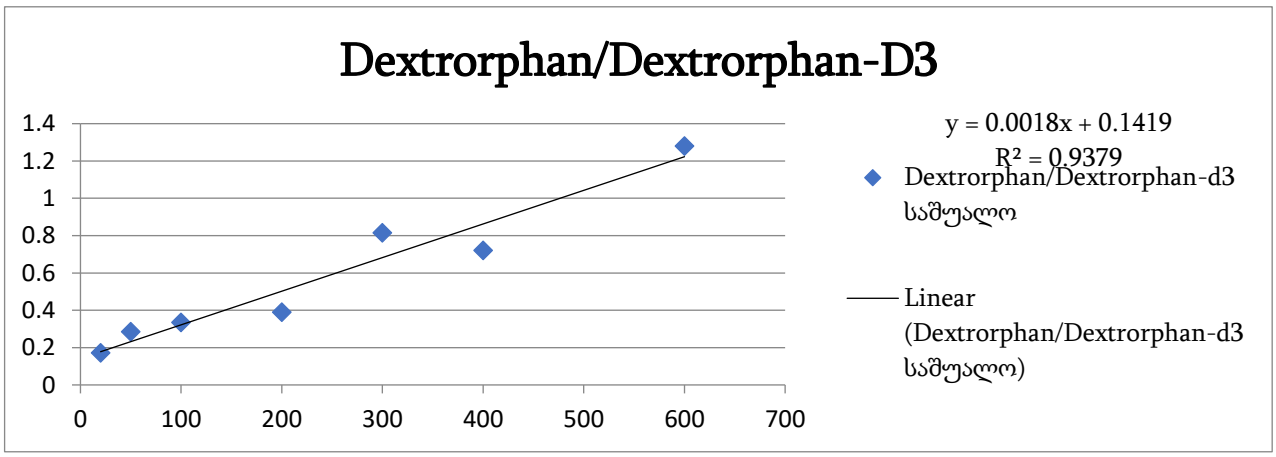
ცხრილი 2. სტანდარტული ნივთიერებების კონცენტრაციები.

	Nominal Concentration (ng/ml)				Added Volume (mkl)						Final Volume
N	DXM	LVM	Dextrophan	Levorphanol	DXM-D3	Dextrophan-D3	DXm 10mkg/ml	LVM 10mkg/ml	Dextrophan 1mkg/ml	Levorphanol 1mkg/ml	
1	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	1200
2	20	20	10	10	100	100	20	20	10	10	1260
3	50	50	20	20	100	100	50	50	20	20	1340
4	100	100	30	30	100	100	100	100	30	30	1460
5	200	200	40	40	100	100	200	200	40	40	1680
6	300	300	50	50	100	100	300	300	50	50	1900
7	400	400	60	60	100	100	40	40	60	60	1400
8	600	600	80	80	100	100	60	60	80	80	1480
9	800	800	100	100	100	100	80	80	100	100	1560
10	1000	1000	150	150	100	100	100	100	150	150	1700

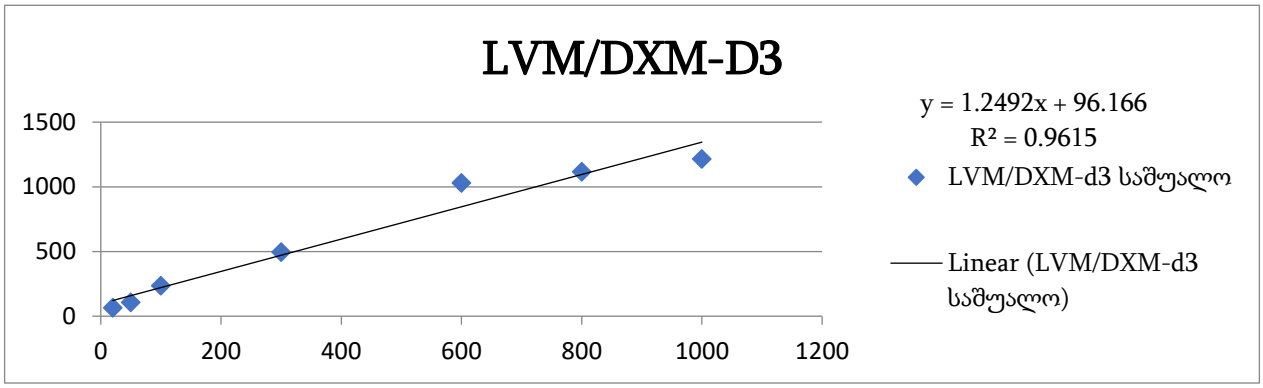
სტანდარტებს ვაანალიზებთ ორჯერ, ერთი და იმავე პირობებში, და გამოგვყავს მონაცემების საშუალო, რომლის გამოყენებითაც ვაგებთ საკალიბრო გრაფიკებს (იხ. ნახ. 6-9)



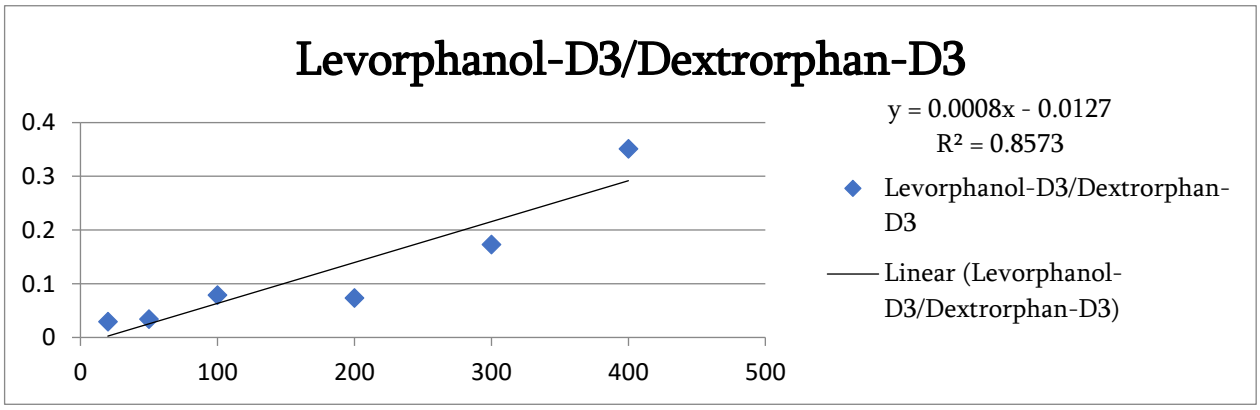
ნახაზი 6. დექსტრომეთორფანის საკალიბრო გრაფიკი



ნახაზი 7. დექსტრორფანის საკალიბრო გრაფიკი



ნახაზი 8. ლევომეთორფანის საკალიბრო გრაფიკი

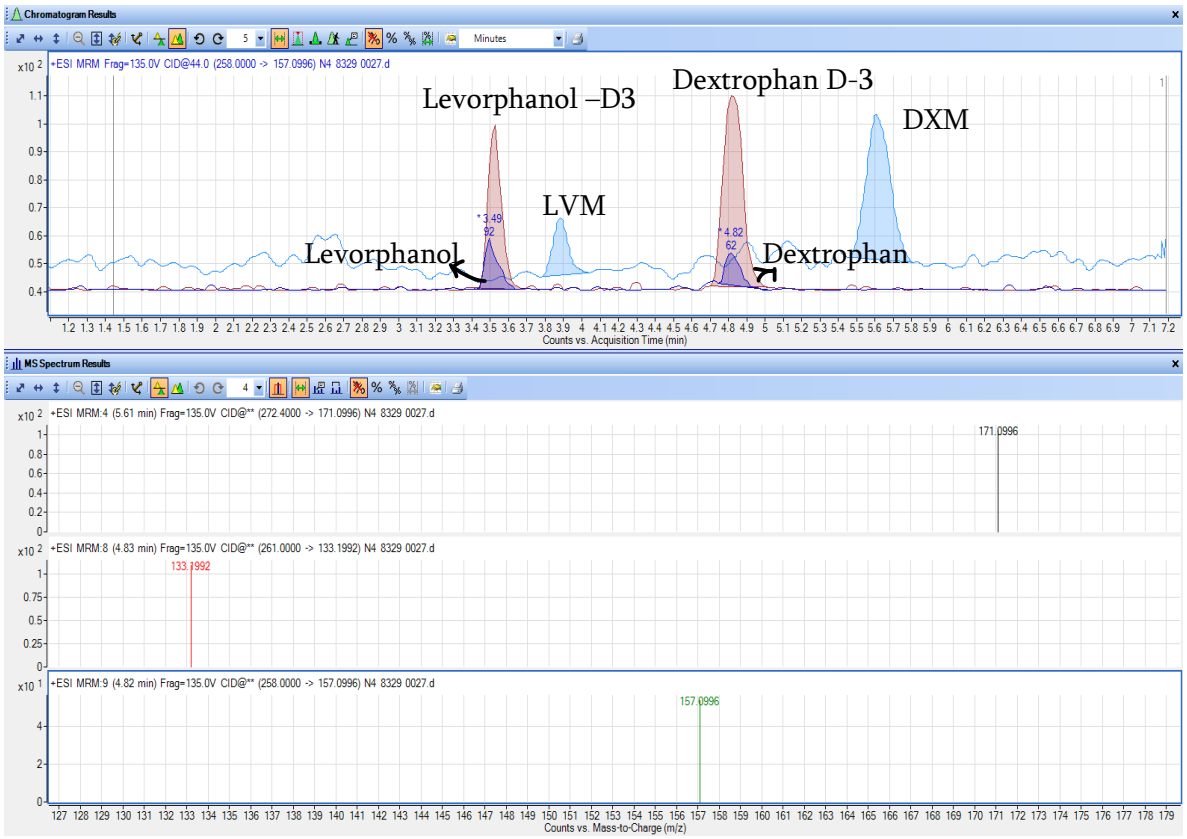


ნახაზი 9. ლევორფანოლის საკალიბრო გრაფიკი

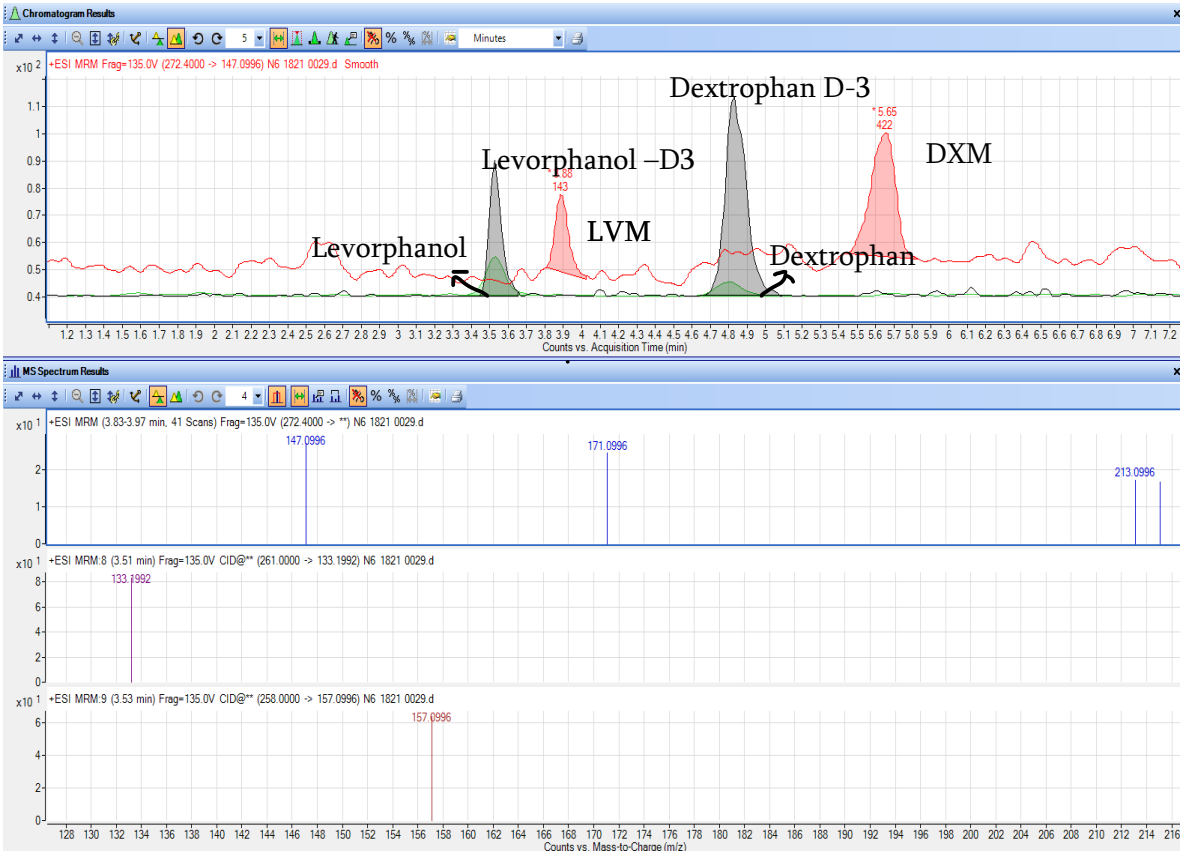
მიღებული წრფის განტოლებებით შეგვიძლია გამოვთვალოთ დექსტრომეთორფანის, ლევომეთორფანისა და მათი მეტაბოლიტების კონცენტრაციები, შედეგები იხილეთ ცხრილი 6-ში.

4. მიღებული შედეგები და განსჯა

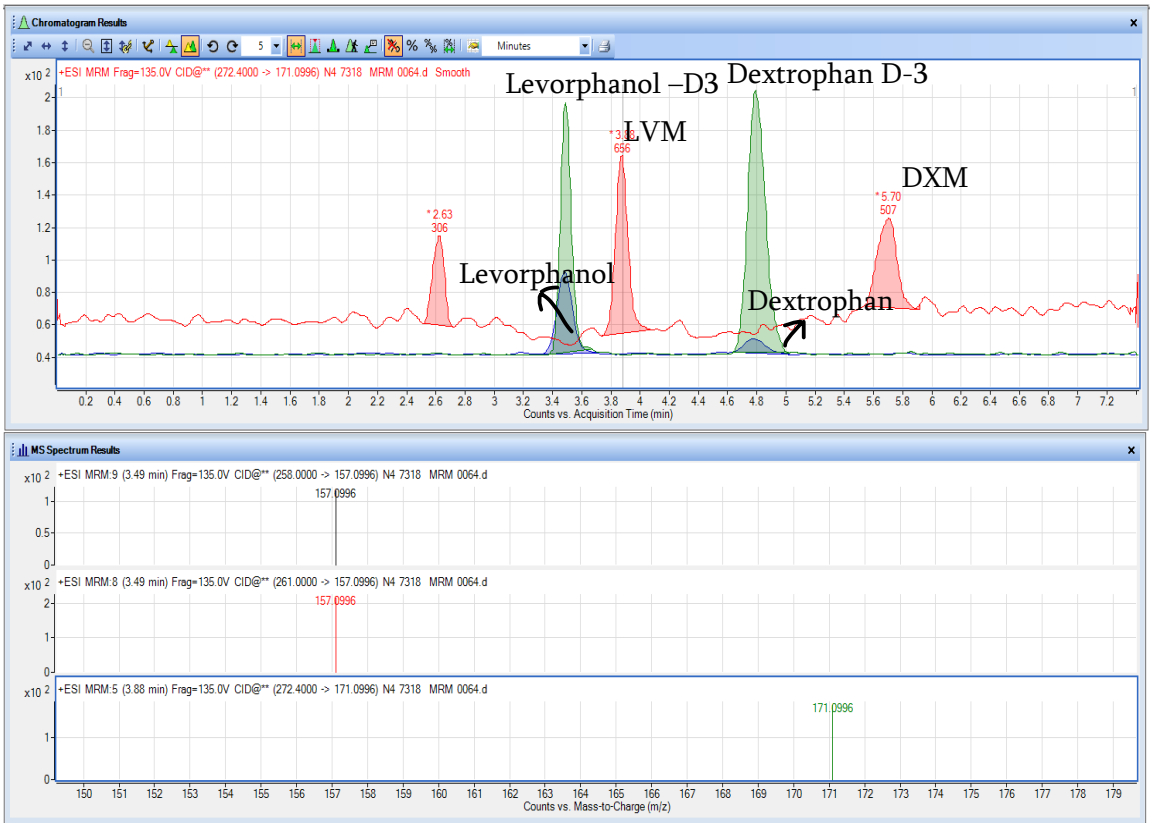
გაანალიზებული 50 სისხლის ნიმუშიდან მეთორფანის ენანტიომერები დექსტრომეთორფანი, ლევომეთორფანი და მათი მეტაბოლიტები დექტრორფანი და ლევორფანოლი აღმოჩნდა ნიმუშებში ნომრით: 8329, 1821, 7318, 2420, 3-02. როგორც ქრომატოგრამებზე ჩანს, მივიღეთ ფუძისეული დაყოფა როგორც ენანტიომერების, ასევე მათი მეტაბოლიტების. ქრომატოგრამები და მას სპექტრები იხილეთ სურათ 2, 3, 4, 5, 6 - ზე. მხოლოდ ენანტიომერების დაყოფა მივიღეთ ორ ნიმუშში, ნომრებით: 800-21 და 68453 (სურათი 7 და 8). სხვა ნიმუშების ქრომატოგრამები და მას სპექტრები იხილეთ დანართში.



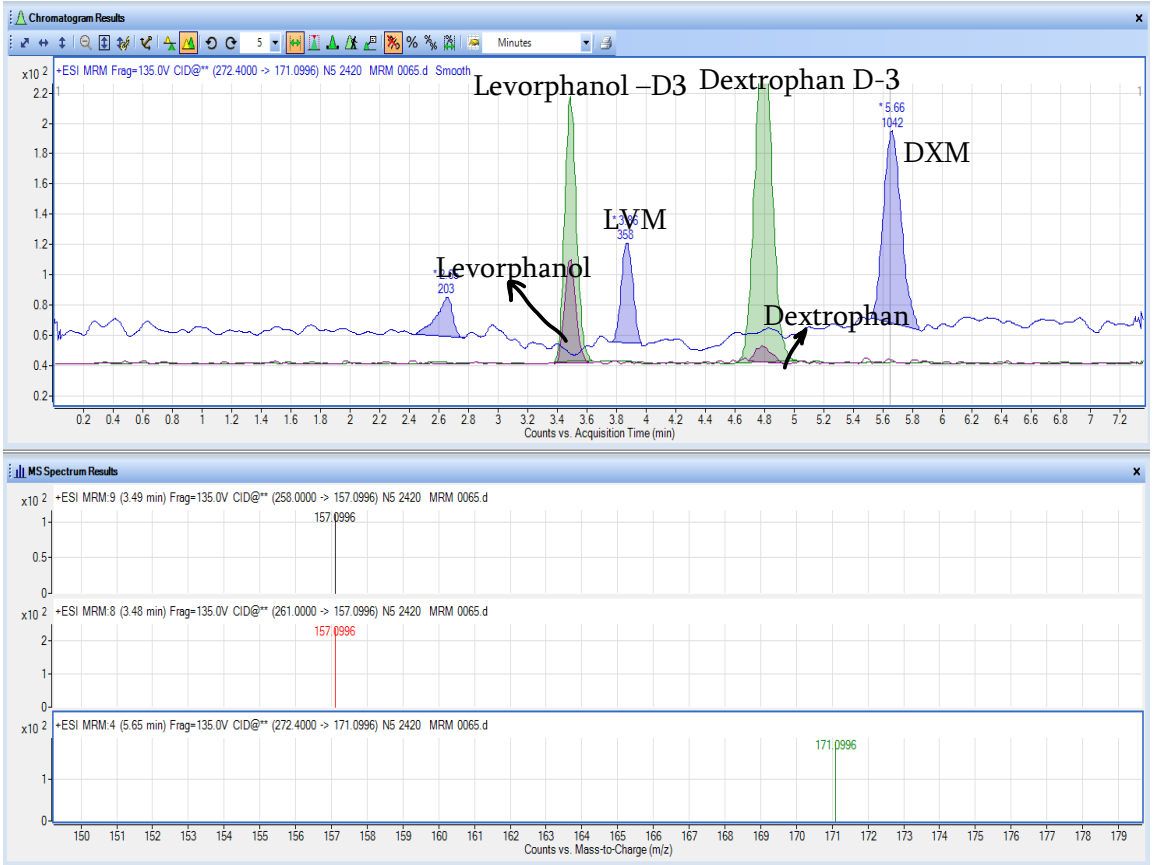
სურათი 2. ნიმუში 8329-ის ქრომატოგრამა და მას სპექტრი.



სურათი 3. ნიმუში 1821-ის ქრომატოგრამა და მას სპექტრი.



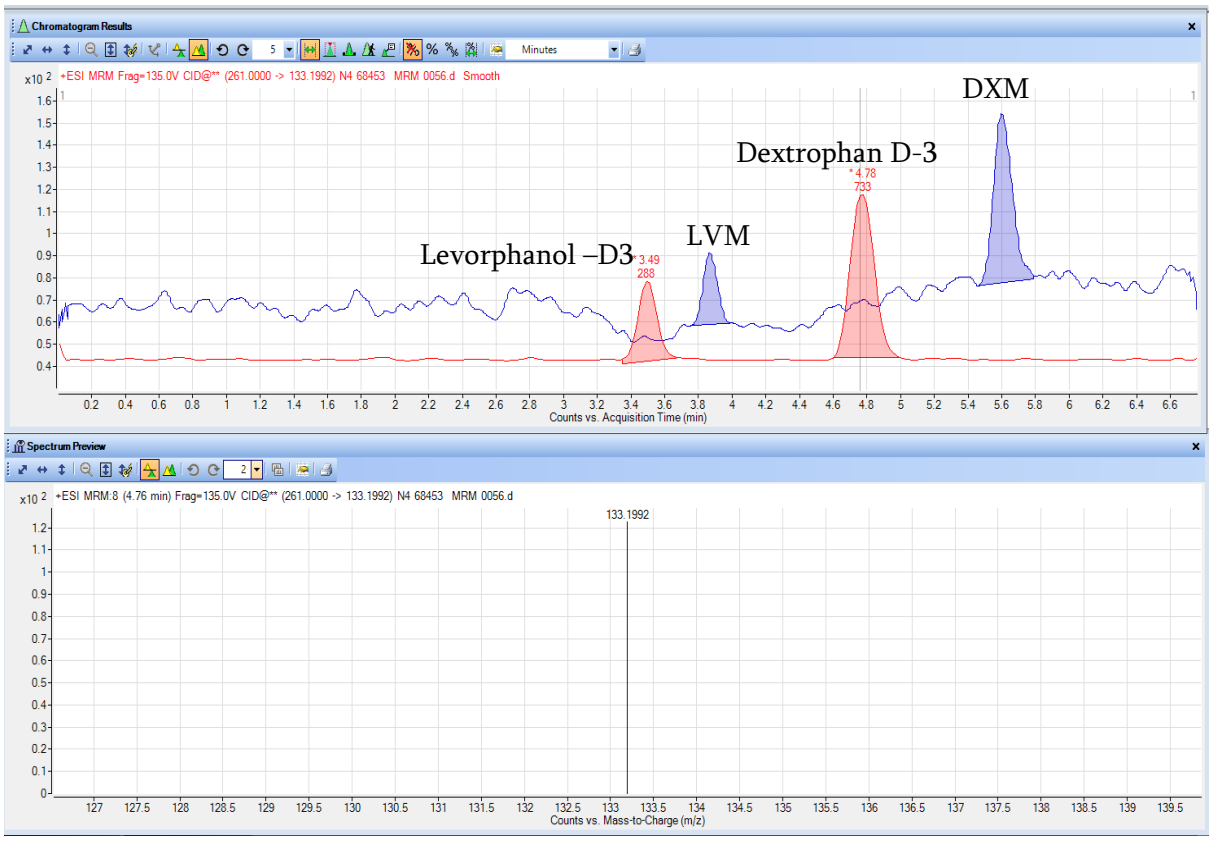
სურათი 4. ნიმუში 7318-ის ქრომატოგრამა და მას სპექტრი.



სურათი 5. ნიმუში 2420-ის ქრომატოგრამა და მას სპექტრი.

სურათი 6. ნიმუში 3-02-ის ქრომატოგრამა და მას სპექტრი.

სურათი 7. ნიმუში 800-21-ის ქრომატოგრამა და მას სპექტრი.



სურათი 8. ნიმუში 68453-ის ქრომატოგრამა და მას სპექტრი.

მიღებული კონცენტრაციები, პიკის ფართობების შეტანით წრფის განტოლებაში, მოცემულია ცხრილ 3-ში.

ცხრილი 3. დექსტრომეთორფანის, ლევომეთორფანის, დექსტრორფანისა და ლევორფანოლის კონცენტრაციები.

ნიმუშის ნომერი	დექსტრომეთორფანის კონცენტრაცია	ლევომეთორფანის კონცენტრაცია	დექსტრორფანის კონცენტრაცია	ლევორფანოლის კონცენტრაცია
8329	322.6	17.5	34365.6	115015.9
1821	280.8	37.5	29365.6	132515.9
7318	363.4	448.2	49365.6	480015.9
2420	883.5	209.6	43810.1	457515.9
3-02	822.3	236.0	66032.3	320015.9
800-21	279.9	176.8	-	-
68453	465.5	78.3	-	-
0119	266.2	-	-	-
63-21	2718.1	-	-	-
810-22	483.9	-	-	-
159-22	483.9	-	-	-
0118	78.6	-	-	-
199-22	71.8	-	-	-
134-22	199.1	-	-	-
194-22	249.7	-	-	-
68953	115.5	-	-	-
655-28	96.1	-	-	-

5. დასკვნები

1. მხოლოდმეთორფანის ენანტიომერები, დექსტრომეთორფანი და ლევომეთორფანი, აღმოჩნდა სისხლის 2 ნიმუშში.
2. როგორც მეთორფანის ენანტიომერები, ისე მათი მეტაბოლიტები გამოჩნდა სისხლის 5 ნიმუშში.
3. მხოლოდ ერთი ენანტიომერი, დექსტრომეთორფანი აღმოჩნდა სისხლის 10 ნიმუშში.
4. მეთორფანი არ აღმოჩნდა სისხლის 32 ნიმუშში.
5. ზოგიერთ ნიმუშში ჩანს პიკი 2,6 წუთზე, რომელიც ემთხვევა ენანტიომერების ერთ-ერთ პროდუქტ იონს (274 -> 171 m/z).

6. გამოყენებული ლიტერატურა

1. William Glenn Steiner, Psychotropic drugs, 2023;

2. A. F. Lo Faro , D. Berardinelli , G. Sprega , A. Tini , J. Carlier , T. Farkas , F. P. Busardo, B. Chankvetadze, Development of an enantioselective high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of methorphan and its O-demethylated metabolite in human blood and its application to post-mortem samples. Journal of Pharmaceutical and Biomedical AnalysisVolume 23015 June 2023 Article number 115384.

3. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2022;

4. S. W. Shantier, Drug Analysis, 2019;

5. A. K. Chang, P. E. Bijur, D. Esses, et al, Effect of a Single Dose of Oral Opioid and Nonopioid Analgesics on Acute Extremity Pain in the Emergency Department, 2017;

6. საქართველოს შინაგან საქმეთა სამინიშტრო, ინფორმაცია ნარკოტიკებზე, 2013;

7. ბ. ჭაკვეტაძე, „ნარევთა დაყოფის ინსტრუმენტული მეთოდები, სალექციო კურსი," თბილისი, 2015;

8. მ. რუხაძე, „ნარევთა დაყოფის ინსტრუმენტული მეთოდები, სალექციო კურსი," თბილისი, 2015;

9. მ. რუხაძე, „მას-სპექტრომეტრიული მეთოდი, სალექციო კურსი," თბილისი, 2023;

10. R.S, Cahn C.K. Ingold V. Prelog, The specification of asymmetric configuration in organic chemistry. Experientia 1956, 12:81-124;

11. J. McConathy, Stereochemistry in Drug Action, Prim Care Companion J Clin Psychiatry, 2003; 5(2): 70–73 ;

12. I K Reddy , T R Kommuru, A A Zaghloul, M A Khan, Chirality and its implications in transdermal drug development,. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2000;17(4):285-325;

13. Chirality and Biological Activity of Drugs, Crossey R.J. Boca Raton USA, CRC Press. 1995.199;

14. Gil-Av E. Freibusch B. Charles-Sigler R., Separation of enantiomers by gas liquid chromatography with an optically active stationary phase. Tetraheron Letters 7. 1966. 1009-1015.

15. B. Chankvetadze, Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis, John Wiley & Sons, Chchester, UK, 1997, 555 pp.

16 N. Weng,. LC-MS bioanalysis of chiral compounds. In Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations; Li, W., Zhang, J., Tse, F.L.S., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2013; Volume 1, pp. 519–534;

17. Levomethorphan limit test for dextromethorphan containing finished pharmaceutical products, The International Pharmacopoeia - Tenth Edition, 2020;

18. Dextromethorphan hydrobromide, The European Pharmacopoeia- Ninth Edition, 2016;

19. T.H. Eichhold, D.L. McCauley-Myers, D.A. Khambe, G.A. Thompson, S.H. Hoke, Simultaneous determination of dextromethorphan, dextrorphan, and guaifenesin in human plasma using semi-automated liquid/liquid extraction and gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry, J. Pharm. Biomed. Anal. 43 (2007) 586–600;

20. S.Y. Lin, C.H. Chen, H.O. Ho, H.H. Chen, M.T. Sheu, Simultaneous analysis of dextromethorphan and its three metabolites in human plasma using an improved HPLC method with fluorometric detection, J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 859 (2007) 141–146;

21. H.T. Kristensen, Simultaneous determination of dextromethorphan and its metabolites in human plasma by capillary electrophoresis, J. Pharm. Biomed. Anal. 18 (1998) 827–838;

22. K. Pihlainen, R. Kostiainen, Effect of the eluent on enantiomer separation of controlled drugs by liquid chromatography-ultraviolet absorbance detectionelectrospray ionisation tandem mass spectrometry using vancomycin and native beta-cyclodextrin chiral stationary phases, J. Chromatogr. A 1033 (2004) 91–99;

23. S.C. Kim, H. Chung, S.K. Lee, Y.H. Park, Y.C. Yoo, Y.P. Yun, Simultaneous analysis of d-3-methoxy-17-methylmorphinan and l-3-methoxy-17-methylmorphinan by high pressure liquid chromatography equipped with PDA, Forensic Sci. Int. 161 (2006) 185–188;

24. D. Tedesco, A.M. di Pietra, F. Rossi, M. Garagnani, E. del Borrello, C. Bertucci, V. Andrisano, Determination of dextromethorphan and levomethorphan in seized heroin samples by enantioselective HPLC and electronic CD, J. Pharm. Biomed. Anal. 81–82 (2013) 76–79;

25. S. Krait, M. Heuermann, G.K.E. Scriba, Development of a capillary electrophoresis method for the determination of the chiral purity of dextromethorphan by a dual selector system using quality by design methodology, J. Sep. Sci. 41 (2018) 1405–1413;

26. C. Koo, M. Cox, G. Klass, M. Johnston, Stereochemical analysis of methorphan using (-)-menthyl chloroformate, J. Forensic Sci. 57 (2012) 1549–1555;

27. A. Aumatell, R.J. Wells, Chiral differentiation of the optical isomers of racemethorphan and racemorphan in urine by capillary zone electrophoresis, J. Chromatogr. Sci. 31 (1993) 502–508;

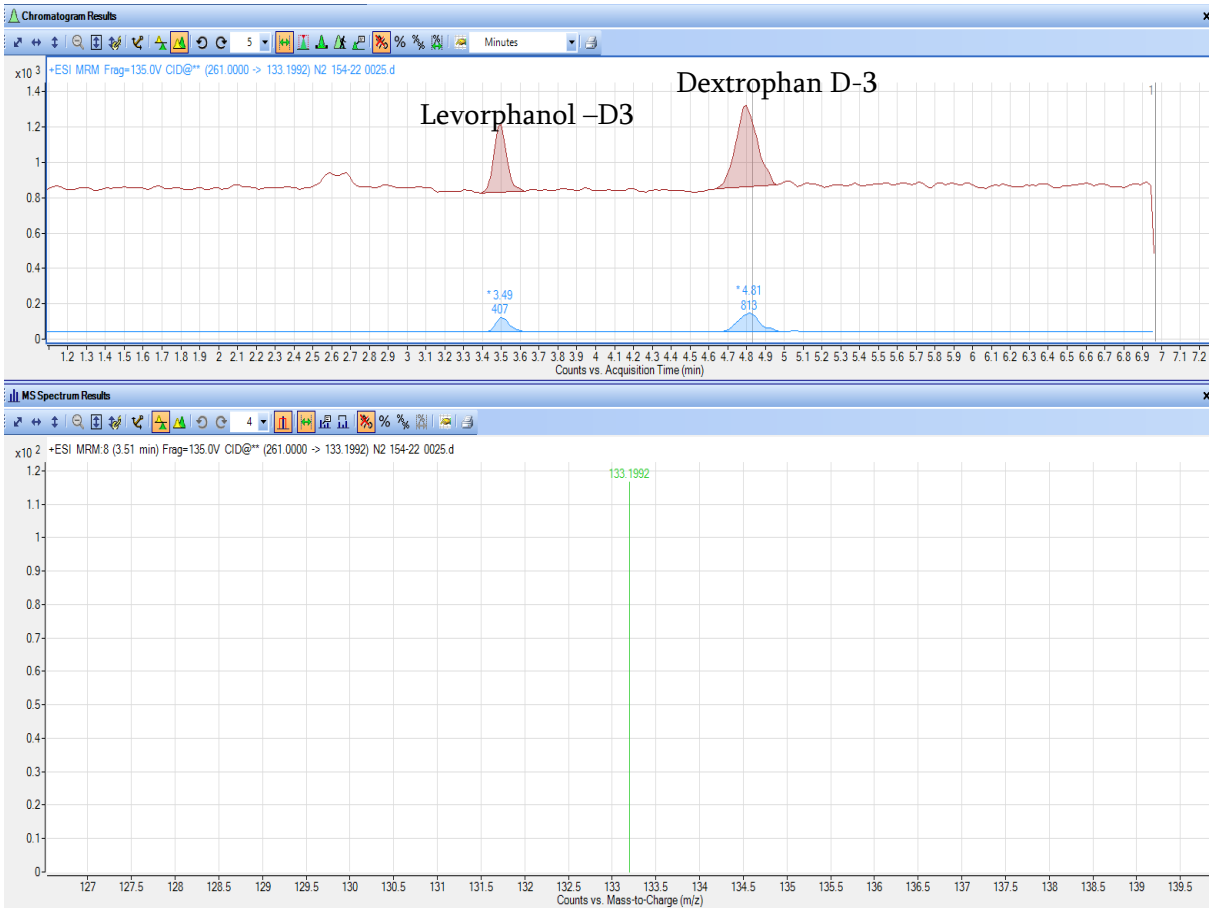
28. E. Ban, S. Choi, J.A. Lee, D.S. Lho, Y.S. Yoo, Cyclodextrin-mediated micellar electrokinetic chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the enantiomer separation of racemorphan in human urine, J. Chromatogr. A 853 (1999) 439–447

29. R. Kikura-Hanajiri, M. Kawamura, A. Miyajima, M. Sunouchi, Y. Goda, Chiral analyses of dextromethorphan/levomethorphan and their metabolites in rat and human samples using LC-MS/MS, Anal. Bioanal. Chem. 400 (2011) 165–174;

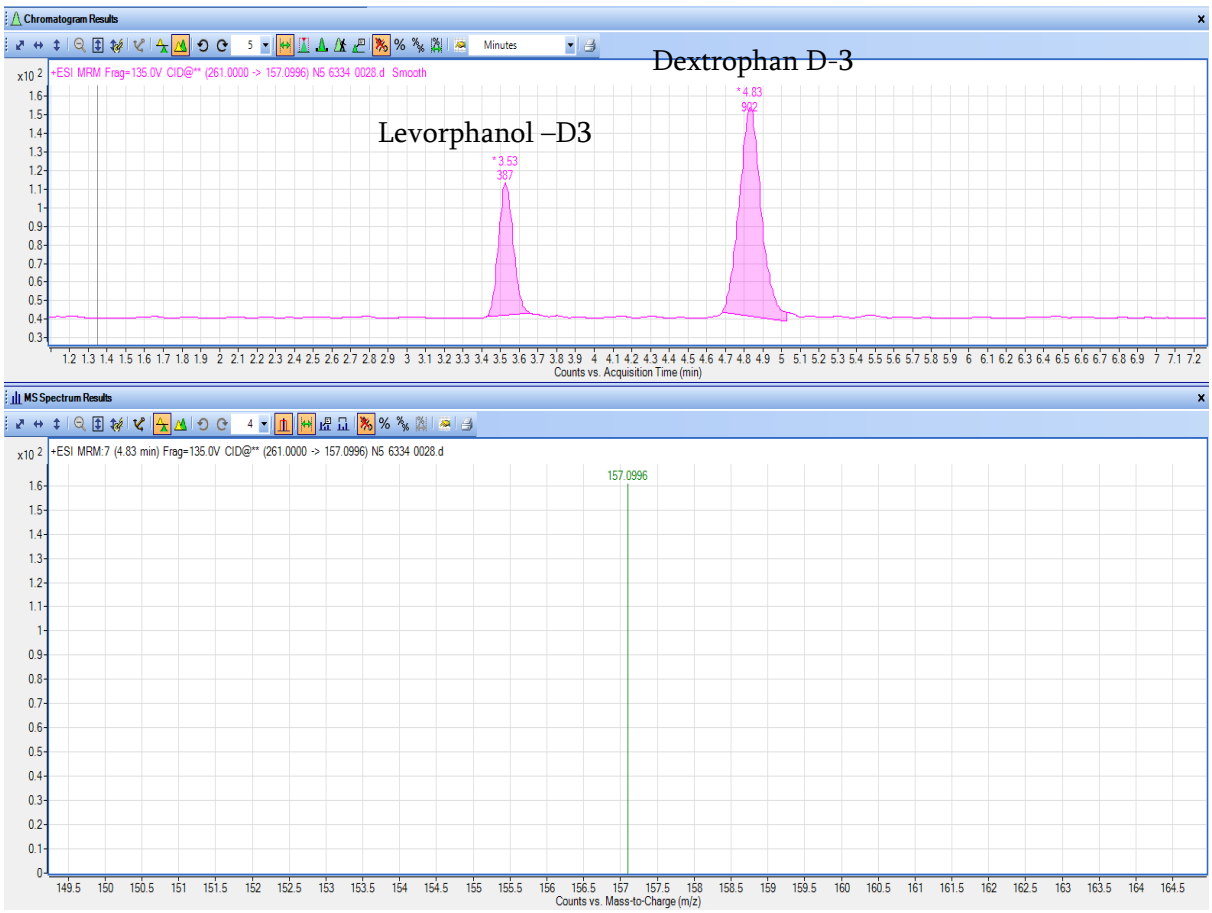
30. F. Bortolotti, A. Bertaso, R. Gottardo, G. Musile, F. Tagliaro, Dextromethorphan/ levomethorphan issues in a case of opiate overdose, Drug Test. Anal. 5 (2013) 781–784;

31. A. Bertaso, G. Musile, R. Gottardo, C. Seri, F. Tagliaro, Chiral analysis of methorphan in opiate-overdose related deaths by using capillary electrophoresis, J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 1000 (2015) 130–135;

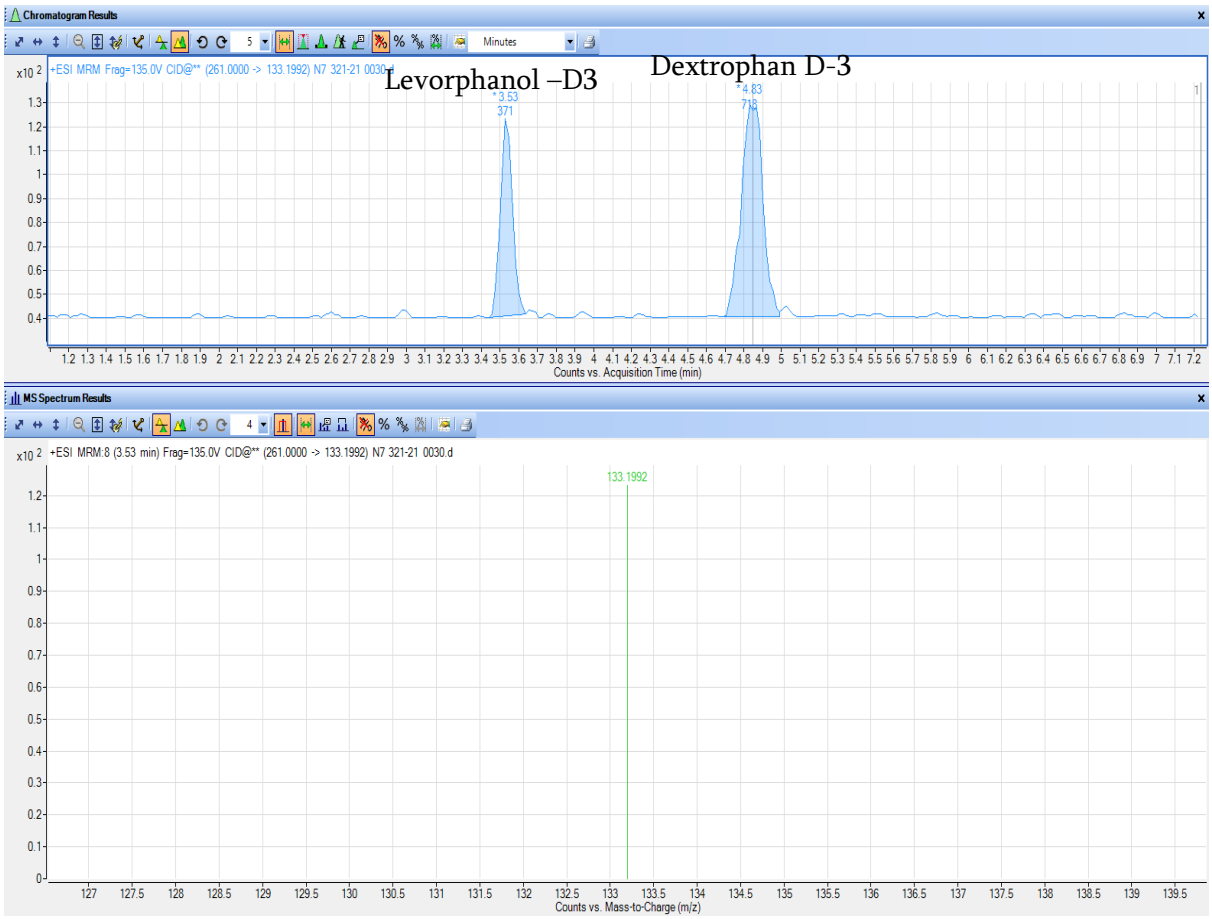
7. დანართი



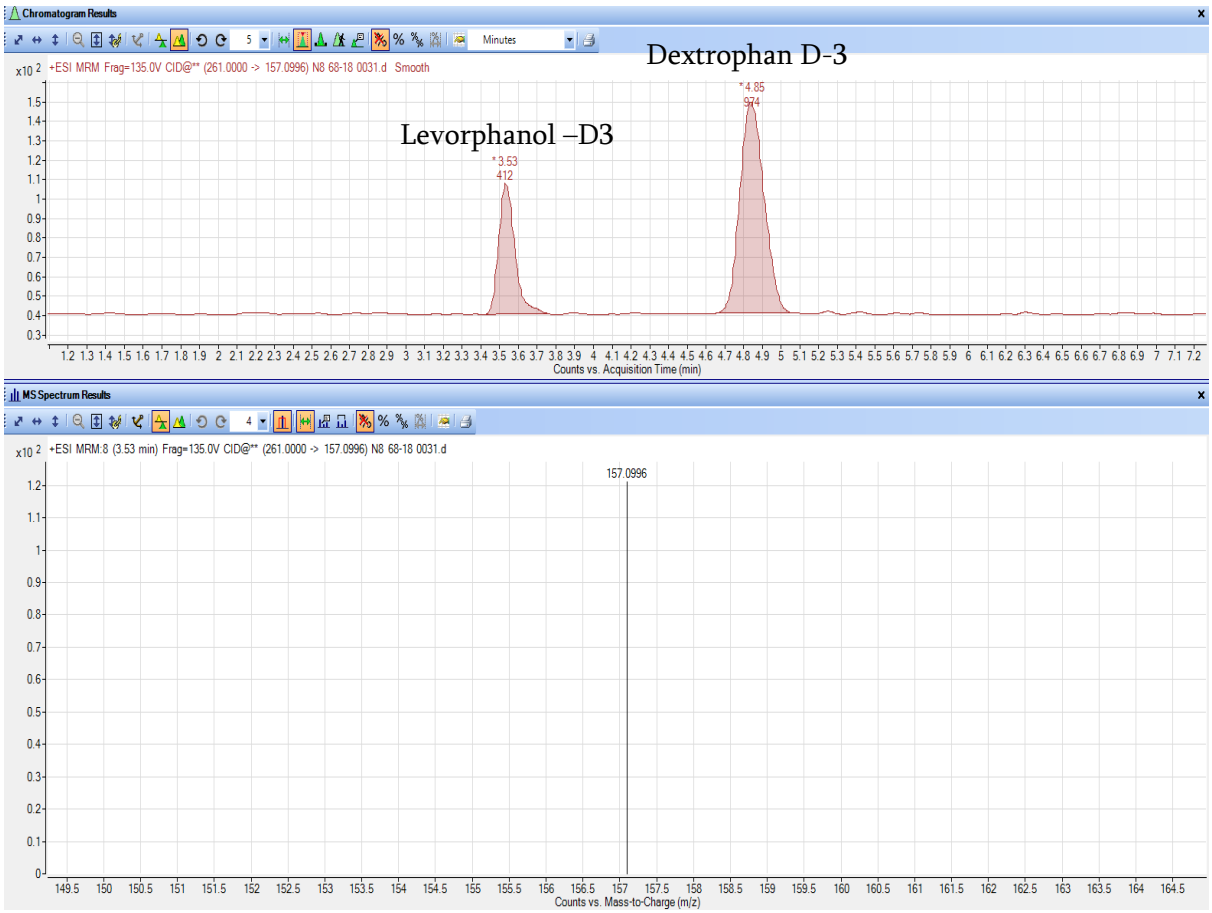
სურათი 9. ნიმუში 154-22



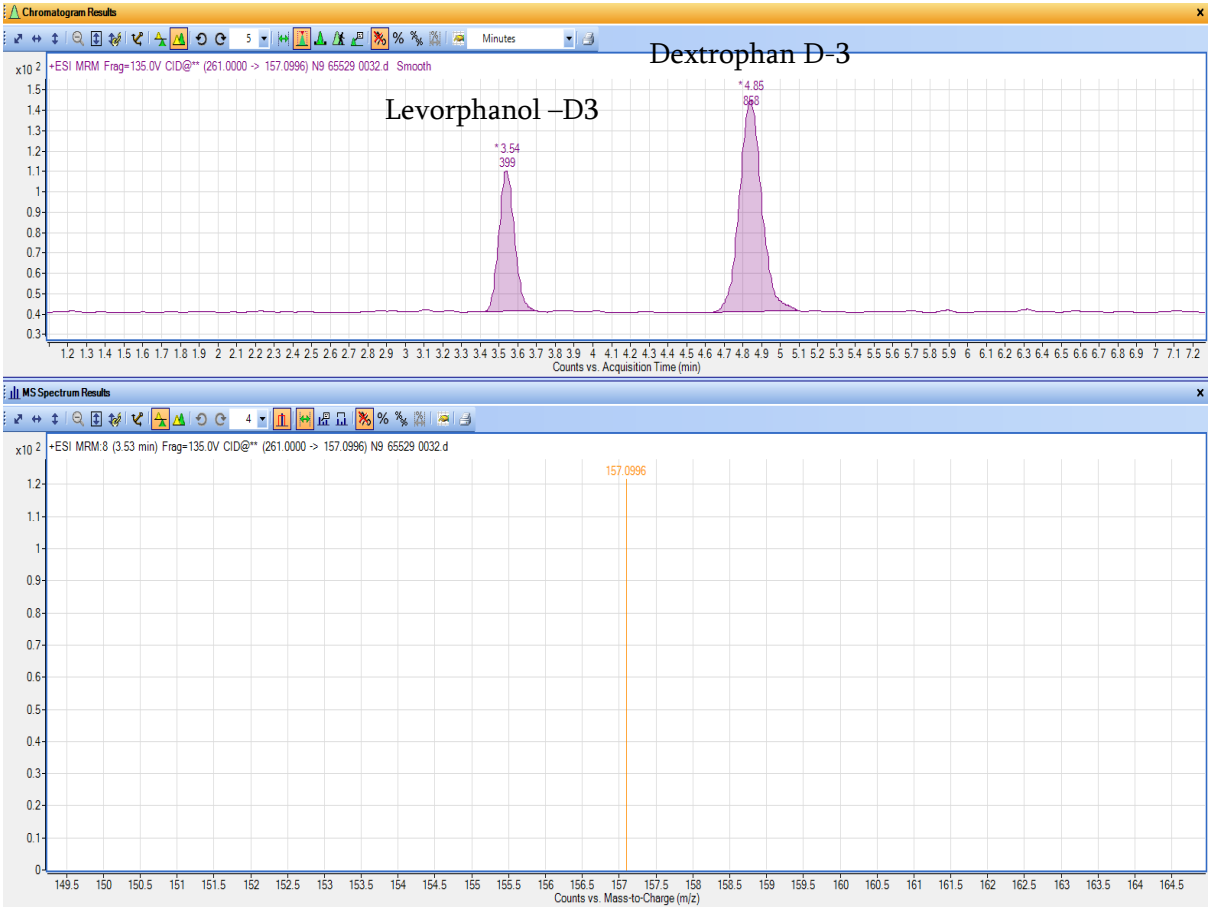
სურათი 10. ნიმუში 6334



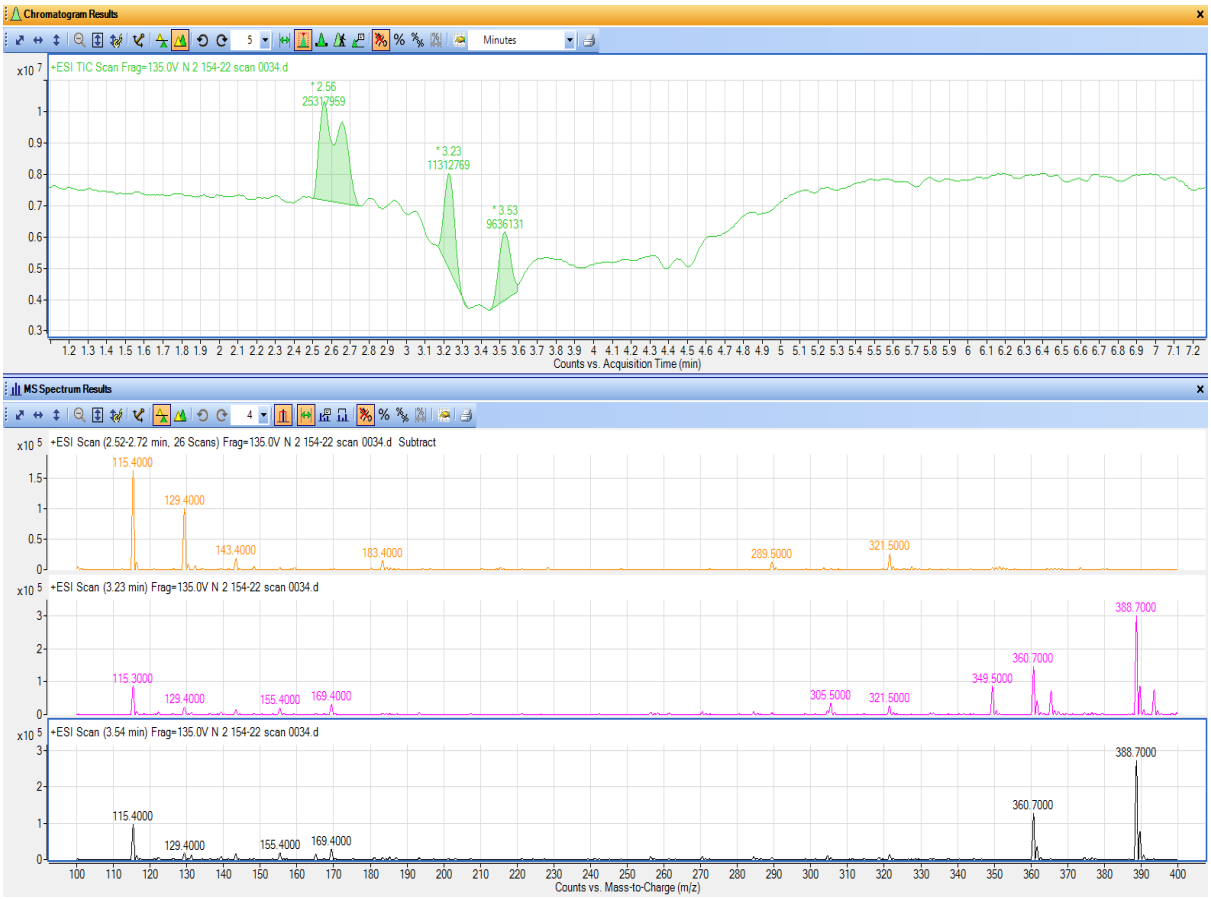
სურათი 11. ნიმუში 321-21



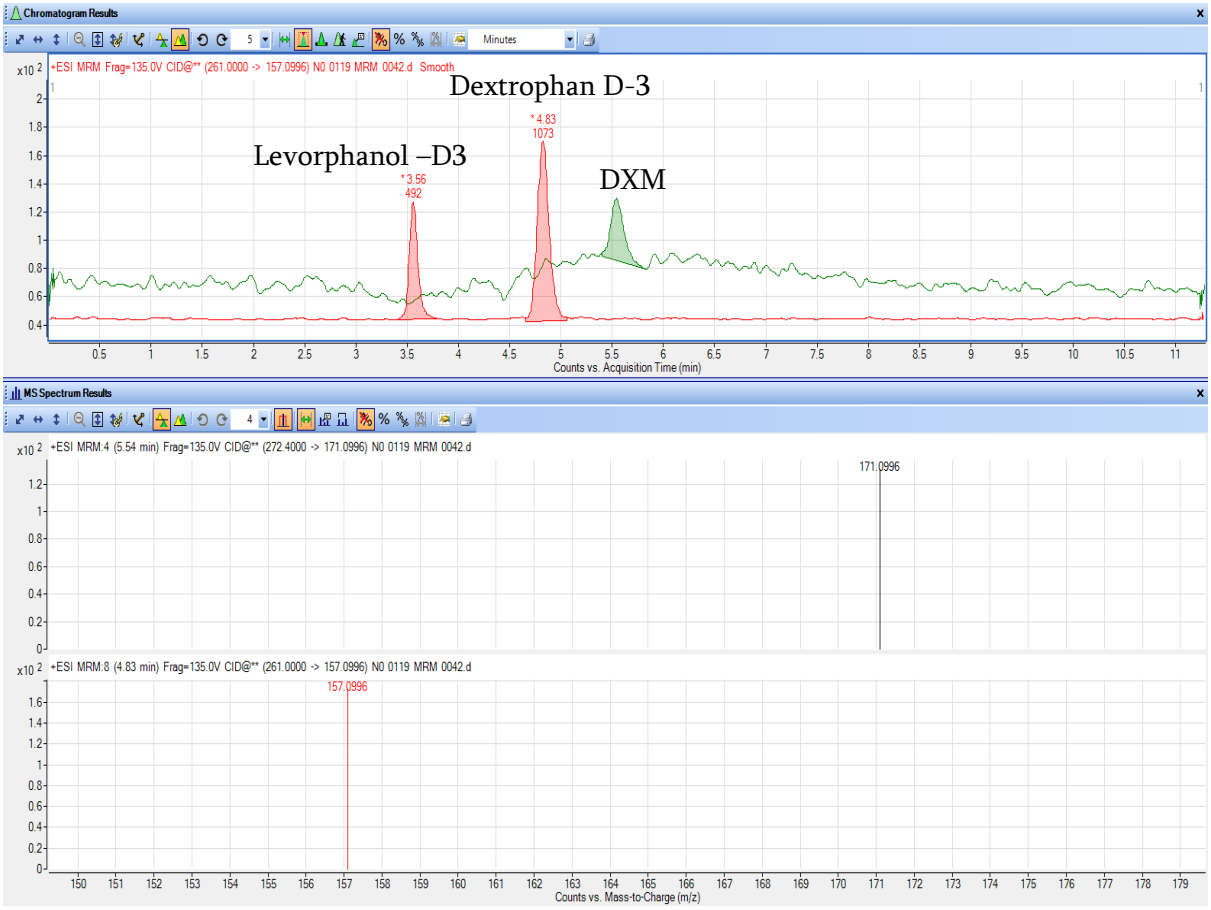
სურათი 12. ნიმუში 68-18



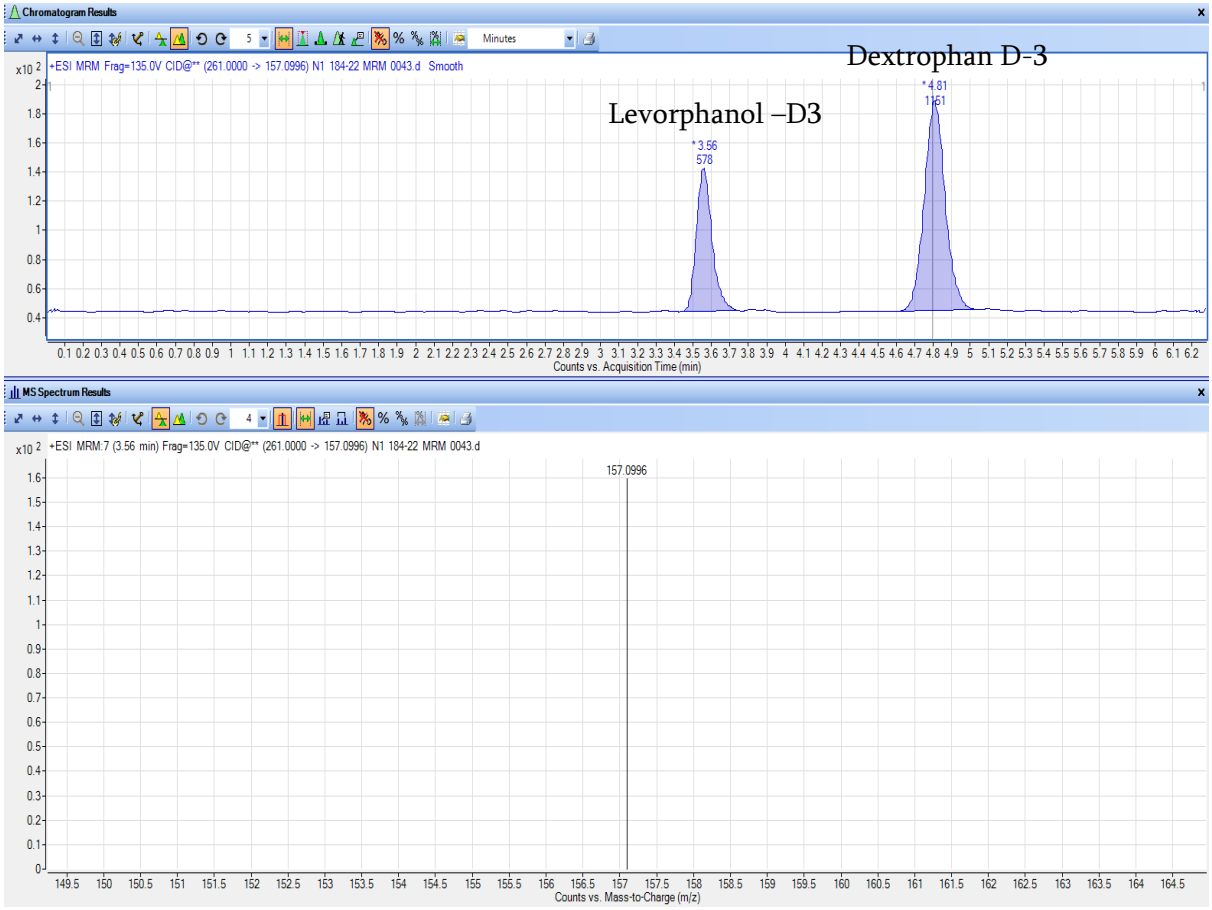
სურათი 13. ნიმუში 65529



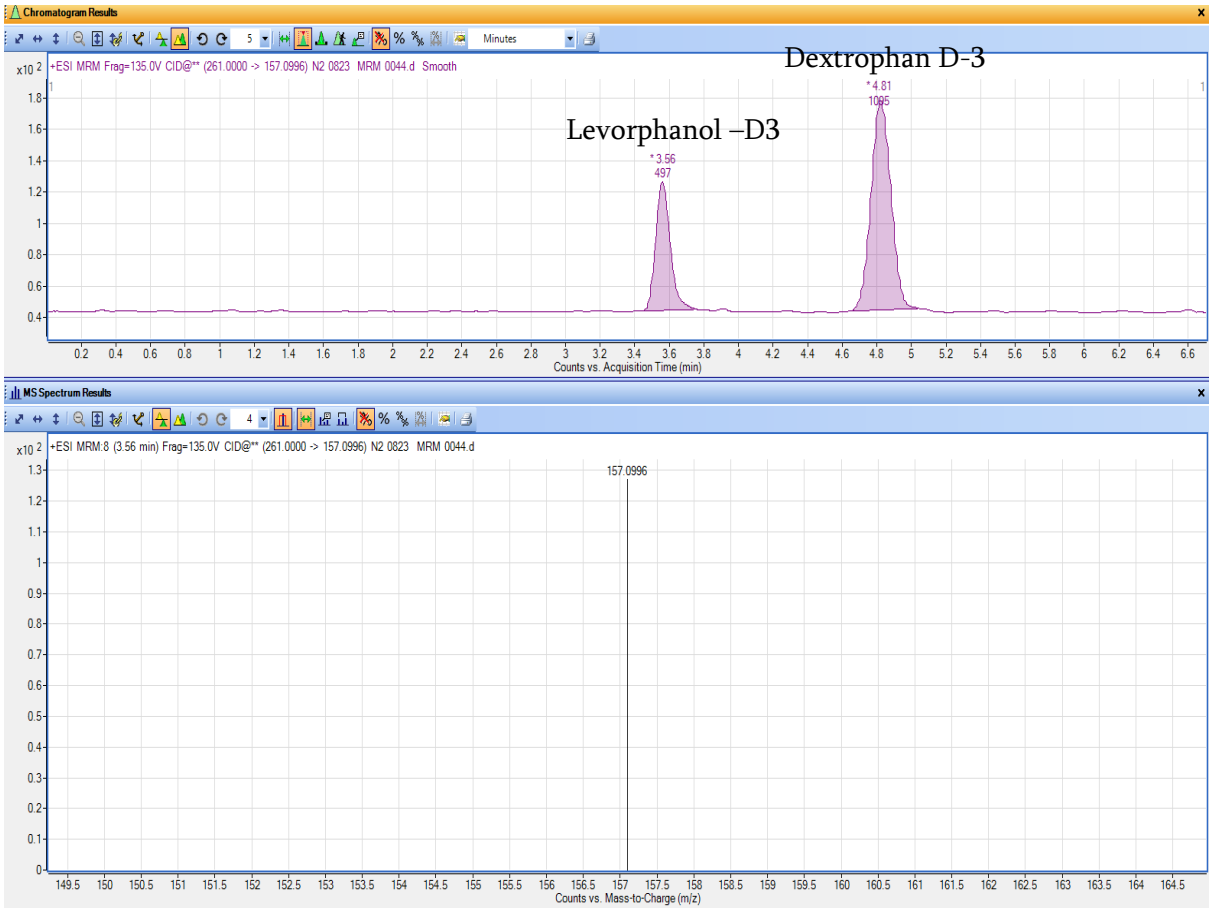
სურათი 14. ნიმუში 154-22



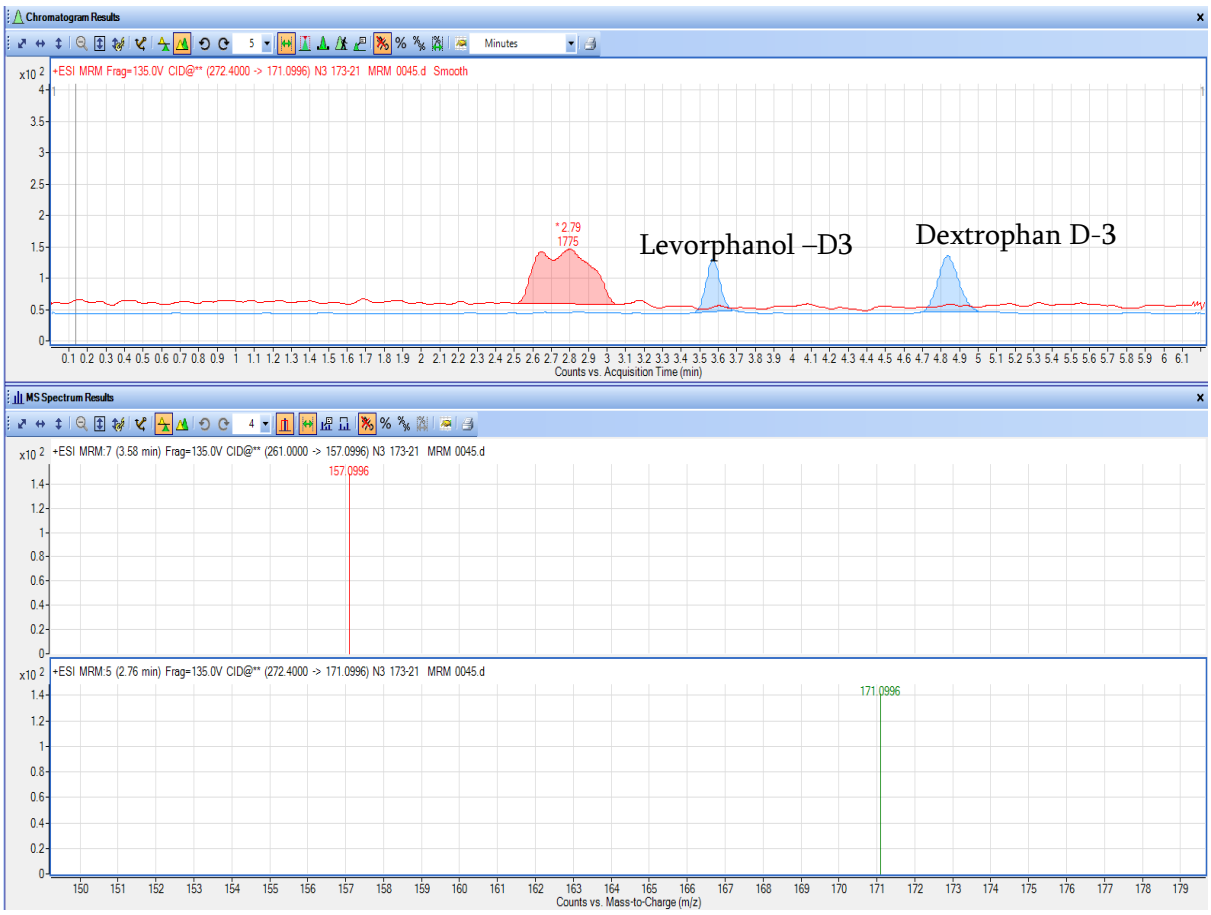
სურათი 15. ნიმუში 0119



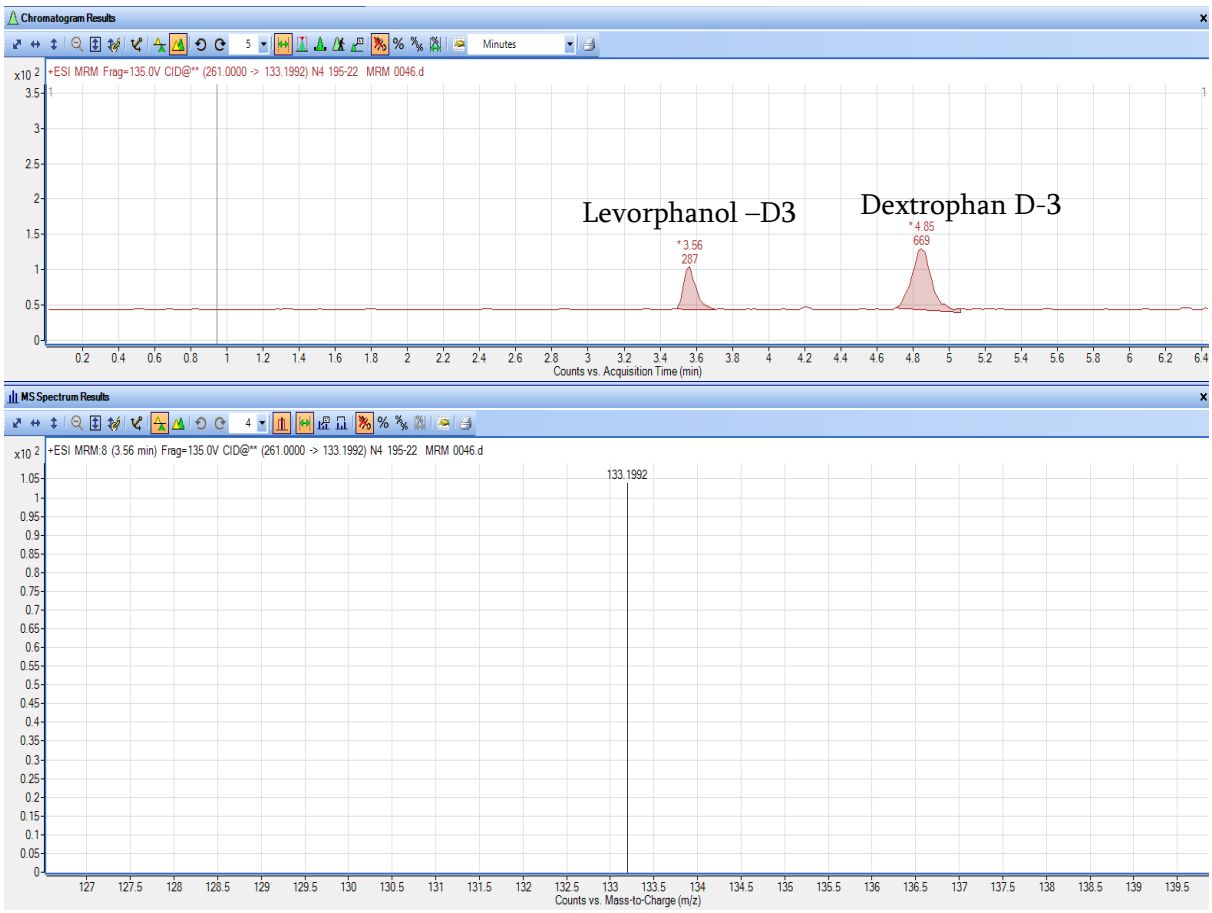
სურათი 16. ნიმუში 184-22



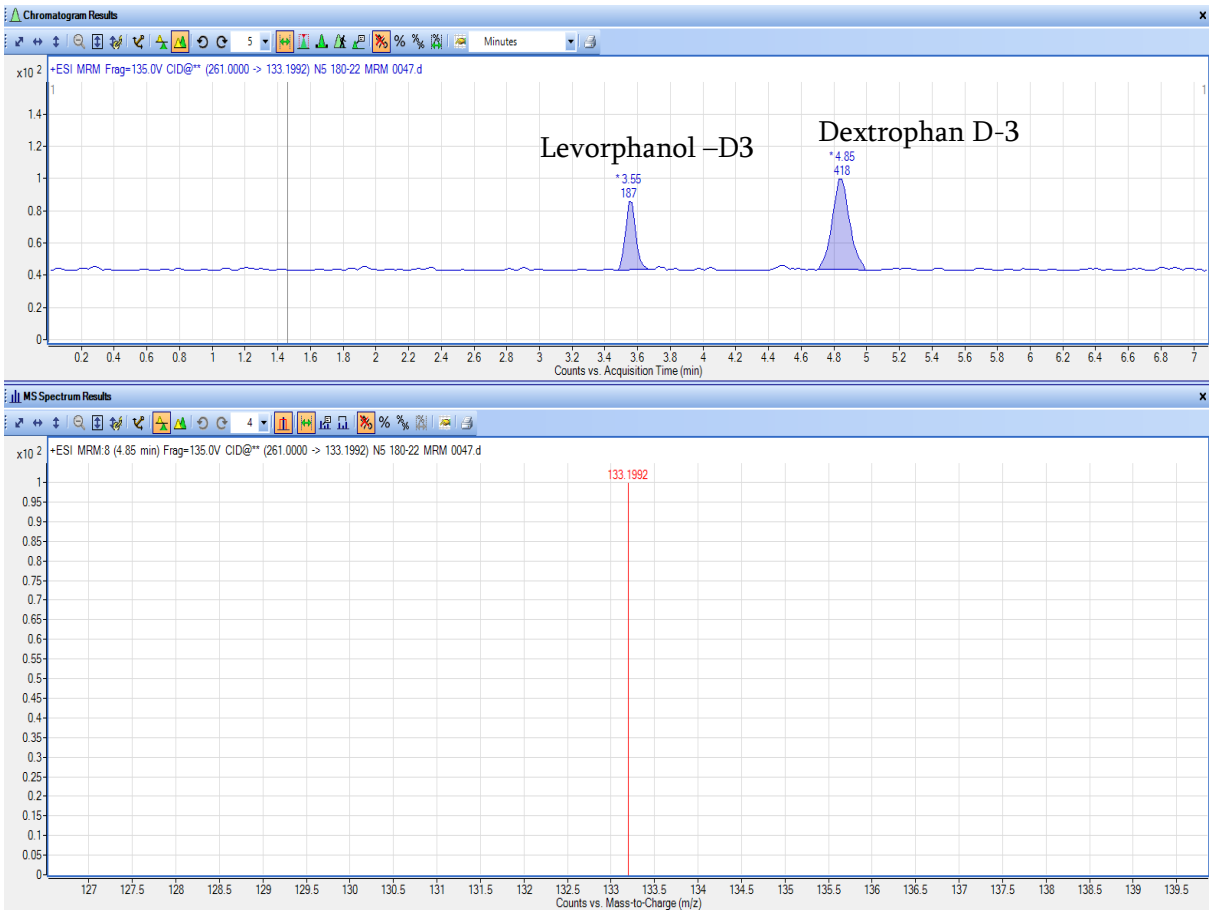
სურათი 17. ნიმუში 0823



სურათი 18. ნიმუში 173-21

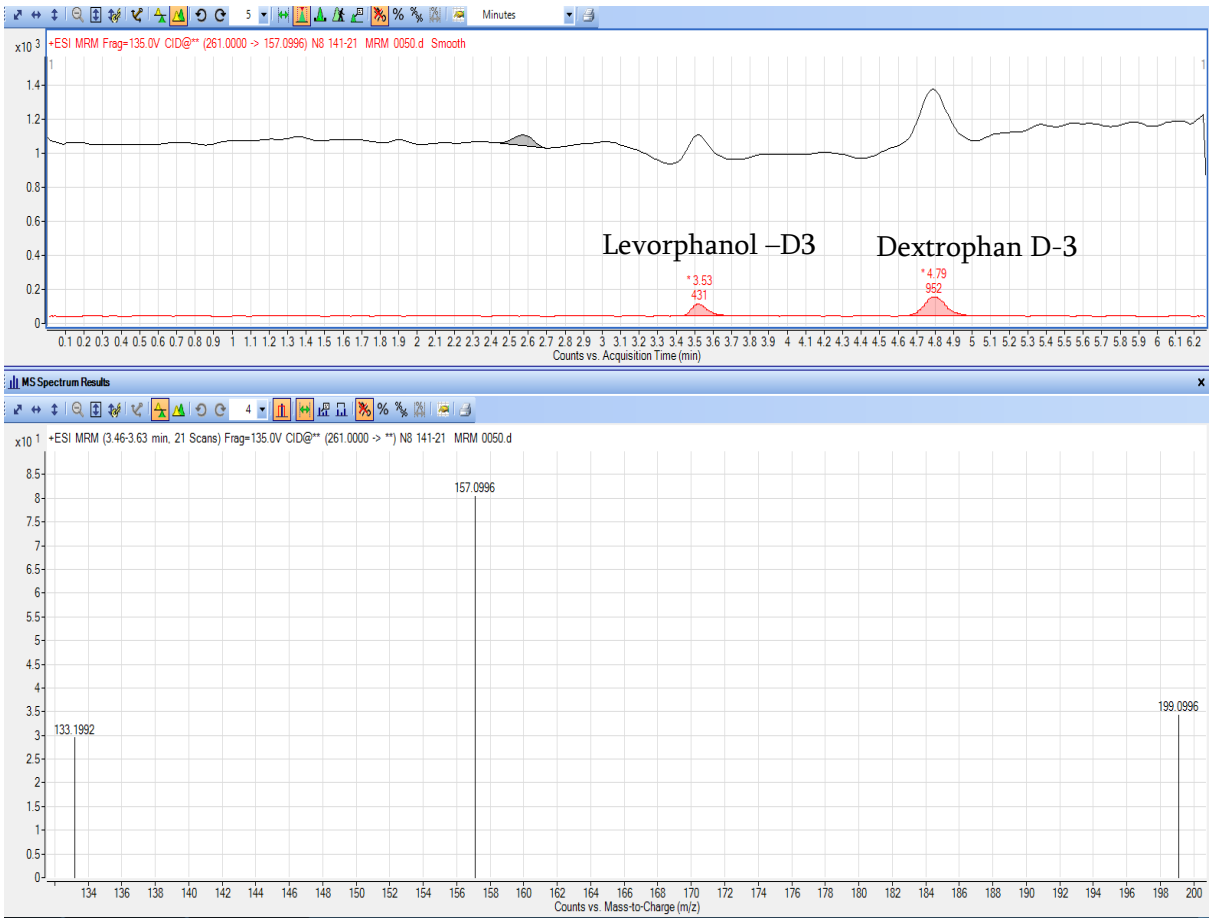


სურათი 19. ნიმუში 195-22

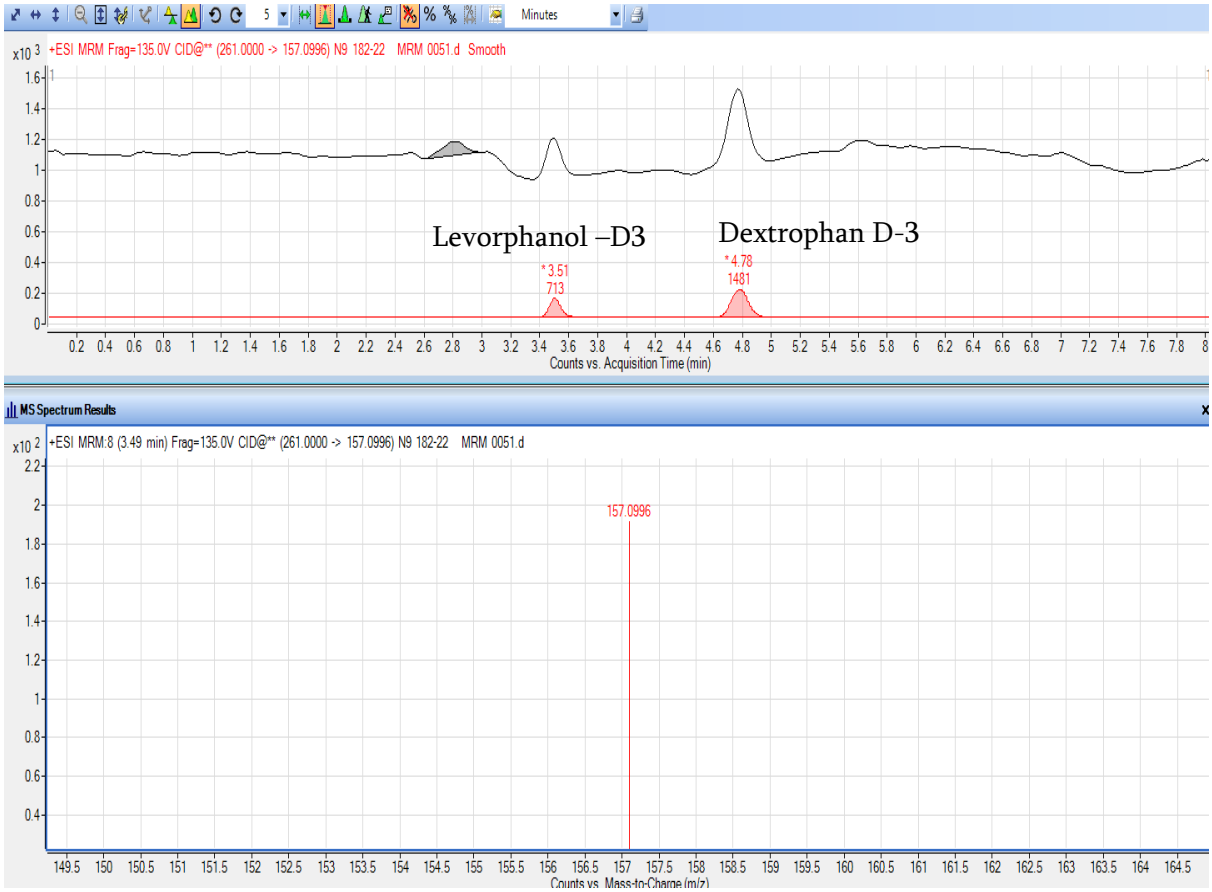


სურათი 20. ნიმუში 180-22

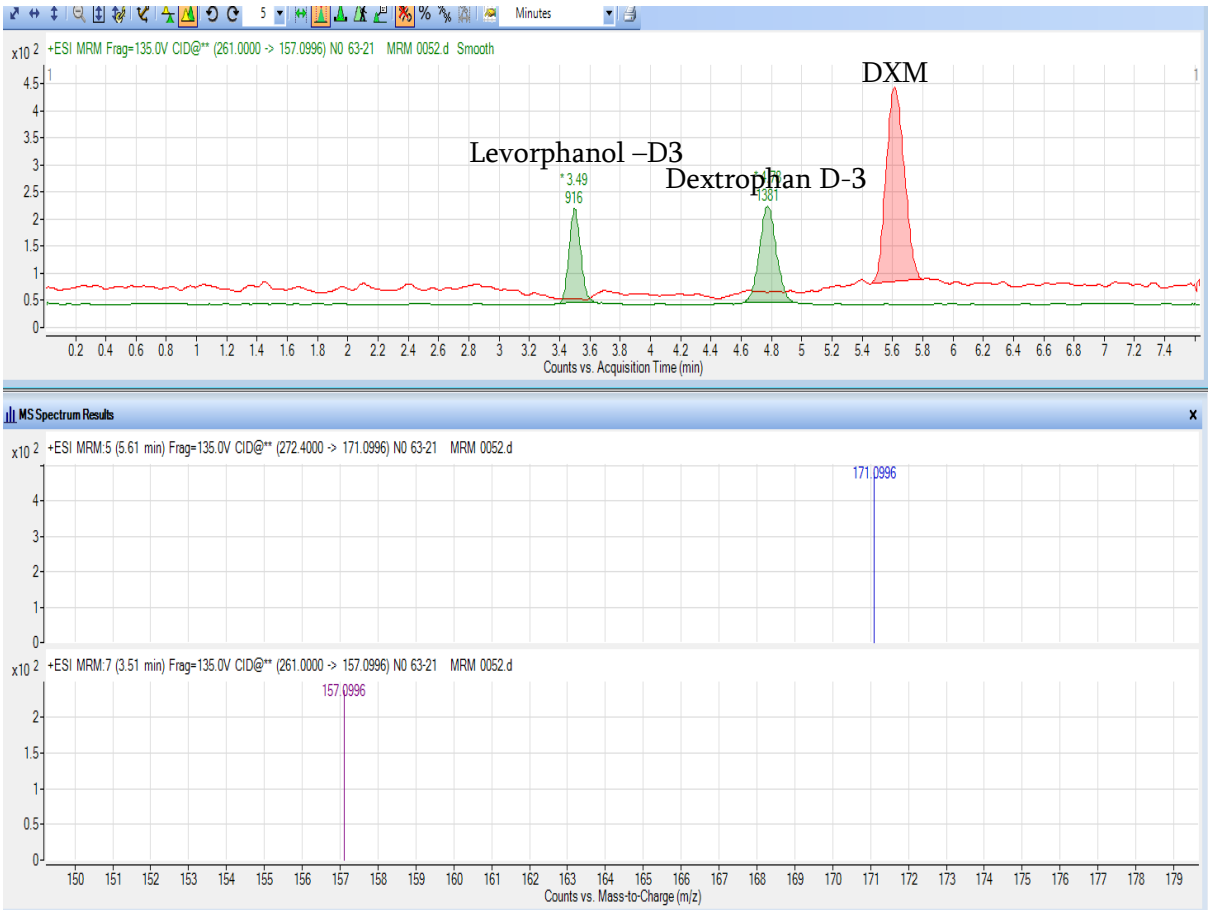
სურათი 21. ნიმუში 201-22



სურათი 22. ნიმუში 141-21

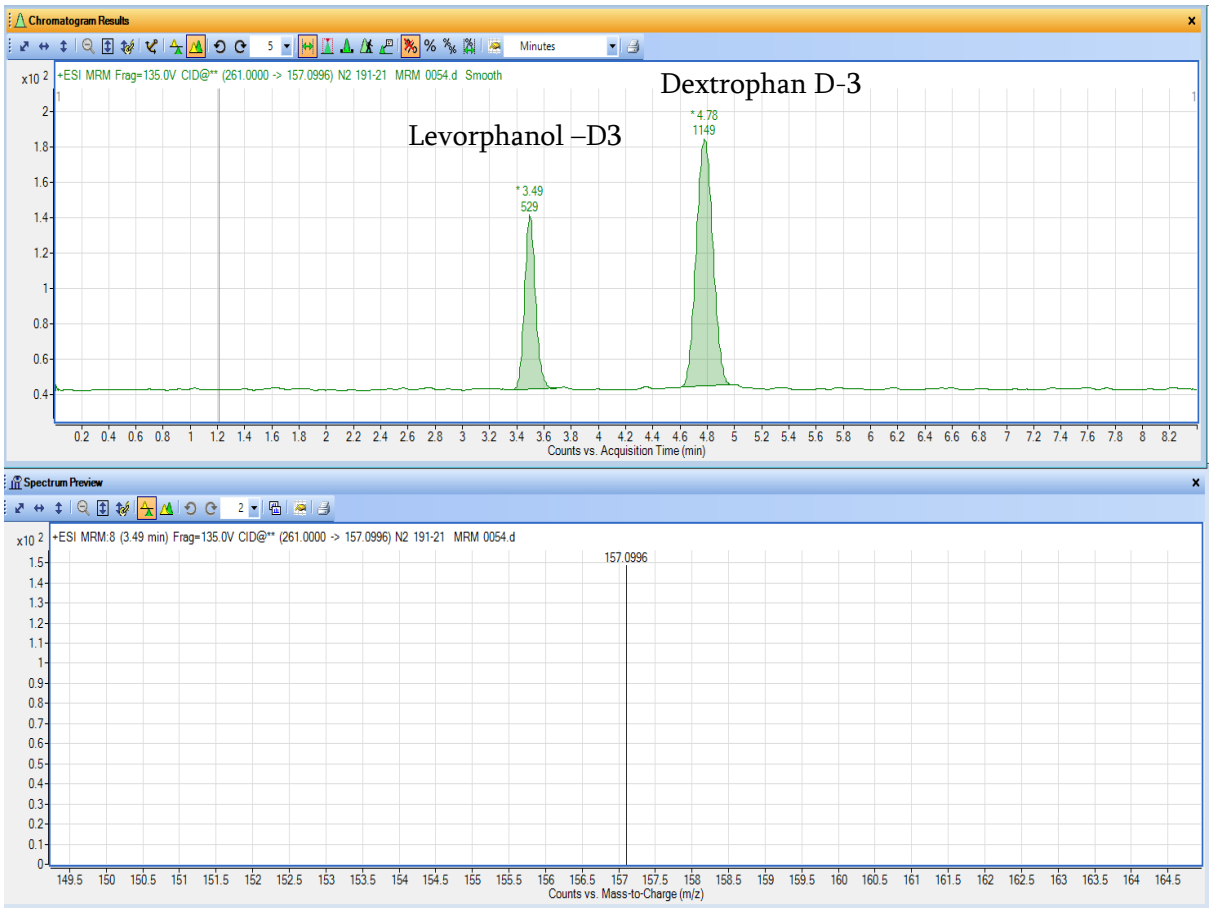


სურათი 23. ნიმუში 182-22

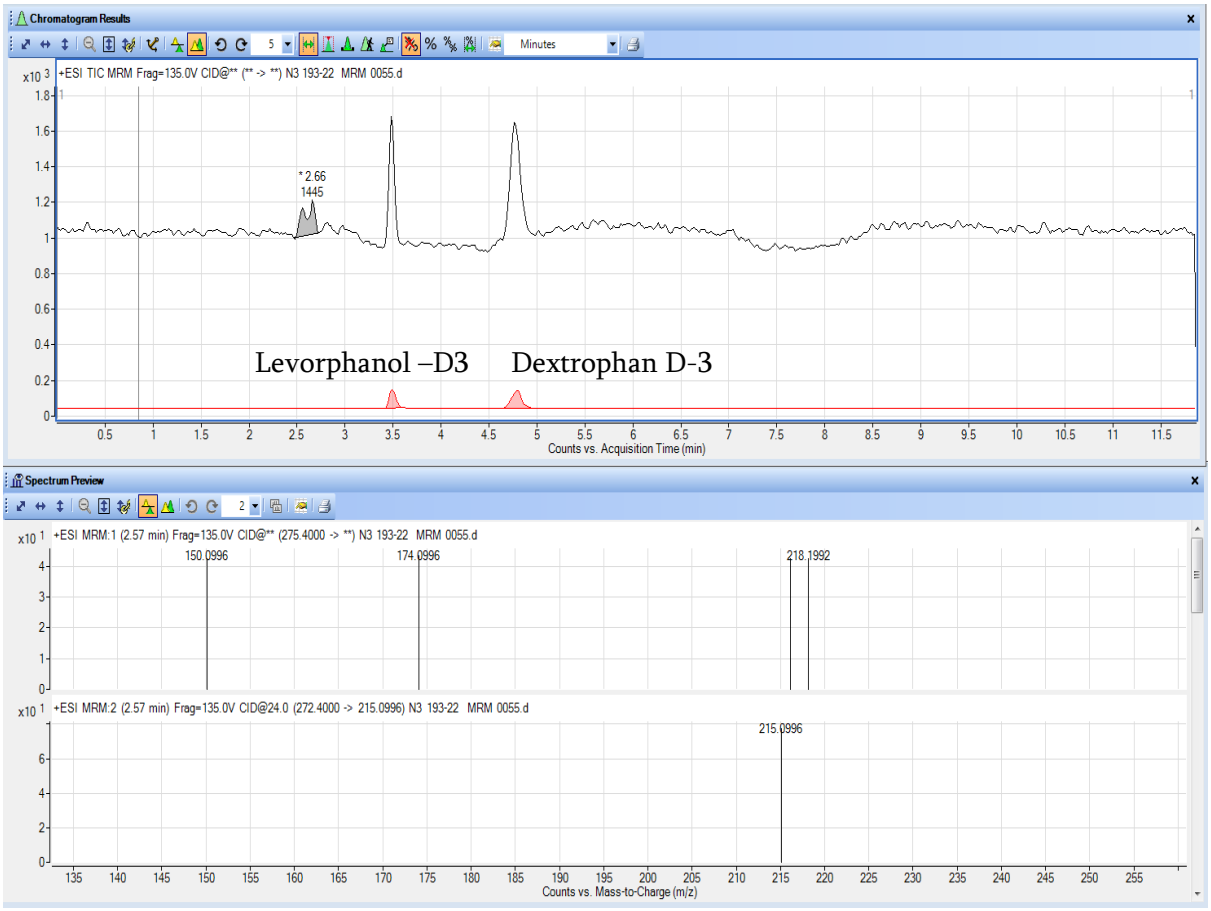


სურათ 24. ნიმუში 63-21

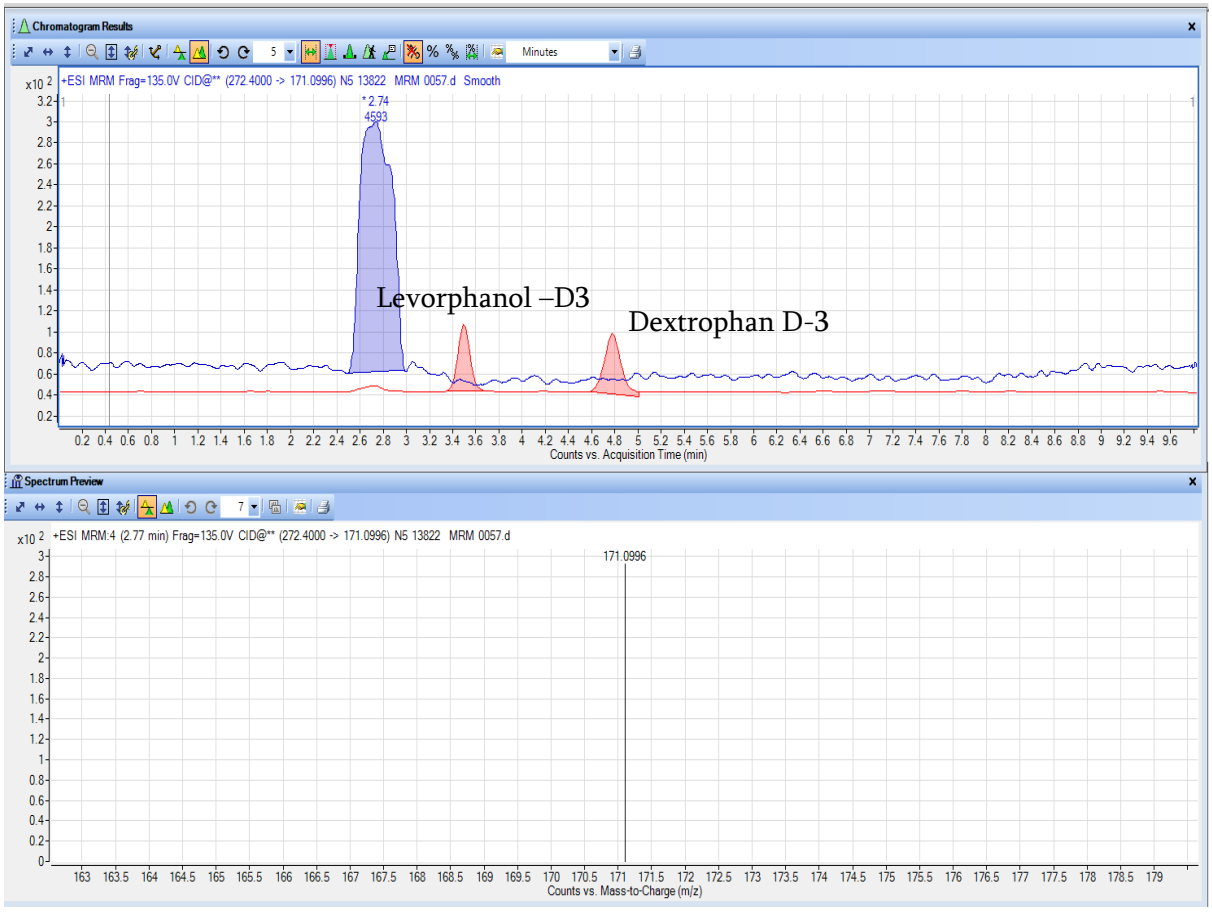
სურათი 25. ნიმუში 176-22



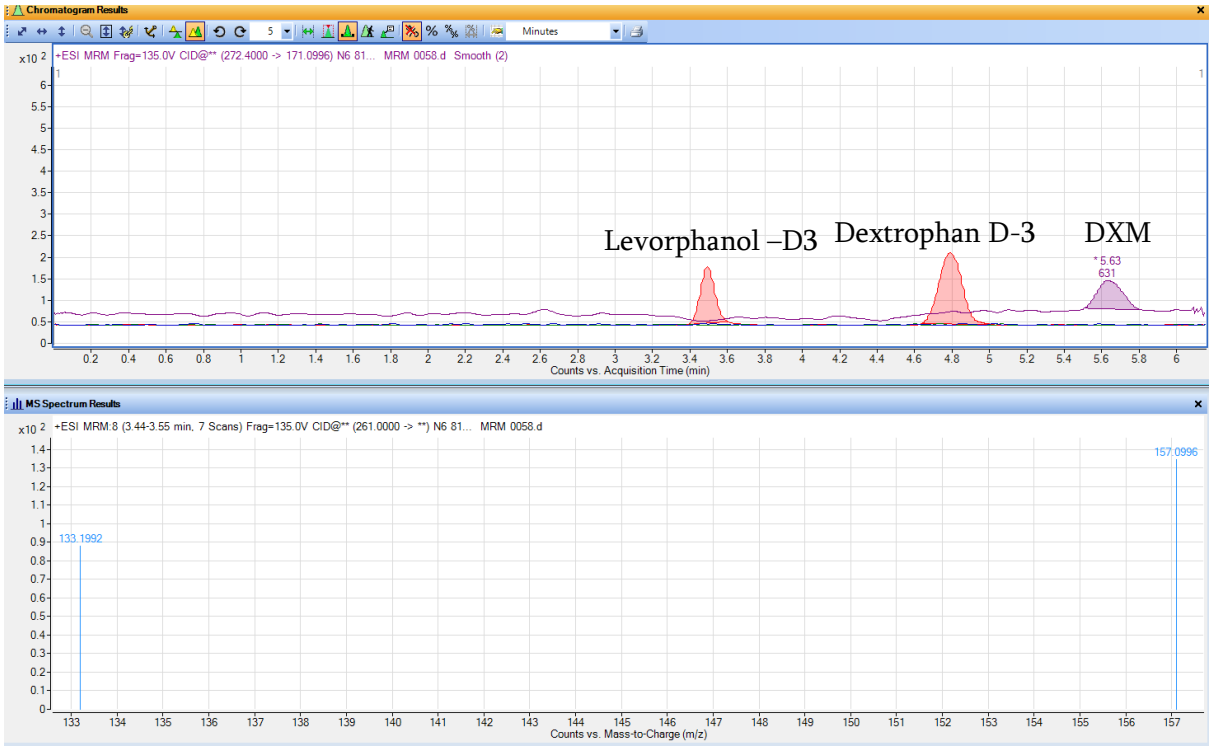
სურათი 26. ნიმუში 191-21



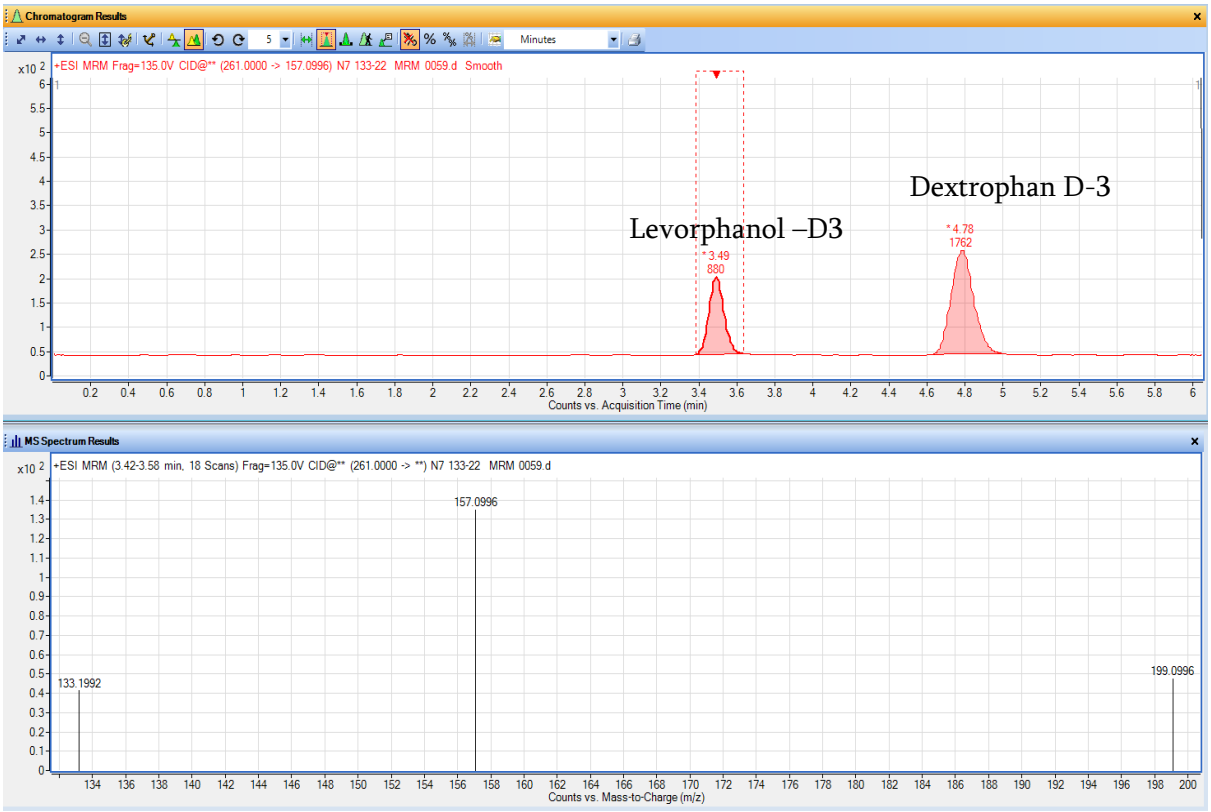
სურათი 27. ნიმუში 193-22



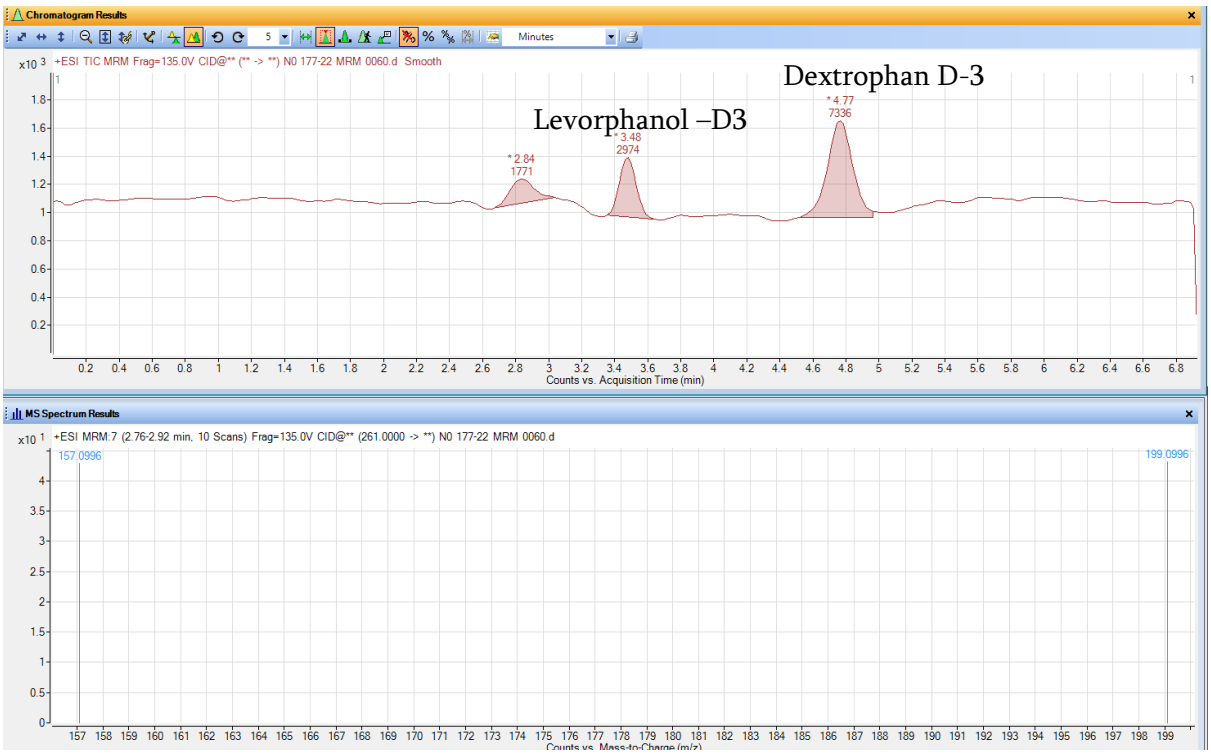
სურათი 28. ნიმუში 13822



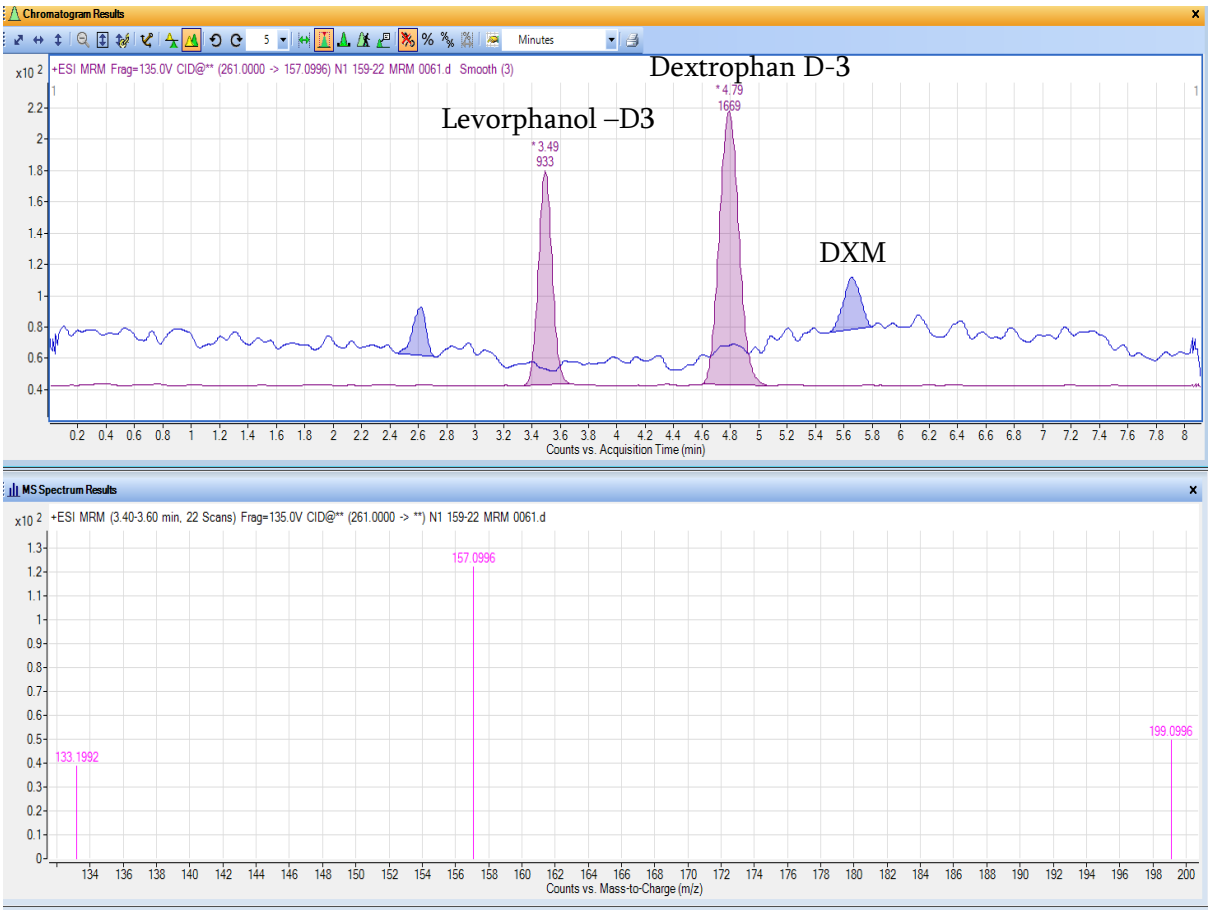
სურათი 29. ნიმუში 810-22



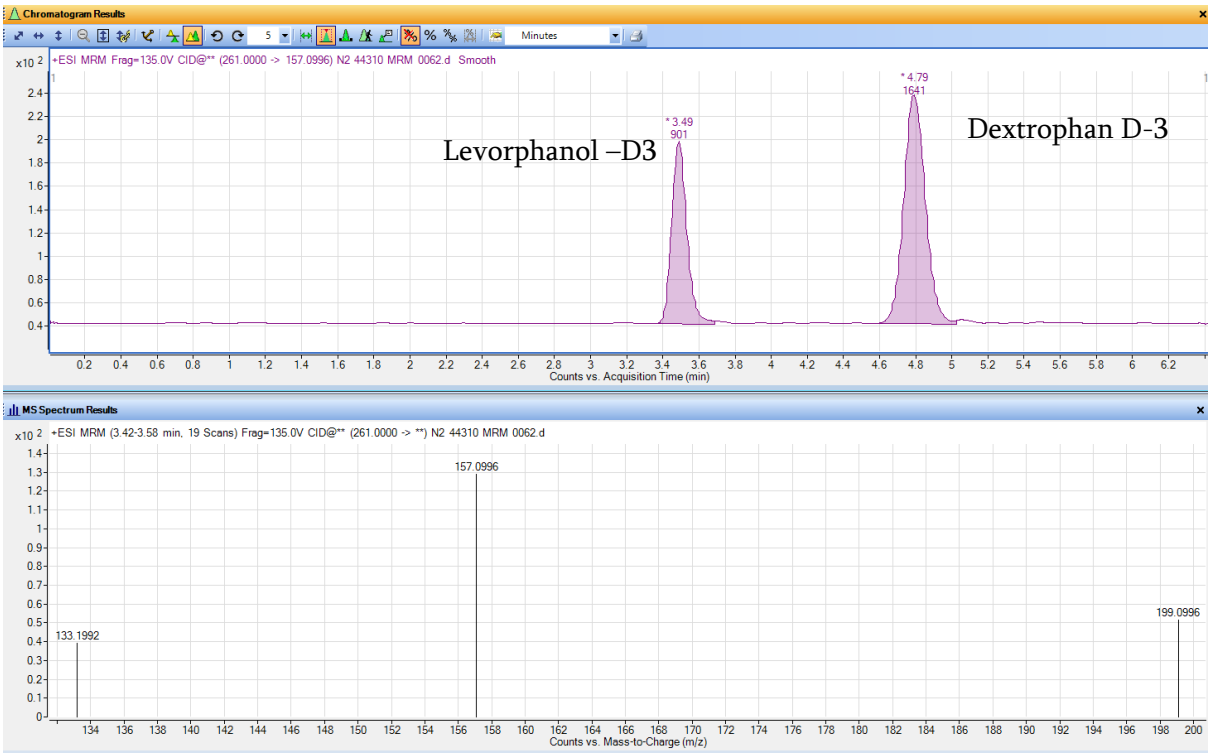
სურათი 30. ნიმუში 133-22



სურათი 31. ნიმუში 177-22

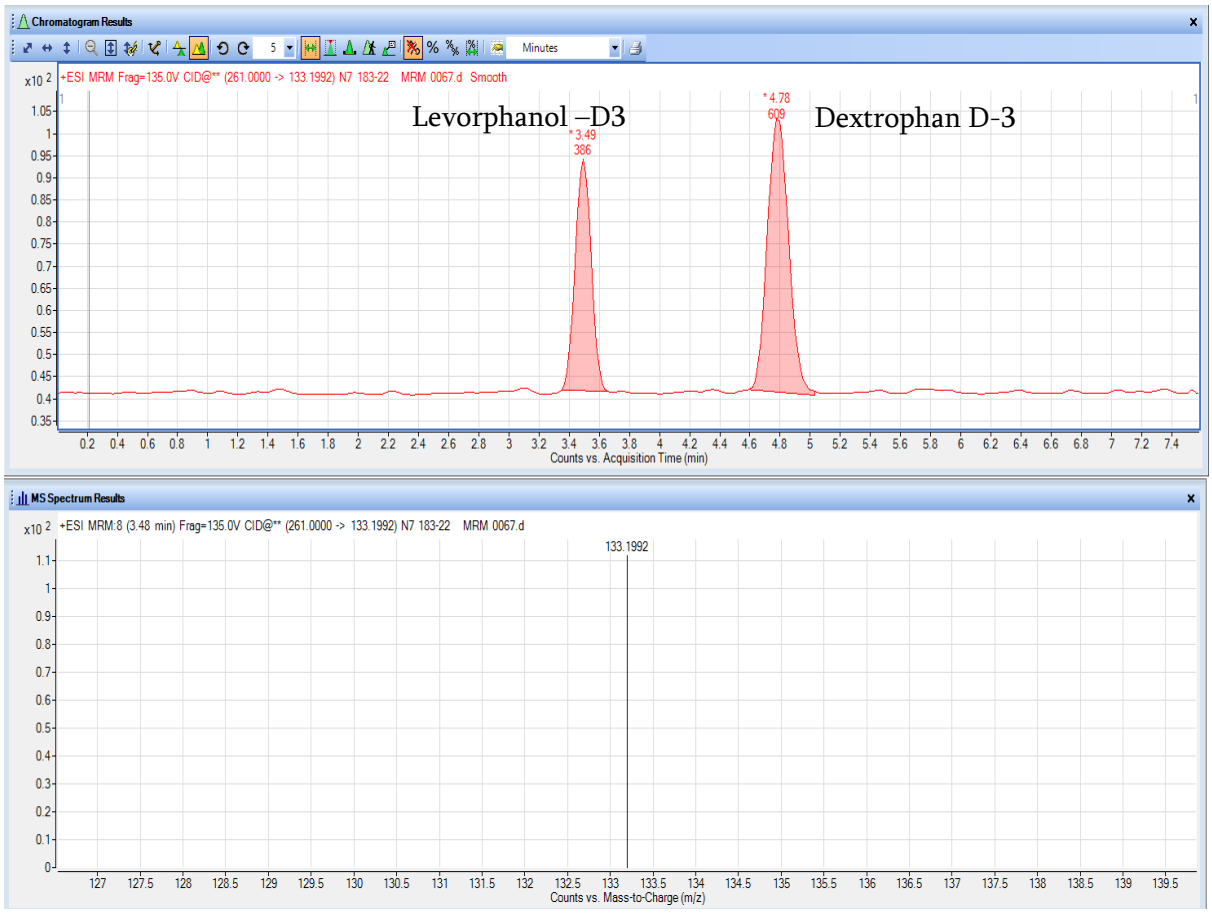


სურათი 32. ნიმუში 159-22



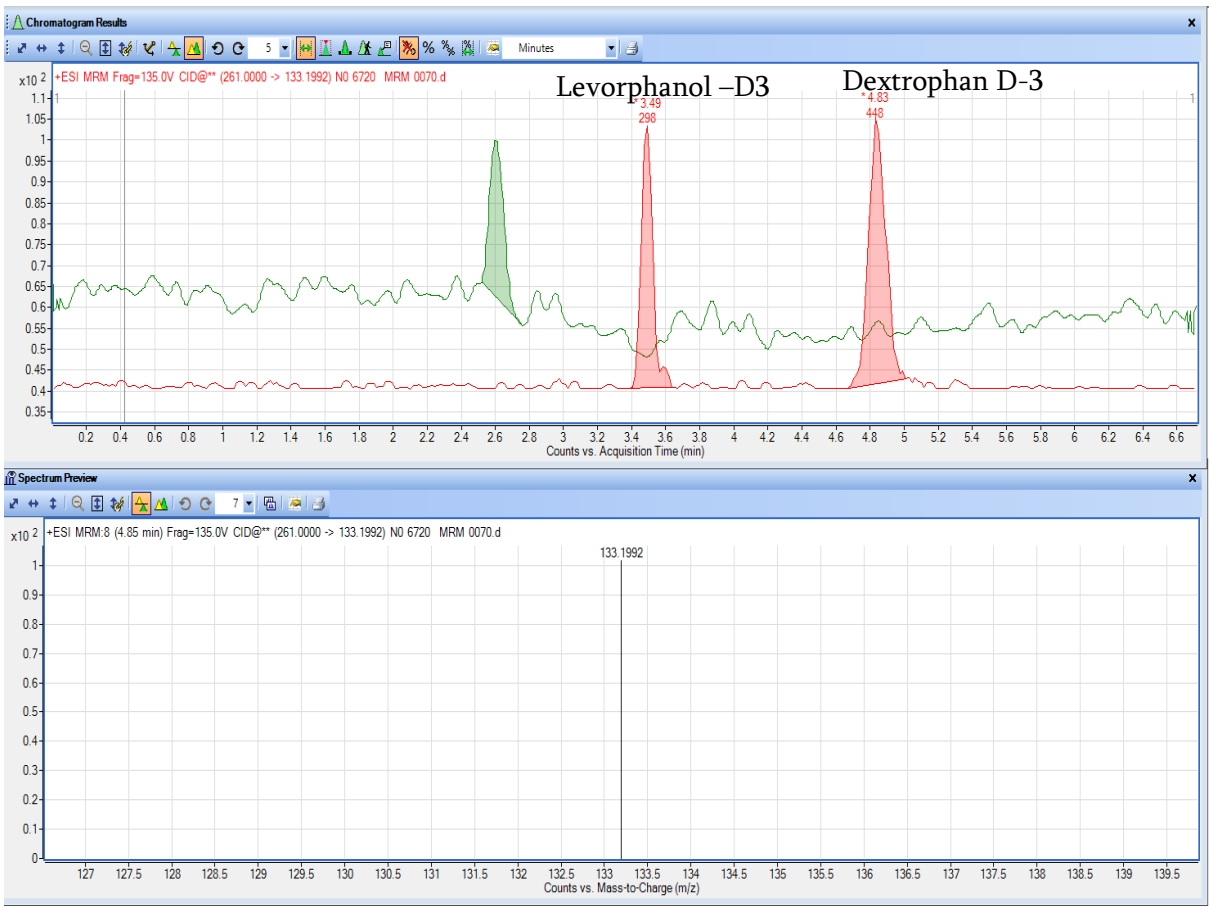
სურათი 33. ნიმუში 44310

სურათი 34. ნიმუში 2819

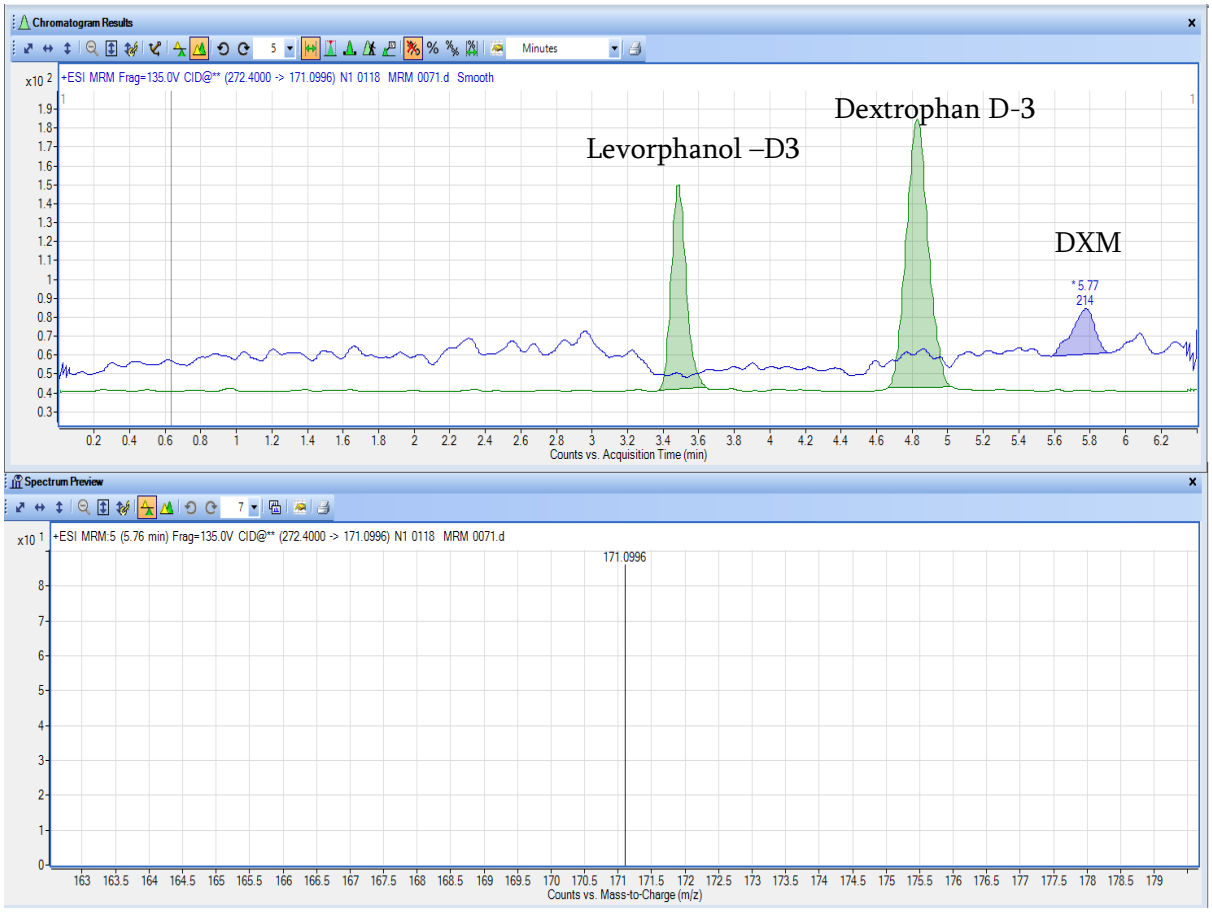


სურათი 35. ნიმუში 183-22

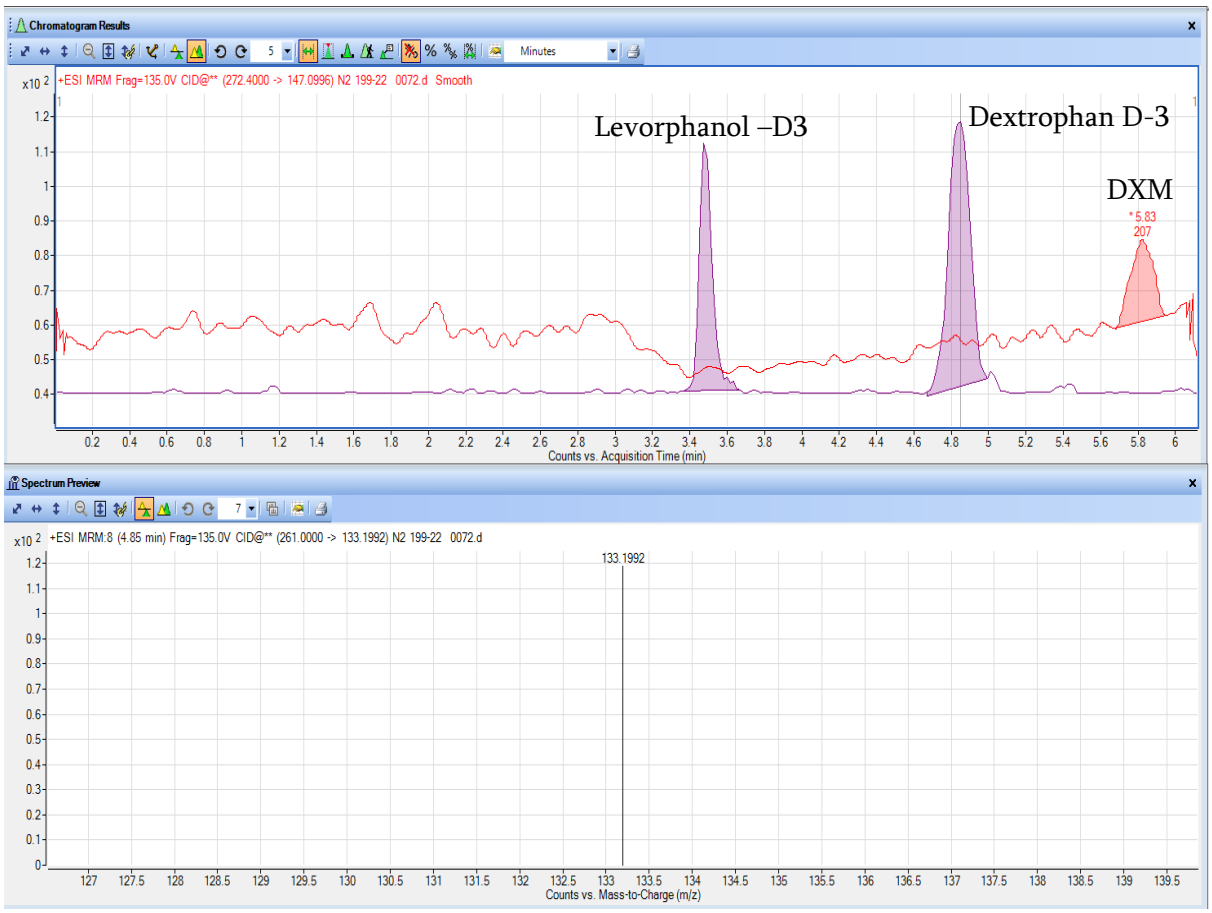
სურათი 36. ნიმუში 455



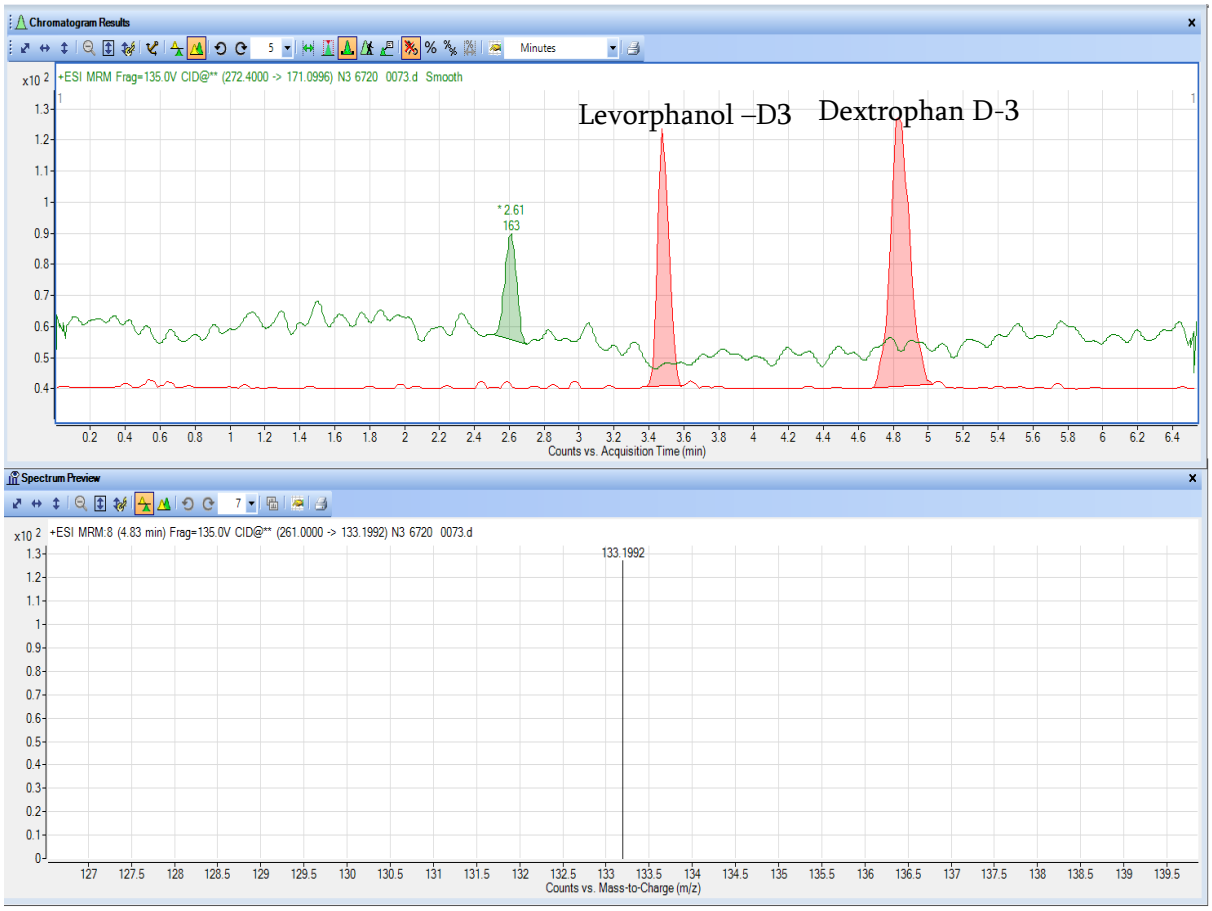
სურათი 37. ნიმუში 6729



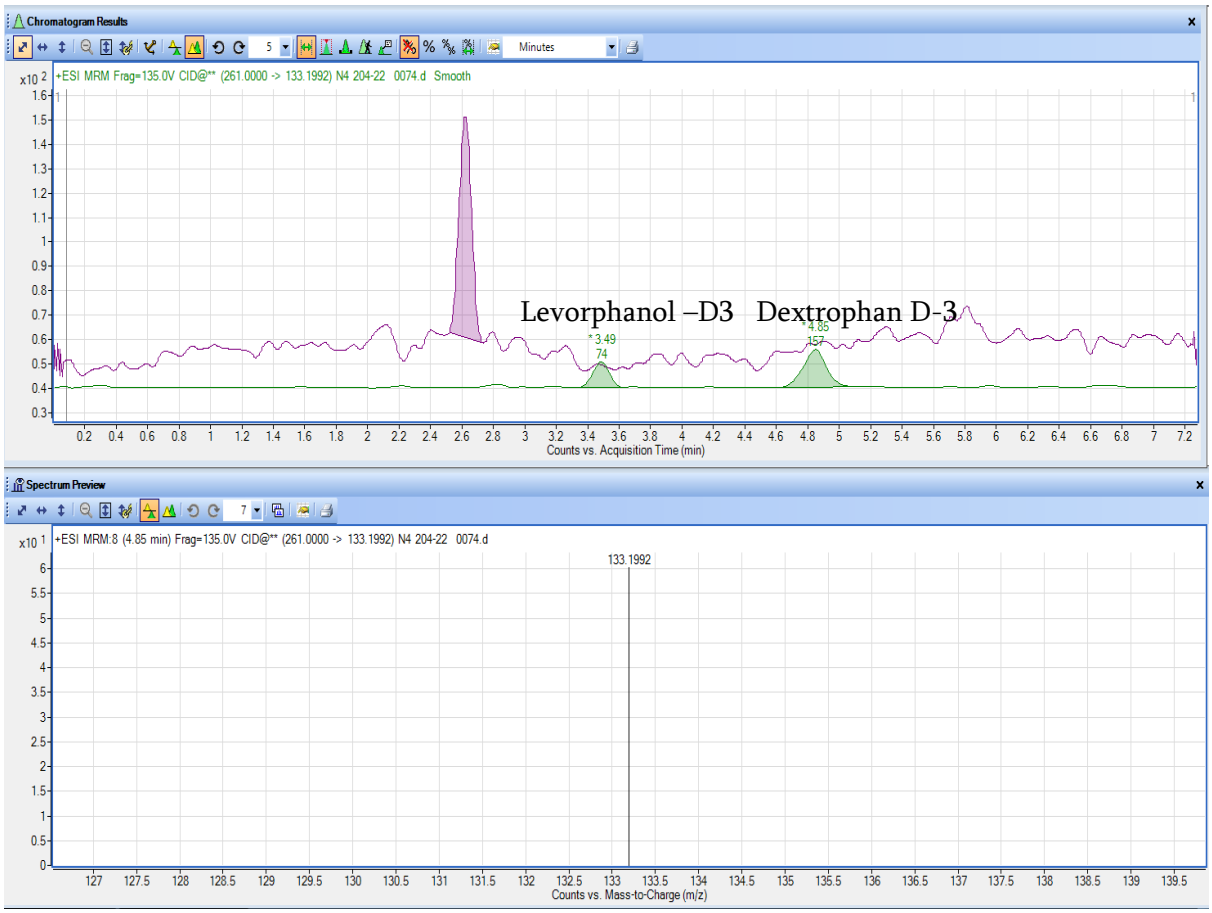
სურათი 38. ნიმუში 0118



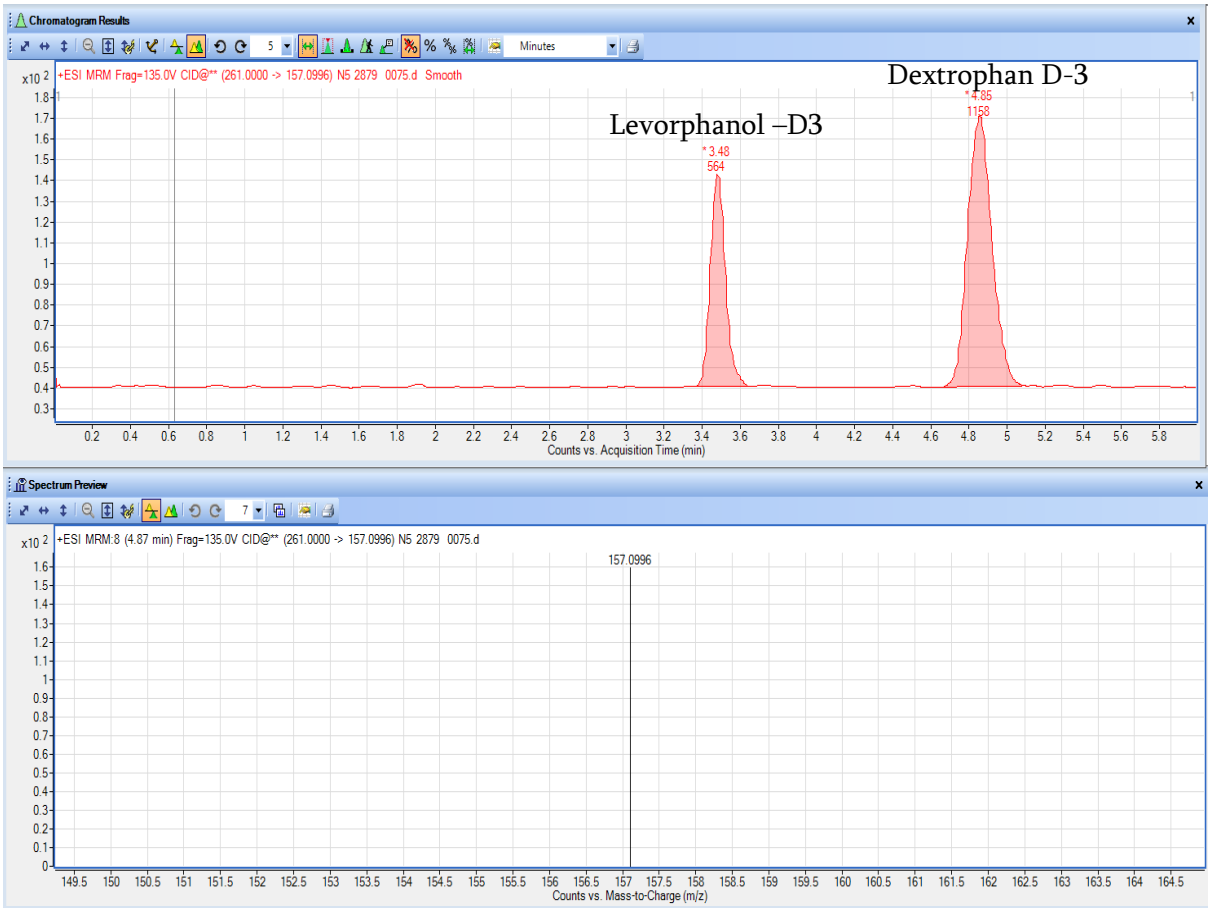
სურათი 39. ნიმუში 199-22



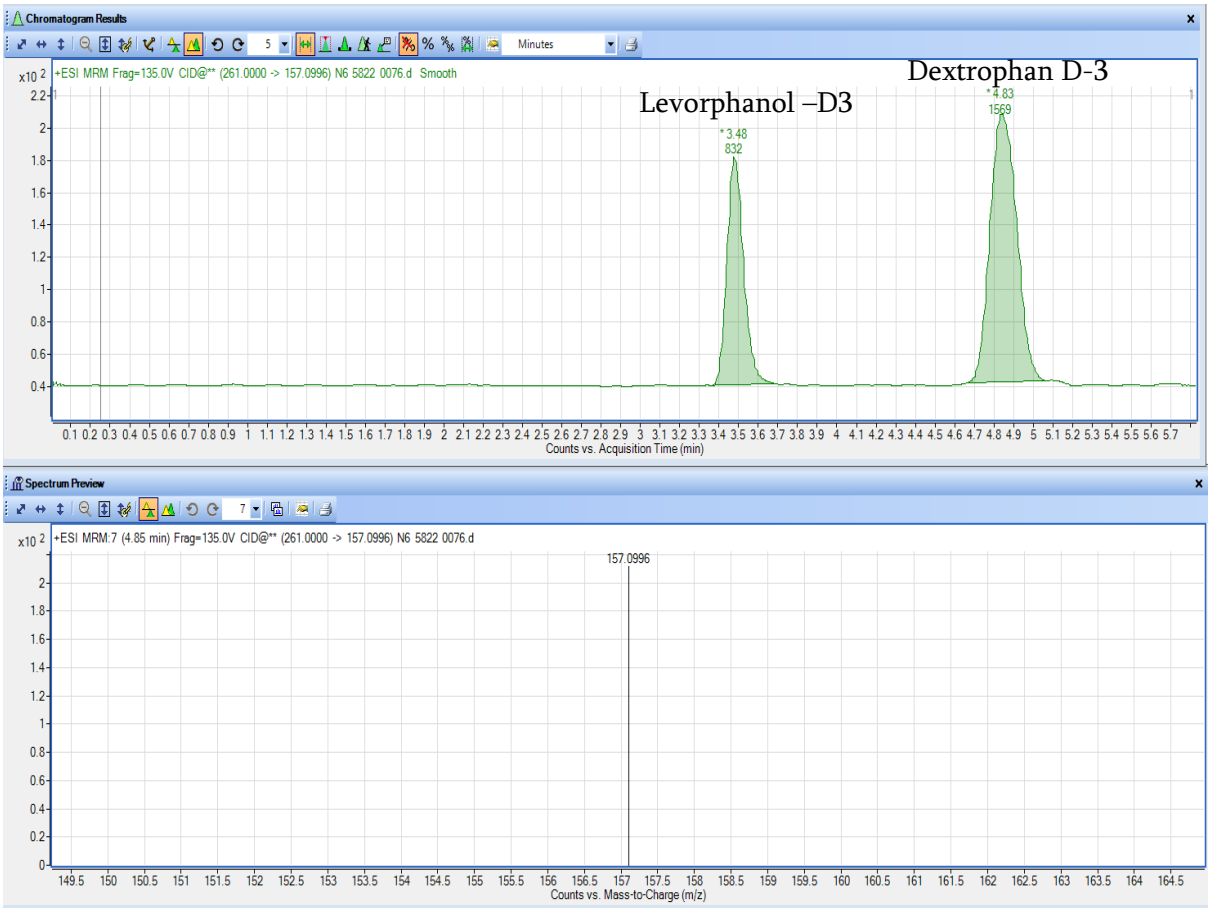
სურათი 40. ნიმუში 6720



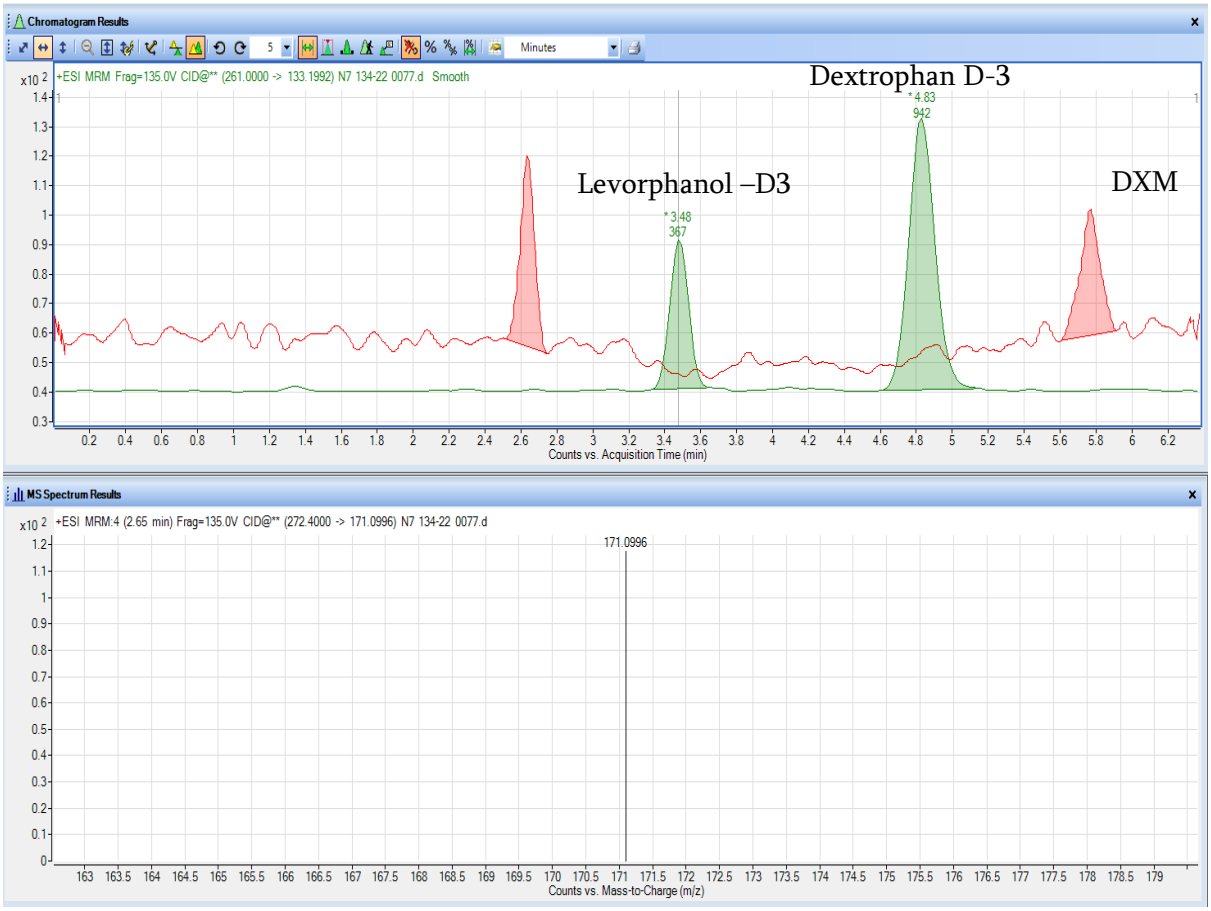
სურათი 41. ნიმუში 204-22



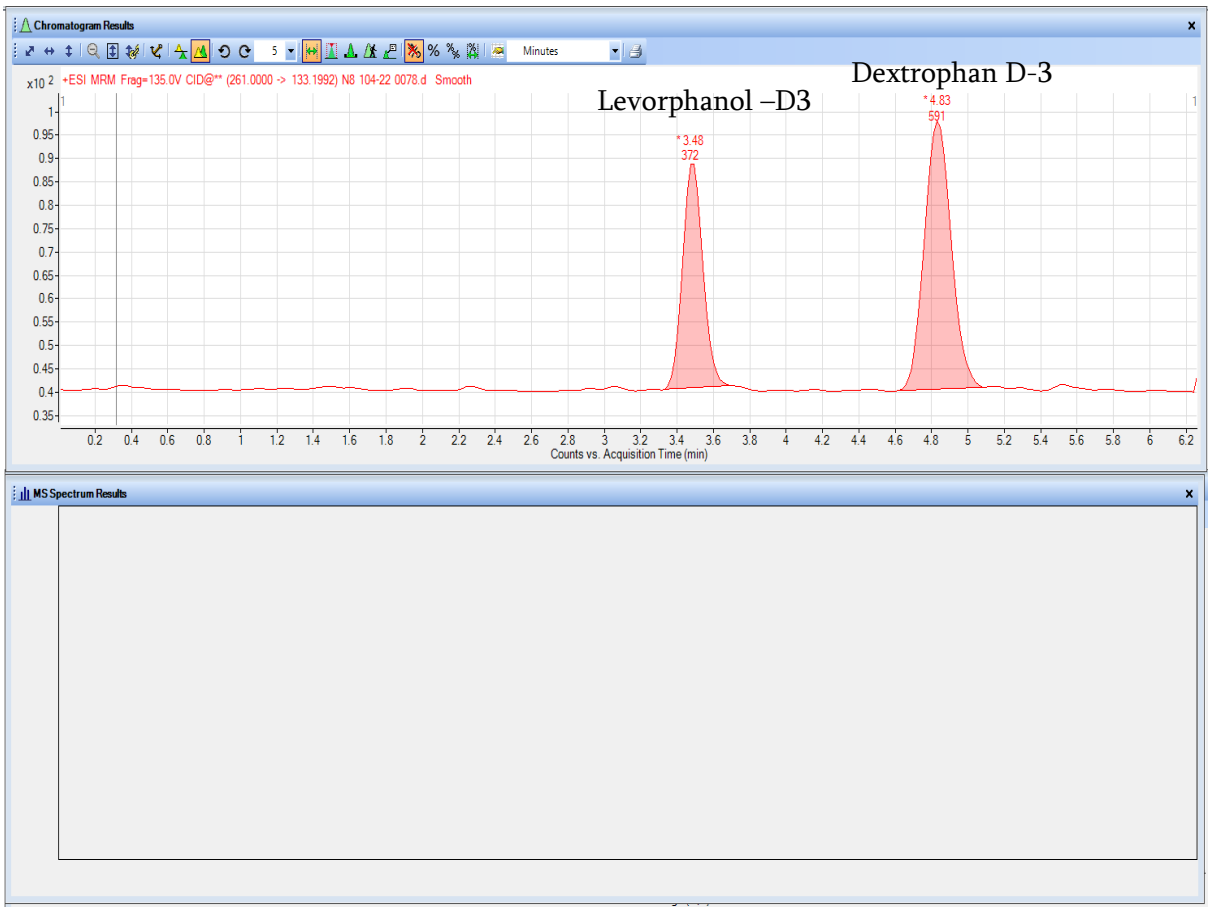
სურათი 42. ნიმუში 2879



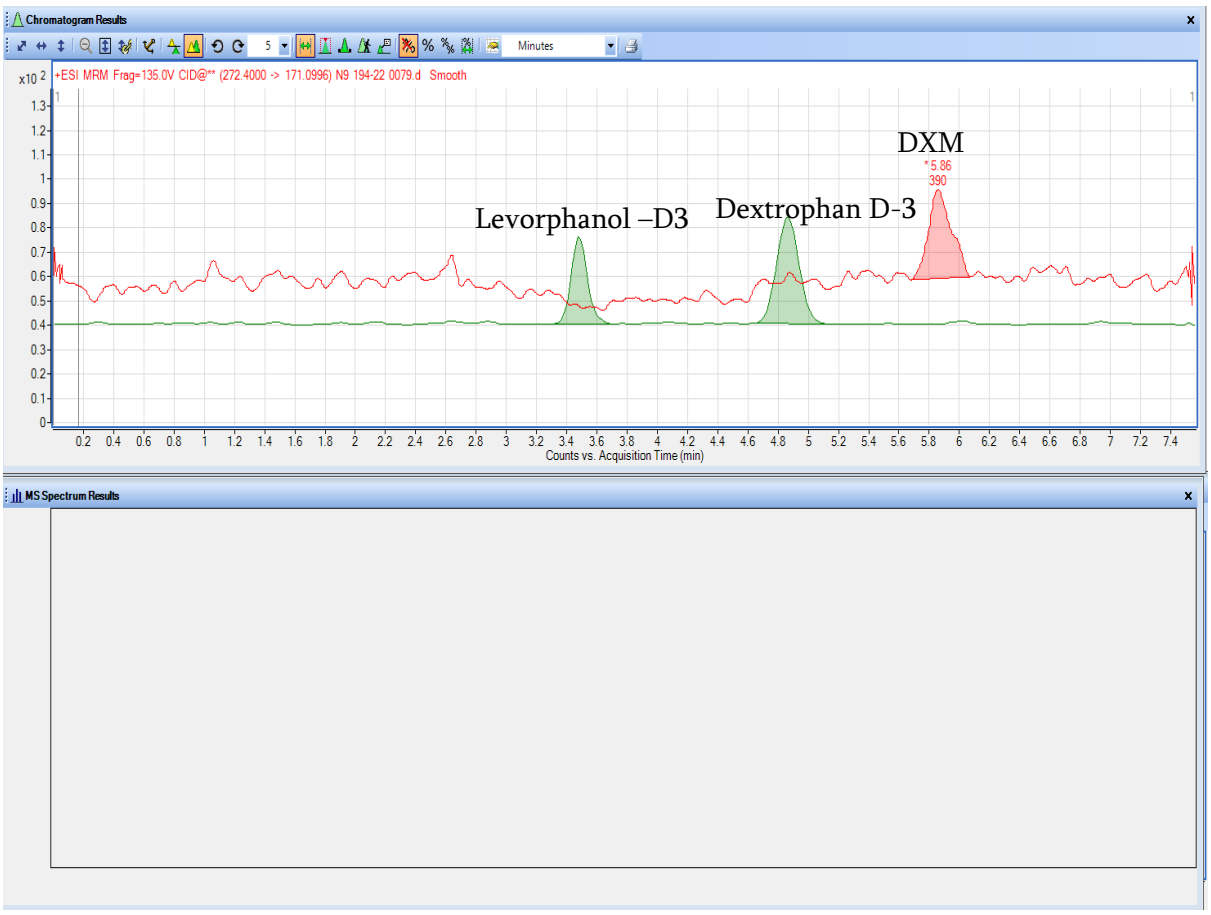
სურათი 43. ნიმუში 5822



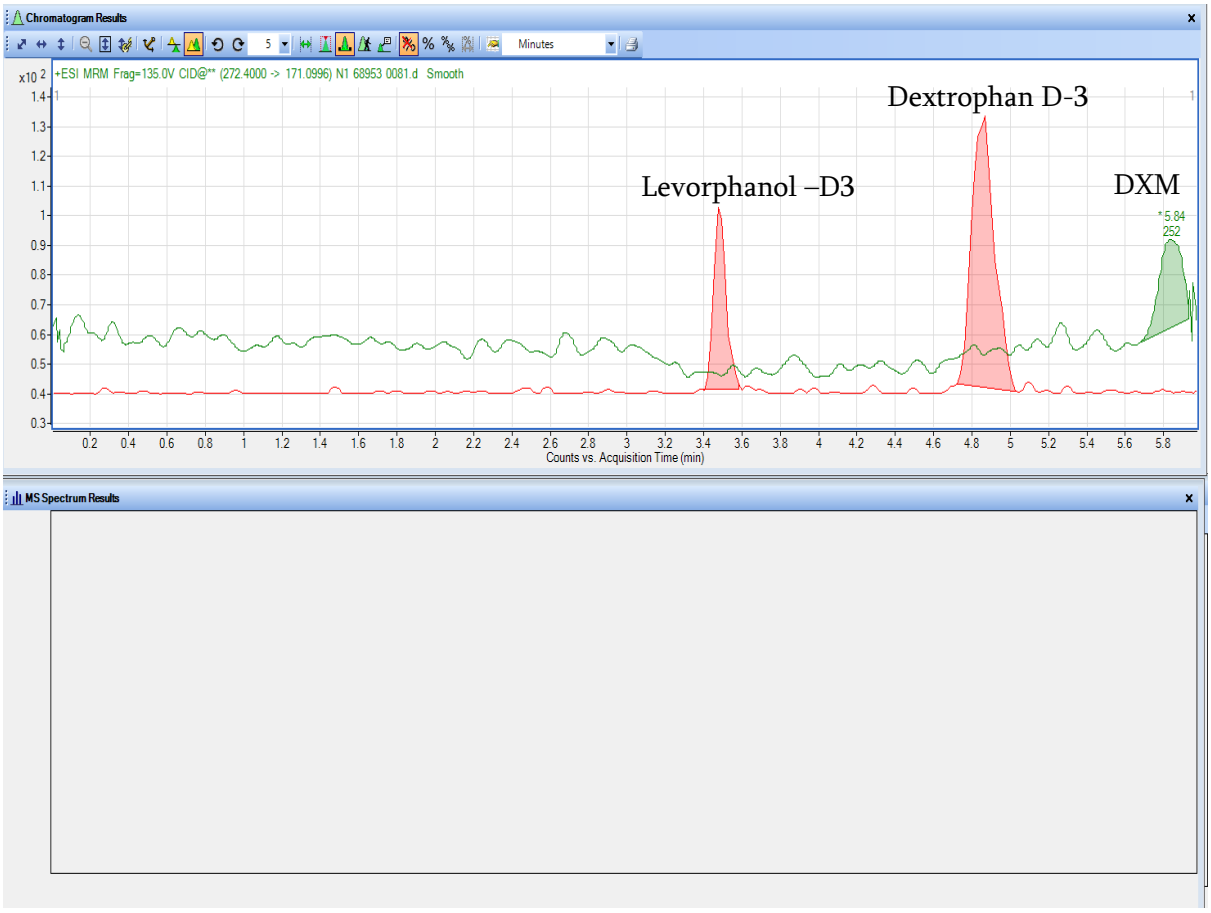
სურათი 44. ნიმუში 134-22



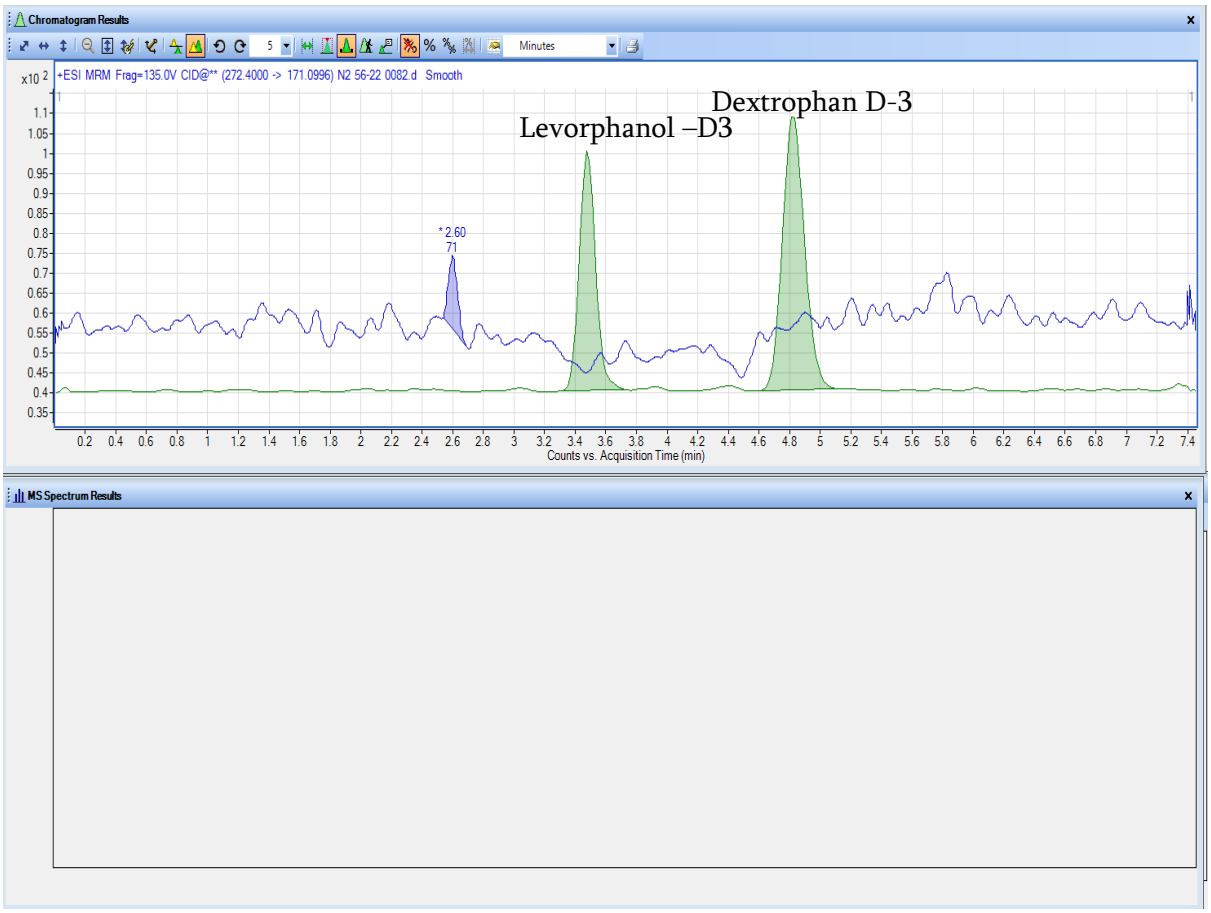
სურათი 45. ნიმუში 104-22



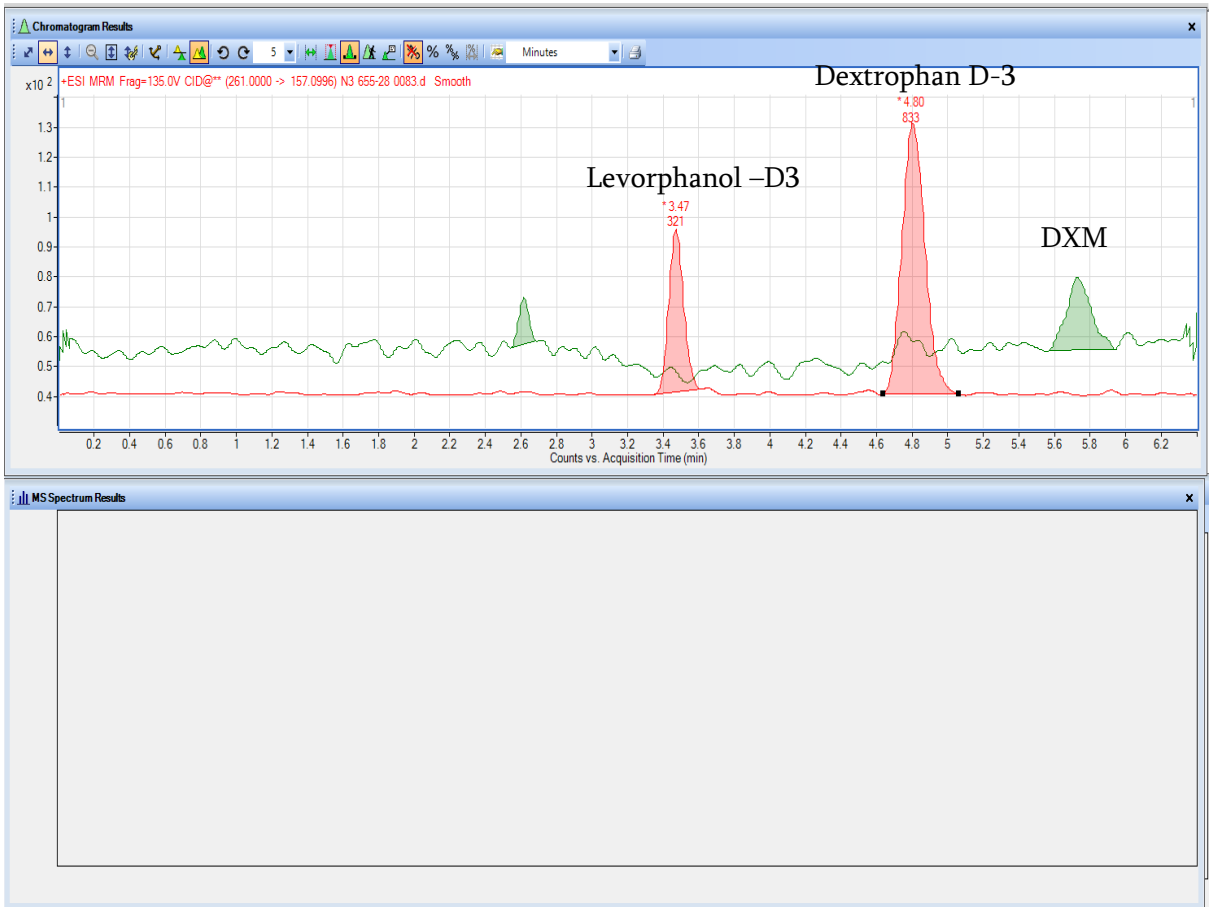
სურათი 46. ნიმუში 194-22



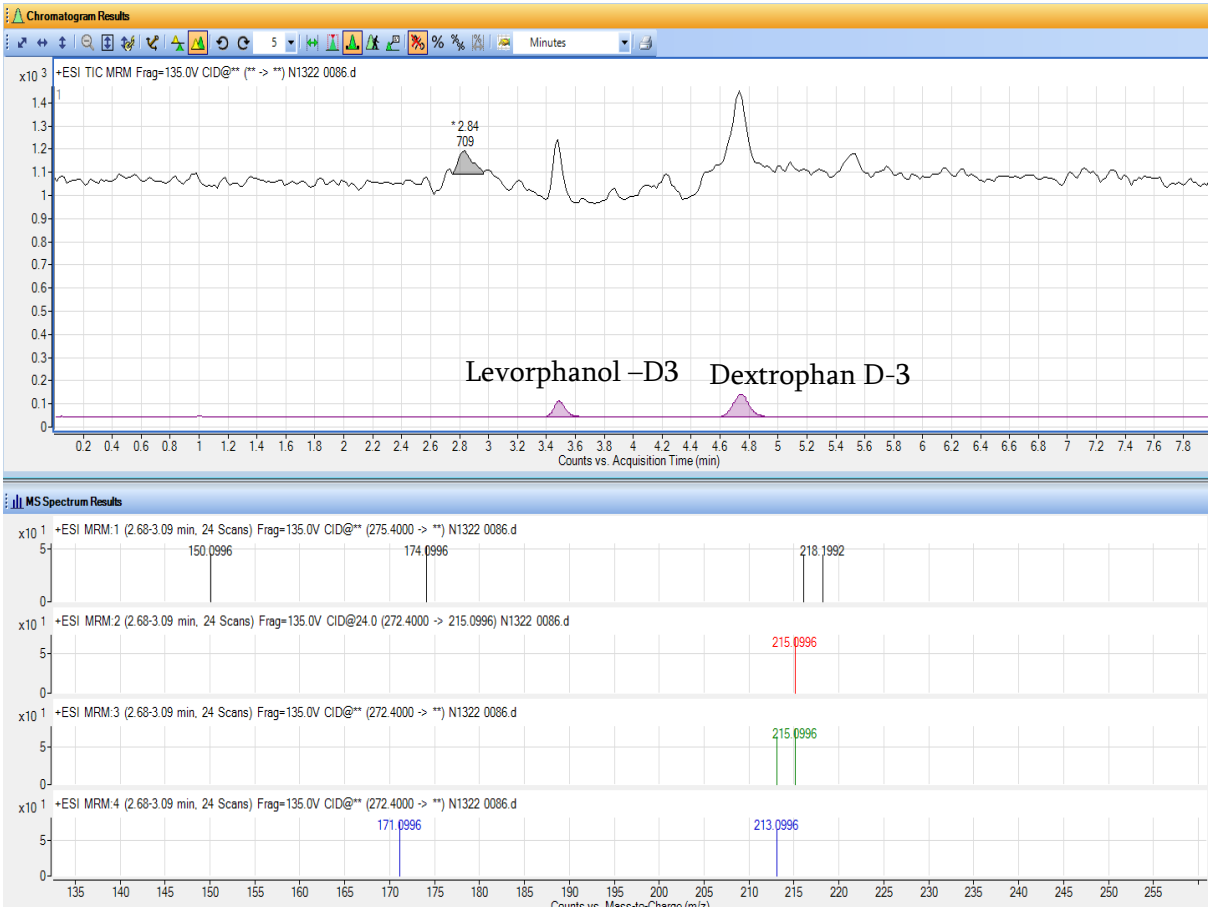
სურათი 47. ნიმუში 68953



სურათი 48. ნიმუში 56-22



სურათი 49. ნიმუში 655-28



სურათი 50. ნიმუში 13-22