ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

# მეთორფანის და მისი O-დემეთილ მეტაბოლიტის ენანტიოსელექტიური ანალიზის მეთოდის დამუშავება სითხური ქრომატოგრაფია ტანდემური მას სპექტრომეტრიის გამოყენებით

ნაშრომი შესრულებულია ქიმიის მაგისტრის (ქიმიის სპეციალობით)

აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

**ნინო გაბეხაძე**

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი, ქიმიის სასწავლო პროგრამა

ხელმძღვანელი:

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

თბილისი

2023

# სათაური

ანოტაცია ..... 3
Summery ..... 4
1.შესავალი ..... 5
2.ლიტერატურული მიმოხილვა ..... 7
2.1 ნარკოტიკების გამოყენება, ანალიზი და თანამედროვე გამოწვევები. ..... 7
2.2 სითხური ქრომატოგრაფია ..... 16
2.3 მას-სპექტრომეტრია ..... 22
2.4 ენანტიოსელექტიური სითხური ქრომატოგრაფია და ნარკოტიკების ენანტიოსელექტიური ანალიზი. მეთორფანი და მისი მეტაბოლიტები ..... 25
3. ექსპერიმენტული ნაწილი ..... 27
3.1 გამოყენებული აპარატურა ..... 27
3.2 გამოყენებული ნივთიერებები ..... 28
3.3 ნიმუშის მომზადება ..... 30
4.4 ნიმუშის ანალიზი და პირობები ..... 30
4.კვლევის შედეგები და მათი განხილვა ..... 31
5.დასკვნები ..... 40
6.გამოყენებული ლიტერატურა ..... 41

# ანოტაცია

ზემოაღნიშნული სამაგისტრო კვლევის მიზანი იყო მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია გაერთიანებული მას-სპეექტრომეტრიის გამოყენებით შეგვემუშავებინა მეთოდი, რომლის საშუალებითაც შევძლებდით მეთორფანისა და მისი O-დემეთილმეტაბოლიტის ენანტიომერების დაყოფას. ნიმუშის სახით მოვამზადეთ მეთორფანის და მისი O-დემეთილმეტაბოლიტის ენანტიომერების ნარევი. სამაგისტრო ნაშრომის განხორციელებისათვის საკვლევ აპარატად გამოვიყენეთ სითხური ქრომატოგრაფი & მას-სპექტრომეტრი Agilent Technologies 1290 Infinity & Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS. ექსპერიმენტისთვის გამოვიყენეთ 9 მოძრავი ფაზის ხსნარი, და 9 სტაციონარული ფაზა. ენანტიოსელექტიური დაყოფის მნიშვნელობა მდგომარეობს იმაში, რომ ზემოაღნიშნულ ნივთერებებს აქვთ განსხვავებული ფარმაკოლოგიური მოქმედება. საბოლოოდ, კვლევამ აჩვენა, რომ მეთორფანის, მისი ენანტიომერებისა და მეტაბოლიტების ენანტიოსელექტიური დაყოფისათვის საუკეთესო ვარიანტია Cellulose 3 სვეტი და MeOH + 0.1% $H_20$. მეთოდის უპირატესობას წარმოადგენს დაყოფის მიღება მცირე დროში.

# Summery

The goal of my master's research was to come up with a way to separate methorphan and its enantiomers using high-performance liquid chromatography combined with mass spectrometry. To do this, we prepared a mixture of enantiomers of methorphan and its O-demethyl-metabolite as a sample. For the research, we used an Agilent Technologies 1290 Infinity liquid chromatograph along with the Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS. To carry out the experiment, we tried out 9 different mobile phase solutions and 9 chiral columns. The reason why enantioselective separation is important is because these substances have different pharmacological effects. In the end, the study revealed that the Lux Cellulose 3 column and MeOH + 0.1% H20 were the best choice for separating methorphan, its enantiomers, and metabolites. The method is highly efficient and rapid.

# 1. შესავალი

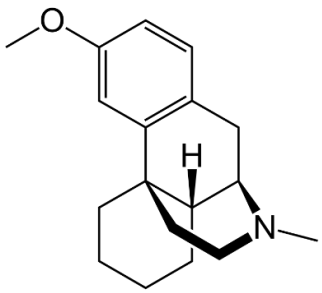
ყველა ეფექტურ პრეპარატს (ნივთიერებას) სარგებელთან ერთად აქვს რისკი, რომელიც დაკავშირებულია სასურველ და არასასურველ ეფექტებთან. ადამიანის კონკრეტული რეაქცია ნივთიერებაზე ამა თუ იმ გზით დამოკიდებულია პრეპარატის ან მისი მეტაბოლიტების კონცენტრაციაზე. ამჟამად გამოყენებული წამლების ნახევარზე მეტი არის ქირალური ნაერთები და მათი დაახლოებით 90% გაყიდვაშია როგორც რაცემატები, რომლებიც შედგება ორი ენანტიომერის ექვიმოლური ნარევისგან. მიუხედავად იმისა, რომ მათ აქვთ იგივე ქიმიური სტრუქტურა, ქირალური პრეპარატების ენანტიომერების უმეტესობა ხასიათდება მნიშვნელოვანი განსხვავებებით ბიოლოგიურ აქტივობებში: როგორიცაა ფარმაკოლოგია, ტოქსიკოლოგია, ფარმაკოკინეტიკა, მეტაბოლიზმი და ა.შ. {1} {2}.

ნარკოტიკული ნივთიერებების გვერდითი ეფექტების გასაკონტროლებლად შარდისა და სისხლის ნარკოლოგიური ტესტირება გახდა ჩვეულებრივი პრაქტიკა. დღესდღეობით ბევრი ლაბორატორია ახორციელებს შარდისა და სისხლის ნარკოლოგიური ტესტირებას დამსაქმებლებისთვის, სამთავრობო უწყებებისთვის და სხვა დაწესებულებებისთვის. ახლა უკვე აღიარებულია, რომ სავარაუდო დადებითი სკრინინგის შედეგები უნდა დადასტურდეს ანალიზური პროცედურებით, რომელიც დაფუძნებულია სხვადასხვა ქიმიურ მეთოდებზე. ამისთვის ფართოდ გამოიყენებოდა თხელფენიანი ქრომატოგრაფია; თუმცა, ის შედარებით დაბალმგრძნობიარეა გარკვეული მედიკამენტებისთვის და არ შეუძლია განსაზღვროს დაბალი კონცენტრაციები. აღსანიშნავია, რომ მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფია & მასპექტრომეტრიას შეუძლია დააკმაყოფილოს თანამედროვე მოთხოვნები {3}.

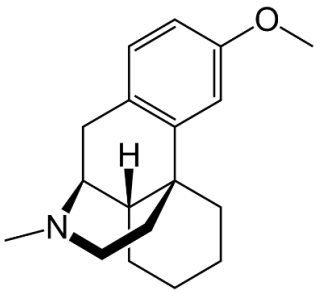
მეთორფანი (3-მეთოქსი-17-მეთილ-მორფინანი, $C_{18}H_{25}NO$) არის ქირალური ნაერთი და არსებობს ორი ენანტიომერის სახით:

1. დექსტრომეთორფანი- Dextromethorphan (DXM)

2. ლევომეთორფანი- Levomethorphan (LVM)



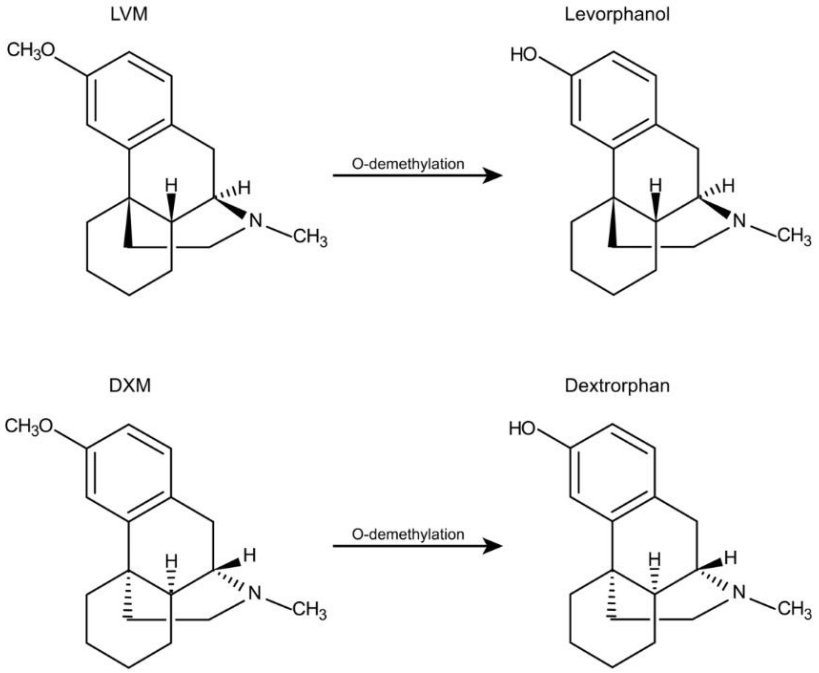

ნახ 1. LVM




ნახ 2. DXM

მეთორფანის ორი ენანტიომერის ფარმაკოლოგიური ეფექტი საკმაოდ განსხვავდება ერთმანეთისგან. DXM მცირე დოზით არის ხველების საწინააღმდეგო საშუალება, ხოლო მაღალი კონცენტრაციით ის ჰალუცინოგენს (ქიმიური აგენტი, რომელიც იწვევს ცვლილებებს აღქმაში, აზროვნებასა და აფექტურ სფეროში) წარმოადგენს. DXM არის ერთ-ერთი ყველაზე გავრცელებული ინგრედიენტი, რომელიც გვხვდება ურეცეპტოდ გაცემული გაციების სამკურნალო საშუალებებში. ლევომეთორფანი (LVM) მცირე კონცენტრაციითაც კი ძლიერი ნარკოტიკია. ასეთი განსხვავებული ფარმაკოლოგიური ეფექტის გამო, ბუნებრივია, ენანტიომერებს აქვთ განსხვავებული იურიდიული სტატუსი: - DXM არის ფარმაცევტული ნივთიერება, ხოლო LVM არის კონტროლირებადი ოპიოიდური ნარკოტიკი.

მეთორფანის ენანტიომერები ორგანიზმში მიმდინარე ქიმიური პროცესების შედეგად გარდაიქმნებიან მეტაბოლიტებად. ძირითად მეტაბოლიტებს (O- დემეთილ, N- დემეთილ და O,N-დიდემეთილი) შორის O-დემეთილირებული მეტაბოლიტი განიხილება, როგორც პირველ რიგში პასუხისმგებელი ნივთიერება ფარმაკოლოგიურ აქტივობაზე.




**ნახ 3.**მეთორფანის ენანტიომერების გარდაქმნა მეტაბოლიტებად O-დემეთილირებით

LVM-ის O-დემეთილირებულ მეტაბოლიტ ლევორფანოლს აქვს 5-ჯერ უფრო ძლიერი ოპიოიდური, თვისებები, ვიდრე მორფინს. აღნიშნული ფაქტორიდან გამომდინარე, სასამართლო ექსპერტიზის თვალსაზრისით, პრეპარატის დიფერენცირებისათვის მნიშვნელოვანია განხორციელდეს მეთორფანის ენანტიოსელექტიური ანალიზი{4}.

# 2.ლიტერატურული მიმოხილვა

## 2.1 ნარკოტიკების გამოყენება, ანალიზი და თანამედროვე გამოწვევები.

გაეროს ნარკოტიკებისა და დანაშაულის წინააღმდეგ ბრძოლის ბიურო (UNODC) ყოველწლიურად აქვეყნებს ანგარიშებს მსოფლიოში ნარკოვითარების შესახებ. ნარკოტიკული საშუალებების შესახებ კომისიამ 2020 წელს დაამტკიცა შესწორებული წლიური ანგარიშების კითხვარი (ARQ- Annual Reports Questionnaire), რომელიც ყოველ კალენდარულ წელს ეგზავნება გაეროს წევრ ქვეყნებს ნარკოტიკების მდგომარეობის შესახებ პასუხებისა და ინფორმაციის მისაღებად. შედეგად, ნარკომანიის მსოფლიო ანგარიში 2022 ეფუძნება მონაცემებს, რომლებიც ძირითადად მიღებულია ARQ-ებიდან, რომლებიც წარდგენილია მთავრობების მიერ UNODC-ში.

მიმდინარე ARQ-ში შეგროვებული მონაცემები, ჩვეულებრივ, ეხება 2020 წლის ნარკოტიკების მდგომარეობას. 2020 წლის კითხვარში 200 პოტენციური რესპონდენტიდან (193 წევრი სახელმწიფოს ჩათვლით), UNODC-მა მიიღო 90 სრული პასუხი და 21 ნაწილობრივი. ევროპას ჰქონდა საუკეთესო შედეგი (გამოკითხულთა 64 პროცენტმა გასცა სრული პასუხი, ხოლო 18-მა ნაწილობრივი), რასაც მოჰყვა აზია (58 პროცენტი და 14 პროცენტი) და ამერიკა (56 პროცენტი და 8 პროცენტი). აფრიკის შემთხვევაში, წევრი სახელმწიფოების მხოლოდ 19 პროცენტმა, ხოლო ოკეანიის რეგიონში, 16 ქვეყნიდან მხოლოდ ორმა უპასუხა წლიური ანგარიშის კითხვარს.

როგორც ჩანს, კანაფის ლეგალიზაციამ, სინთეზური ნარკოტიკების გაფართოებამ ახალ ბაზრებზე მსოფლიოს ზოგიერთ ნაწილში დააჩქარა მისი ყოველდღიური მოხმარება და ცუდი ზეგავლენა იქონია ჯანმრთელობაზე, ნათქვამია გაეროს ნარკოტიკებისა და დანაშაულის ოფისის (UNODC) მსოფლიო ნარკოტიკების 2022 წლის ანგარიშის მიხედვით. 2020 წელს მსოფლიოში 284 მილიონმა ადამიანმა 15-64 წლის ასაკში მოიხმარა ნარკოტიკები, რაც 26 პროცენტით გაიზარდა წინა ათწლეულთან შედარებით. ახალგაზრდები უფრო და უფრო მეტ ნარკოტიკებს მოიხმარენ. აფრიკასა და ლათინურ ამერიკაში 35 წლამდე ადამიანები წარმოადგენენ იმ ადამიანების უმრავლესობას, რომლებიც მკურნალობენ ნარკოტიკების მოხმარების დარღვევების გამო. მოხსენების შეფასებით, მსოფლიოში 11,2 მილიონი ადამიანი ინექციურ ნარკოტიკებს იღებდა. ამ რიცხვის დაახლოებით ნახევარი ცხოვრობდა C ჰეპატიტით, 1,4 მილიონი ცხოვრობდა აივ-ით და 1,2 მილიონი ცხოვრობდა ორივეთი. {5} {6}

მიუხედავად Covid-19 პანდემიისა, კოკაინის წარმოება 2020 წელს რეკორდულ მაჩვენებელზე იყო. 2019 წლიდან 11 პროცენტით გაიზარდა. 2021 წელს გლობალურად

ამოღებული კოკაინის თითქმის 90 პროცენტი კონტეინერებით ზღვით გადაჰქონდათ. მეტამფეტამინის ტრეფიკინგი განაგრძობს გეოგრაფიულად გაფართოებას, სადაც 117 ქვეყანა აფიქსირებს მეტამფეტამინის ამოღებას 2016-2020 წლებში. ამავდროულად, ამოღებული მეტამფეტამინის რაოდენობა ბოლო წლებში ხუთჯერ გაიზარდა. ოპიუმის წარმოება მსოფლიოში გაიზარდა 7%-ით 2020-დან 2021 წლამდე - ძირითადად ავღანეთში წარმოების ზრდის გამო.

დიდ პრობლემად რჩება სამედიცინო მოხმარებისთვის ფარმაცევტული ოპიოიდების ხელმისაწვდომობა. აღმოსავლეთ, სამხრეთ-აღმოსავლეთ ევროპასა და ცენტრალურ აზიაში ადამიანები ყველაზე ხშირად მკურნალობენ ოპიოიდების მოხმარებით გამოწვეული დარღვევების გამო. 2020 წელს ჩრდილოეთ ამერიკაში კონტროლირებადი ტკივილგამაყუჩებლები 1 მილიონ მოსახლეზე 7500-ით მეტი დოზა იყო, ვიდრე დასავლეთ და ცენტრალურ აფრიკაში.

შეერთებულ შტატებსა და კანადაში ჭარბი დოზით სიკვდილიანობის შემთხვევები, რომლებიც ძირითადად გამოწვეულია ფენტანილის არასამედიცინო გამოყენების ეპიდემიით, აგრძელებს რეკორდების მოხსნას. შეერთებულ შტატებში 2021 წელს ნარკოტიკების გადაჭარბებული დოზით 107 000-ზე მეტი ფატალური შედეგი დასტურდება, რაც 2020 წელს თითქმის 92 000-ს შეადგენდა. ჩრდილოეთ ამერიკაში მეტამფეტამინის ორ უმსხვილეს ბაზარზე ფასი გაიზარდა წინა წელთან შედარებით 7 %-ით, ხოლო სამხრეთ-აღმოსავლეთ აზიაში 30 %-ით, რაც ორივე რეგიონში რეკორდულია.

ცხრილი 1. **ნარკოტიკების მომხმარებელთა პროცენტული განაწილება სქესის მიხედვით.**

| | ქალი | კაცი |
|---|---|---|
| ოპიოიდები | 15% | 85% |
| კოკაინი | 27% | 73% |
| კანაფი | 30% | 70% |
| ფსიქოაქტიური ნივთიერებები | 30% | 70% |
| ექსტაზის ტიპის ნივთიერებები | 38% | 62% |
| ამფეტამინები | 45% | 55% |

ცხრილი 2. არასამედიცინო გამოყენების ფარმაცევტული პრეპარატების პროცენტული განაწილება სქესის მიხედვით.

| | ქალი | კაცი |
|---|---|---|
| არასამედიცინო გამოყენების ფარმაცევტული სტიმულატორები | 45% | 55% |
| არასამედიცინო გამოყენების ფარმაცევტული ოპიოიდები | 47% | 53% |
| არასამედიცინო გამოყენების სედატიური საშუალებები და დამამშვიდებლები | 49% | 51% |

ქალები რჩებიან ნარკოტიკების მომხმარებელთა უმცირესობაში გლობალურად, მაგრამ ტენდენცია აქვთ უფრო სწრაფად გაზარდონ ნარკოტიკების მოხმარების მაჩვენებელი. სამკურნალო მიზნებით ქალები იყენებენ ამფეტამინებსა და ფარმაცევტული სტიმულატორებს, ფარმაცევტულ ოპიოიდებს, სედატიურ საშუალებებს და ტრანკვილიზატორებს. მიუხედავად იმისა, რომ ქალები წარმოადგენენ ამფეტამინის ყოველ მეორე მომხმარებელს, მხოლოდ ყოველი მეხუთე მათგანი მკურნალობს ამფეტამინის მოხმარების გამო {5}

გაეროს ნარკოტიკებისა და დანაშაულის ოფისის (UNODC) მსოფლიო ნარკოტიკების 2022 წლის ანგარიშში ასევე ხაზგასმულია საერთაშორისო საზოგადოების, მთავრობების, სამოქალაქო საზოგადოების და ყველა დაინტერესებული მხარის დაინტერესების მნიშვნელობა, რათა მიიღონ სასწრაფო ზომები მოსახლეობის დასაცავად, მათ შორის ნარკოტიკების მოხმარების პრევენციისა და მკურნალობის გაძლიერებით და ნარკოტიკების უკანონო მიწოდების შემცირების გზით.

ნარკოტიკების ჭარბი დოზით გარდაცვალების მაღალი მაჩვენებელი მსოფლიოს არაერთ ქვეყანაშია. არცერთ სხვა ქვეყანას არ დაუფიქსირებია ისეთი მაღალი მაჩვენებლები, როგორც აშშ-ს. ზოგიერთ ქვეყანაში მაგალითად, ავსტრალიაში 1990-იანი წლების ბოლოს ნარკომანიის სიკვდილიანობის მაჩვენებელი შემაშფოთებელად გაიზარდა და შემდეგ დაეცა. ეს გამოწვეული იყო უკანონო ნივთიერებებით, როგორიცაა ჰეროინი (ინტენსიურად მოიხმარდნენ 1970-იან წლებში) და კოკაინი (იყენებდნენ 1980-იან წლებში).

2000 წლიდან მოყოლებული, სხვადასხვა ქვეყნები ადასტურებდნენ ჭარბი დოზით სიკვდილიანობის მაჩვენებლების გაზრდას. ბოლო წლებში გახშირდა ნარკოტიკული საშუალებების ერთდროულად, კომბინირებულად მიღება, რაც ძირითად შემთხვევაში ფატალურად სრულდება. ფაქტობრივად შეუძლებელი ხდება იმის დადგენა, რომელი ნარკოტიკი იყო უმთავრესად სიკვდილის მიზეზი. ფსიქოსტიმულატორებისა და ოპიოიდების "ერთდროულ გამოყენებას“ ჩვენს დროში ,,ტყუპების ეპიდემია“ ეწოდა.

ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის (WHO) სტატისტიკის მიხედვით ნარკოტიკების ჭარბი დოზით სიკვდილიანობის მაჩვენებელი ყველაზე მაღალია შემდეგ ქვეყნებში: აშშ, კანადა, ინგლისი, უელსი , ავსტრალია და შვედეთი {6}.

ცხრილი 3. ავსტრალიის 2018 წლის სიკვდილიანობის მონაცემები {6}.

| ქვეყანა | ნარკოტიკის ზედოზირებით გარდაცვლილთა რაოდენობა ყოველ 100000 ადამიანზე | ქვეყანა | ნარკოტიკის ზედოზირებით გარდაცვლილთა რაოდენობა ყოველ 100000 ადამიანზე |
|---|---|---|---|
| აშშ | 20.80 | დანია | 4.26 |
| კანადა | 5.65 | ესტონეთი | 7.12 |
| ავსტრალია | 4.97 | რუსეთი | 6.51 |
| დიდი ბრიტანეთი | 4.51 | ლიტვა | 4.50 |
| ფინეთი | 5.24 | ყაზახეთი | 4.36 |
| ნორვეგია | 5.17 | ირანი | 4.20 |
| შვედეთი | 4.03 | ლიბია | 8.52 |

როგორც ცხრილ 3-შია ნაჩვენები, ყველაზე მაღალი მაჩვენებელი აქვს აშშ-ს. ბოლო ათწლეულის განმავლობაში 2020 წელს დაფიქსირდა ყველაზე მაღალი რაოდენობა. ეს იყო 27.85 გარდაცვლილი ყოველ 100000 მოსახლეზე.

ცხრილი 4. აშშ-ში ნარკოტიკის ზედოზირების შედეგად გარდაცვლილი ადამიანების რაოდენობა 2008-2021 წლებში {7}.

| წელი | გარდაცვლილთა რაოდენობა | წელი | გარდაცვლილთა რაოდენობა |
|---|---|---|---|
| 2008 | 36450 | 2015 | 52404 |
| 2009 | 37004 | 2016 | 63632 |
| 2010 | 38329 | 2017 | 70237 |
| 2011 | 41340 | 2018 | 67367 |
| 2012 | 42502 | 2019 | 70630 |
| 2013 | 43982 | 2020 | 91799 |
| 2014 | 47055 | 2021 | 106699 |

2015 და 2019 წელს საქართველოში, დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრის (NCDC) მიერ, მოზარდთა ალკოჰოლის, თამბაქოსა და ფსიქოაქტიური ნივთიერების მოხმარების შესახებ ინფორმაციის შესაგროვებლად ჩატარდა კვლევა ESPAD-ის მეთოდოლოგიით (ESPAD-European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs). აღსანიშნავია, რომ კვლევა ჩატარდა მთელ საქართველოში გარდა აფხაზეთისა და სამხრეთ ოსეთის ოკუპირებული ტერიტორიებისა {9}.

ცხრილი 5. საქართველოში ESPAD-ის კვლევის შედეგები {8}.

| ნარკოტიკული ნივთიერებები | მომხმარებელი მოზარდების რაოდენობა (%) |
|---|---|
| კანაფი | 13.7 |
| სიგარეტი | 42.9 |
| ელექტრო სიგარეტი | 10.7 |
| ალკოჰოლი | 87.3 |
| ახალი ფსიქოაქტიური ნივთიერებები | 2.8 |
| ექსტაზი | 2.2 |
| ამფეტამინი | 1 |
| მეთამფეტამინი | 0.8 |
| კოკაიანი | 1.3 |
| ჰეროინი | 1 |

სხვადასხვა სამეცნიერო ტექნიკამ და მეთოდოლოგიამ გაამარტივა ბიოლოგიურ ნიმუშებში ნარკოტიკული ნივთიერებების იდენტიფიკაცია და რაოდენობრივი განსაზღვრა. ნარკოტიკული ნივთიერების ანალიზისთვის გამოყენებული სპეციფიური მეთოდები შეიძლება განსხვავდებოდეს წამლის ბუნებისა და კვლევის მიზნის მიხედვით. ქვემოთ

მოცემულია რამოდენიმე გავრცელებული მეთოდი, რომელიც გამოიყენება ბიოლოგიური ნიმუშების ანალიზებისთვის:

1.ქრომატოგრაფია- ფართოდ გამოიყენება ფარმაცევტულ ანალიზში. გაზური ქრომატოგრაფია (GC) და მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია (HPLC) მოსახერხებელია ნივთიერებების ნარევთა დაყოფისა და იდენტიფიკაციისთვის. მეთოდი დაფუძნებულია ნარევთა განაწილებაზე მოძრავ და უძრავ ფაზებს შორის {13}.

2. სპექტროსკოპია: წამლების ანალიზისთვის გამოიყენება სხვადასხვა სპექტროსკოპიული ტექნიკა, მათ შორის ინფრაწითელი სპექტროსკოპია (IR), ულტრაიისფერი ხილული სპექტროსკოპია (UV-Vis) და ბირთვული მაგნიტური რეზონანსული (NMR) სპექტროსკოპია. ეს ტექნიკა გვაწვდის ინფორმაციას წამლის ნაერთების ქიმიური ბმების, ფუნქციური ჯგუფებისა და მოლეკულური სტრუქტურების შესახებ.

3. მასის სპექტრომეტრია (MS)- ხშირად უერთდება ქრომატოგრაფიას წამლების გასაანალიზებლად. MS გვეხმარება წამლის ნარევის ცალკეული კომპონენტების იდენტიფიცირებასა და რაოდენობრივად განსაზღვრაში მათი მასისა და მუხტის თანაფარდობის მიხედვით. გვაწვდის მნიშვნელოვან ინფორმაციას არსებული ნივთიერებების მოლეკულური სტრუქტურისა და ფრაგმენტაციის ნიმუშების შესახებ.

4. მიკროსკოპია: მიკროსკოპული ანალიზი გამოიყენება წამლის ნიმუშების ვიზუალურად შესამოწმებლად. მას შეუძლია დაეხმაროს წამლების ფიზიკური მახასიათებლების იდენტიფიცირებას, როგორიცაა ტაბლეტების, ფხვნილების ან სხვა ფორმების ფორმა, ფერი, ზომა და ზედაპირის მახასიათებლები.

5. იმუნოანალიზები: იმუნოანალიზები ეფუძნება ანტისხეულების სპეციფიკურ შეკავშირებას წამლის ნაერთებთან. ისინი ჩვეულებრივ გამოიყენება ნარკოტიკების სკრინინგისა და წინასწარი ანალიზისთვის, განსაკუთრებით სასამართლო და ტოქსიკოლოგიურ სფეროში. იმუნოანალიზს შეუძლია უზრუნველყოს სწრაფი და მგრძნობიარე შედეგები, მაგრამ შეიძლება არ იყოს სპეციფიური.

6. ელემენტური ანალიზი: ზოგიერთი პრეპარატი შეიძლება შეიცავდეს მინარევებს ან მარკერებს, რომლებიც შეიძლება გამოვლინდეს ისეთი ტექნიკის გამოყენებით, როგორიცაა ატომურ-აბსორბციული სპექტროსკოპია (AAS) ან ინდუქციურად შეუღლებულიი პლაზმური მასის სპექტრომეტრია (ICP-MS). ეს მეთოდები გამოიყენება კონკრეტული ელემენტების არსებობისა და კონცენტრაციის დასადგენად.

7. დნმ-ის ანალიზი: ბიოლოგიურ მასალებში არალეგალური ნარკოტიკების იდენტიფიკაციისა და ანალიზისთვის იყენებენ PCR-პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის მეთოდს. მეთოდი ადგენს კონკრეტული გენეტიკური მარკერების არსებობას {10} {11}.

ანალიზისთვის მოწმდება შარდის, სისხლის, ნერწყვის, ოფლის ან თმის ნიმუში. შარდის ტესტირება ყველაზე გავრცელებულია, რადგან ის არის არაინვაზიური, სწრაფი და შეუძლია მრავალი ნარკოტიკული ნივთიერების აღმოჩენა. სისხლის ტესტი იშვიათად კეთდება, რადგან ის ინვაზიურია და ნარკოტიკის გამოვლენა შესაძლებელია მხოლოდ გამოყენებიდან რამდენიმე საათში. თმის ნიმუშის ანალიზი არ არის ფართოდ გავრცელებული, მაგრამ შეუძლია აღმოაჩინოს ზოგიერთი ისეთი ნარკოტიკი, რომელიც გამოყენებული იყო 100 დღის წინ. ჯანდაცვის პრაქტიკოსებს შეუძლიათ უშუალოდ დააკვირდნენ ნიმუშის შეგროვებას და დალუქონ იგი ისე, რომ დარწმუნდნენ, რომ ნიმუში არ არის გაყალბებული.

ნარკოლოგიური ტესტები ყოველთვის ზუსტი არ არის. ე.წ შარდის ტესტები იძლევა არასრულ და ზოგჯერ არასწორ შედეგებს. ხშირად, ტესტები არ ავლენს წამალს, რომელსაც ადამიანი რეალურად იყენებს (ცრუ უარყოფითი შედეგი). ეს ხდება მაშინ, როცა მეთოდს აქვს შეზღუდული მგრძნობელობა კონკრეტული წამლის ან მისი კომპონენტის გამოსავლენად. ცრუ უარყოფით შედეგს იძლევა ძალიან განზავებული შარდი. ნარკოტიკული ნივთიერების ძალიან მცირე კონცენტრაციის გამო ტესტი ვერ აღმოაჩენს {12} {13}.

ცხრილი 6. შარდის ნიმუშში ნარკოტიკული ნივთიერებების გამოვლენის დროები {13}.

| ნარკოტიკული ნივთიერება | გამოვლენის დრო | ნარკოტიკული ნივთიერება | გამოვლენის დრო |
|---|---|---|---|
| ალკოჰოლი | 7-12 სთ | კოკაიანის მეტაბოლიტები | 2-4 დღე |
| ამფეტამინი/მეტამფეტამინი | 48 სთ | მარიხუანა (ერთჯერადი გამოყენებისას) | 3 დღე |
| ფენობარბიტალი | 3 კვირა | მორფინი | 48-72 სთ |
| ბენზოდიაზეპინი (დიაზეპამი) | 30 დღე | ფენციკლიდინი | 8 დღე |
| მეტადონი | 3 დღე | ჰეროინი | 48 სთ |

მეორეს მხრივ, ტესტები ზოგჯერ დადებითია, როდესაც ადამიანი რეალურად არ იყენებს ნარკოტიკებს (ცრუ დადებითი შედეგი). მაგალითად, ყაყაჩოს თესლმა შეიძლება გამოიწვიოს ცრუ დადებითი შედეგები (ჰეროინი მიიღება ყაყაჩოს მცენარეებიდან){12} {13}.

ცხრილი 7. იმუნოანალიზისას პოზიტიური შედეგების გამომწვევი ნივთიერებები.

| იმუნოანალიზით შემოწმებული ნარკოტიკული ნივთიერება | ცრუ დადებითი შედეგის გამომწვევი აგენტები | იმუნოანალიზით შემოწმებული ნარკოტიკული ნივთიერება | ცრუ დადებითი შედეგის გამომწვევი აგენტები |
|---|---|---|---|
| ალკოჰოლი | მოკლე ჯაჭვიანი სპირტები (მაგ. იზოპროპილის სპირტი) | კოკაინი | კოკას ფოთლის ჩაი, კოკაინის შემცველი ადგილობრივი ანესთეტიკები |
| ამფეტამინი | დექსტროამფეტამინი, ეფედრინი, ფენტერმინი, ფენილეფრინი, MDMA, მეტამფეტამინი | ოპიოიდები ჰეროინი | დექსტრომეთორფანი, დიფენჰიდრამინი, ჰეროინი, კოდეინი, მორფინი, ყაყაჩოს თესლი, ქინინი |
| ბენზოდიაზეპინები | ოქსაპროზინი, სერტრალინი | ფენციკლიდინი | დექსტრომეთორფანი, იბუპროფენი, კეტამინი |
| კანაბინოიდები | კანაფის შემცველი საკვები, არასტეროიდული ანთების საწინააღმდეგო საშუალებები, პროტონული ტუმბოს ინჰიბიტორები | ტრიციკლური ანტიდეპრესანტები | კარბამაზეპინი, ციკლობენზაპრინი, ციპროჰეპტადინი, დიფენჰიდრამინი, ჰიდროქსიზინი, კვეტიაპინი |

ნარკოტიკული ნივთიერებების ანალიზს, ისევე როგორც ნებისმიერ ანალიტიკურ პროცესს, შეიძლება შეექმნას სხვადასხვა გამოწვევები და პრობლემები. ქვემოთ ჩამოთვლილია ის ფუნდამენტური პრობლემები,რომელთა გადაჭრის გარეშე შეუძლებელია კვლევის შესრულება.

1. ნიმუშის დაბინძურება: პრეპარატის ნიმუშში დამაბინძურებლების არსებობამ შეიძლება ხელი შეუშალოს ანალიზს და გამოიწვიოს არაზუსტი შედეგები. დაბინძურება შეიძლება მოხდეს ნიმუშის შეგროვების, შენახვის, დამუშავების ან ტრანსპორტირების დროს.

2. მატრიცის გავლენა: მატრიცა შეიძლება შეიცავდეს ისეთ ნივთიერებებს, რომლებმაც შეიძლება გავლენა მოახდინოს ნიმუშში ნაერთების დაყოფაზე, იდენტიფიკაციაზე ან რაოდენობრივ განსაზღვრაზე, რაც იწვევს შეცდომებს ან ცრუ შედეგებს.

3. მგრძნობელობა: ზოგიერთი პრეპარატი შეიძლება იყოს ძალიან დაბალი კონცენტრაციით, რაც მოითხოვს მაღალმგრძნობიარე ტექნიკას მათი ზუსტი გამოვლენისა და რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის. თუ გამოყენებული ანალიზური მეთოდი არ არის საკმარისად მგრძნობიარე, მან შეიძლება ვერ აღმოაჩინოს დაბალი კონცენტრაციის ნაერთები ან მოგვცეს არაზუსტი შედეგები.

4. მეთოდის ვალიდაცია: ნარკოტიკული ნიმუშის ანალიზში გამოყენებული ანალიზური მეთოდები საჭიროებს დამოწმებას მათი სანდოობის, სიზუსტისა და სპეციფიურობის უზრუნველსაყოფად{15}.

5. საანალიზო ნივთიერების სტაბილურობა: ზოგიერთი პრეპარატი შეიძლება იყოს არასტაბილური ანუ გარდაიქმნას დროთა განმავლობაში რაიმე კონკრეტულ პირობებში. ამ არასტაბილურობამ შეიძლება გავლენა მოახდინოს ანალიზის სიზუსტეზე.

6. სტანდარტები: ანალიზისათვის საჭიროა სტანდარტების გამოყენება, რომლებიც არის სუფთა ნაერთები ცნობილი იდენტობითა და კონცენტრაციით. მაღალი ხარისხის სტანდარტების მიღება შეიძლება იყოს რთული, განსაკუთრებით ახლად გაჩენილი ან უკანონო ნარკოტიკებისთვის.

7. მეთოდის შემუშავება და სტანდარტიზაცია: სხვადასხვა პრეპარატების ანალიზისთვის შესაფერისი ანალიზური მეთოდების შემუშავება შეიძლება იყოს რთული ამოცანა. ის მოითხოვს პრეპარატის სპეციფიკური მახასიათებლების ცოდნას, შესაბამისი ტექნიკის შერჩევას და მეთოდის პარამეტრების ოპტიმიზაციას.

ეს არის ზოგადი პრობლემები, რომლებიც შეიძლება წარმოიშვას ნარკოტიკული ნივთიერების ანალიზისას. ამ გამოწვევების დასაძლევად საჭიროა ექსპერტიზა, ხარისხის კონტროლის ზომები, სათანადო ვალიდაცია და ანალიტიკური ტექნიკა{14}.

## 2.2 სითხური ქრომატოგრაფია

მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია (მესქ) არის ფართოდ გამოყენებული ანალიზური ტექნიკა ქიმიასა და ბიოქიმიაში ნარევის კომპონენტების გამოყოფის, იდენტიფიკაციისა და რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის. ეს არის ქრომატოგრაფიის სახესხვაობა, რომელიც იყენებს თხევად მოძრავ ფაზას სვეტში ნიმუშის გასატარებლად. ამ მეთოდის უპირატესობაა: მაღალი გარჩევითობა, მგრძნობელობა და ფართო სპექტრის დამუშავების უნარი. ის შეიძლება გამოვიყენოთ თერმოლაბილური და არააქროლადი ნივთიერებების განსაზღვრისათვის. მეთოდში არსებობს ძალიან ბევრი სტაციონარული ფაზა და დაყოფის სელექტივობა შეიძლება ვმართოთ მოძრავი ფაზის შედგენილობის მიხედვით. მეთოდი გამოსადეგია არა მხოლოდ ანალიზური, არამედ ნახევრადპრეპარატული, პრეპარატული და საწარმოო მასშტაბის დაყოფებისათვის. ნაკლოვანებაა შედარებით დაბალი თეორიული თეფშების რიცხვი {18} {20}.

მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის აპარატურა შედგება რამდენიმე ძირითადი ბლოკისაგან, ასევე შესაძლებელია დამატებითი აპარატურული ბლოკების გამოყენება ფუნქციონალობისა და წარმადობის გასაზრდელად. ძირითადი ბლოკებია: ტუმბო, ინჯექტორი, სვეტი, დეტექტორი და მონაცემების ჩამწერი მოწყობილობა.

1. ინჯექტორები- არსებობს ნიმუშის მარყუჟის მქონე ხელის ინჟექტორები და ავტომატური ინჟექტორები. თანამედროვე ავტომატურ ინჟექტორების უპირატესობაა ნიმუშის შეყვანა მაღალი სიზუსტით და მცირე ჯვარედინი დაბინძურება. ასევე მას აქვს ნიმუშების ავტომატური მიმწოდებელი და აპარატი იტევს 100-ზე მეტ ნიმუშს. ერთადერთი უპირატესობა ხელის ინჟექტორისა არის მისი სიიაფე.

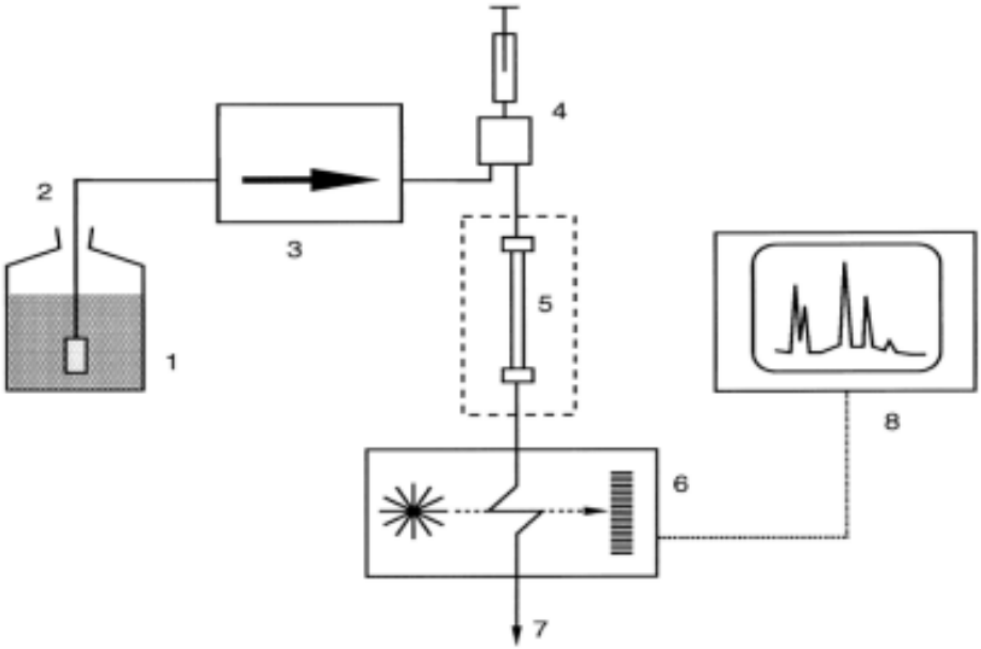
2. ტუმბო- მეთოდში გამოყენებული ტუმბოების 2 სახე არსებოსბს: გრადიენტული და იზოკრატული. იზოკრატული ტუმბოები გამოსადეგია ისეთ შემთხვევაში, სადაც არაა საჭირო მოძრავი ფაზის შემადგენლობის გრადიენტული ცვლილება. გრადიენტული ტუმბო იდეალურია ისეთ შემთხვევაში, სადაც ქრომატოგრაფიულ ექსპერიმენტში საჭიროა ორგანული და არაორგანული ფაზის შემადგენლობის ცვლილება მრავალკომპონენტიანი ნარევის ანალიზისთვის.

3. სვეტები- აქ ხდება ნივთიერებათა ნარევის ცალკეულ კომპონენტებად დაყოფა. არსებობს სხვადასხვა ზომის უჟანგავი მეტალის სვეტები, რომელიც არის შევსებული ანალიზისთვის საჭირო სტაციონარული ფაზით. მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის განვითარებასთან ერთად შეიქმნა ისეთი ზომის სვეტები, რომლებიც ხასიათდება ძალიან მცირე ზომით. სვეტი შევსებულია 1,5-5 მკმ დიამეტრის სფერული

ნაწილაკებით. ნაწილაკებს ძირითადად წარმოადგენს ფოროვანი სილიკაგელი. მილის შიგა დიამეტრი 4,6 მმ-ია, ხოლო სიგრძე 250 მმ, გარდა ამისა, შესაძლებელია კაპილარული სვეტების გამოყენებაც. არსებობს სვეტების თერმოსტატი, რომელშიც თავსდება ერთი, ორი, ან მეტი სვეტი და ხდება მათი ტემპერატურული კონტროლი (ასევე აქვს ავტომატური გადართვის ფუნქციაც). ბოლო წლებში ჩატარებული კვლევები ცხადყოფს, რომ ტემპერატურა გავლენას ახდენს ენანტიომერების დაყოფაზე {18}.

4. დეტექტორები - მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიაში ყველაზე ფართო გამოყენება აქვს ულტრაიისფერ ხილულ დეტექტორებს, რომლებიც აფიქსირებენ ნივთიერების მიერ სინათლის შთანთქმას (აბსორბციას). არსებობს სპეციფიურ-სელექტიური დეტექტორები, რომელთაც გააჩნიათ ძალიან მაღალი მგრძნობელობა ნივთიერებათა გარკვეული ჯგუფის მიმართ. ასე მაგალითად, ფლუორესცენციის უნარის მქონე ნივთიერებების დეტექტირებისთვის იყენებენ ფლუორესცენტულ დეტექტორებს, ნახშირწყლების ანალიზისთვის იყენებენ გარდატეხის მაჩვენებლის დეტექტორებს. უნივერსალურობით და მაღალი მგრძნობელობით გამოირჩევა მას სპექტრომეტრული დეტექტორი. ამ უკანსკნელთან დაკავშირებით ვრცლად მოგვიანებით ვისაუბრებთ.

5. მონაცემების ჩამწერი მოწყობილობა - თანამედროვე აპარატურის მართვა და მონაცემების ჩაწერა ხდება სპეციალური კომპიუტერული პროგრამის საშუალებით. ყველა ქრომატოგრაფიული აპარატურის მწარმოებელ კომპანიას აქვს შექმნილი საკუთარი პროგრამული უზრუნველყოფა. მაგალითად: Agilent Technologies - კომპანიას თავისი აპარატურისთვის აქვს პროგრამული კომპლექტი Agilent OpenLab, რომელიც მოიცავს ქრომატოგრაფიის შემდეგ მოდულებს (Agilent OpenLab CDS), მასის სპექტრომეტრის (Agilent OpenLab MS), მონაცემთა მართვის (Agilent OpenLab ECM) {17}.




ნახ 4. მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის (მესქ ) სქემა.

1-გამხსნელის რეზერვუარი, 2-გამხსნელის გამანაწილებელი, 3- ტუმბო, 4- ინჟექტორი, 5-თერმოსტატირებული სვეტი, 6- დეტექტორი, 7- ნარჩენები, 8- მონაცემთა დამუსავების პროგრამა.

მესქ-ში  განასხვავებენ პირდაპირ ფაზიან (ნორმალურ ფაზიანი) და შებრუნებულ ფაზიან ქრომატოგრაფიას. სტაციონარული ფაზა პირდაპირ ფაზიან  ქრომატოგრაფიაში პოლარულია, ხოლო მოძრავი ფაზა მცირედ პოლარული ან არაპოლარული. საპირისპიროდაა შებრუნებულ ფაზიან ქრომატოგრაფიაში. სტაციონარული ფაზა არის არაპოლარული, მოძრავი ფაზა პოლარული (წყლისა და ორგანული გამხსნელის ნარევი). წყალი ძლიერი მაელუირებელი კომპონენტია ქრომატოგრაფიაში. ის ურთიერთქმედებს სილიკაგელთან ან ალუმინის ოქსიდის აქტიურ ცენტრებთან, რის გამოც ნიმუშის მოლეკულები ვეღარ ადსორბირდებიან და სწრაფად ელუირდება. შებრუნებულ ფაზიან ქორმატოგრაფიაში წყალი ვერ ასველებს არაპოლარულ ალკილურ ჯგუფებს, ვერ ურთიერთქმედებს მათთან და, შესაბამისად, ყველაზე სუსტი მოძრავი ფაზაა. შედეგად, ნიმუშის ელუირების სიჩქარე დაბალია. ნიმუშის შეკავების დრო მით უფრო ხანგრძლივია, რაც მეტია წყლის შემცველობა ელუენტში {24}.

ორგანზომილებიან ჩანაწერს, რომლის ერთ ღერძზე გადაზომილია სააანალიზო ნივთიერების შეკავშირების დრო (tR), ხოლო მეორეზე სიგნალის ინტენსივობა ქრომატოგრამა ეწოდება.

ქრომატოგრამას აქვს თავისი პარამეტრები:

**შეკავების დრო-** $t_R$ არის დროის ინტერვალი ნიმუშის ქრომატოგრაფიულ სვეტში შეყვანიდან ქრომატოგრამაზე პიკის მაქსიმუმის მიღებამდე. ანალიზის მოცემულ პირობებში დამოკიდებულია მის თერმოდინამიკურ მახასიათებელზე - განაწილების კოეფიციენტზე (Kd) მოძრავ და უძრავ ფაზებს შორის ანუ შეკავების დრო წარმოადგენს ნივთიერების თვისებრივ მახასიათებელს და შესაძლებელია გამოვიყენოთ მის გამოსაცნობად, ხოლო სიგნალის ინტენსივობა დამოკიდებულია ნიმუშში არსებული მოცემული კომპონენტის რაოდენობაზე და შეიძლება გამოვიყენოთ მისი რაოდენობითი ანალიზისთვის {24} {23}.

$$t_R = t_0 + t_{R/} \quad [1]$$

$t_0$ არის არაადსორბირებადი კომპონენტის ელუირების დრო $t_{R/}$ არის სტაციონალურ ფაზაზე ყოფნის დრო მოცემული კომპონენტისთვის.

**შეკავების მოცულობა** -$V_R$ მოძრავი ფაზის მოცულობაა, რომელიც საჭიროა ნიმუშის სვეტიდან ელუირებისთვის.იგი გამოითვლება ფორმულით, სადაც F - მოძრავი ფაზის მოცულობითი სიჩქარეა {23} {24}.

$$V_R = Ft_R \quad [2]$$

**მკვდარი მოცულობა** - $V_0$ არასორბირებადი კომპონენტის შეკავების მოცულობა, სვეტში მოძრავი ფაზის მოცულობა მისი სვეტში შეყვანიდან დეტექტირებამდე {25}.

$$V_0 = t_0 F \quad [3]$$

$V_0$ - არის არაადსორბირებადი კომპონენტის ელუენტური მოცულობა.

**K შეკავების ფაქტორი -** ეს არის შეკავების ძირითადი პარამეტრი, რომელიც არაა დამოკიდებული სვეტის სიგრძესა და მოძრავი ფაზის სიჩქარეზე. შეკავების ფაქტორი ასევე გამოსახავს ნივთიერების მოლური კონცენტრაციების ფარდობას მოძრავ და სტაციონალურ ფაზაში {23}.

$$K = t_R - t_0 / t_0 \quad [4]$$

$$K = n_{სტაც} / n_{მოძრ} \quad [5]$$

დაყოფის ფაქტორი, სელექტივობა - ნარევის შემადგენელი კომპონენტების დაყოფის სისრულეს რიცხობრივად გამოსახავს დაყოფის ფაქტორი, ანუ ფარდობითი შეკავება. თუ კომპონენტს K-ს ერთნაირი მნიშვნელობა აქვს ვერ დაიყოფა α=1 ➔ $K_2=K_1$

$$a = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2}-t_0}{t_{R1}-t_0} \qquad [6]$$

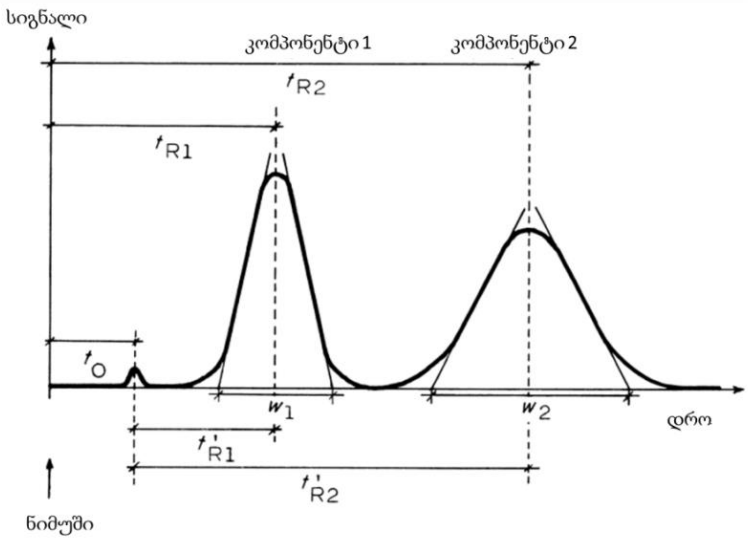
**თეორიული თეფშების რიცხვი** - რაოდენობრივად ახასიათებს ქრომატოგრაფიული სვეტის ეფექტურობას. ქრომატოგრაფიული სვეტის მათემატიკურ ეკვივალენტს წარმოადგენს სვეტი თეფშებით, რომელთაგან თითოეულზე ხდება კომპონენტის წონასწორული განაწილება თეფშსა და მოძრავ ფაზას შორის.

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \qquad [7]$$

$$N = 5.54\left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad [8]$$

**გარჩევითობა $R_s$** - ნარევის შემადგენელი კომპონენტების დაყოფის სისრულეს გამოხატავს, განისაზღვრება მეზობელი პიკების დაშორების ფარდობით პიკების სიგანეების ჯამთან {23}.

$$R = 2\frac{t_{R2}-t_{R1}}{W_1-W_2} = 1.18\frac{t_{R2}-t_{R1}}{W_{(1/2)1}-W_{(1/2)2}} \qquad [9]$$




ნახ. 5 ქრომატოგრამის ზოგადი სქემა და პარამეტრები {23}.

HPLC - მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია ფართოდ გამოიყენება სხვადასხვა სამეცნიერო დარგში:

**ფარმაცევტული ანალიზი:** HPLC ფართოდ გამოიყენება ფარმაცევტულ კვლევასა და ხარისხის კონტროლში წამლის ნაერთების გასაანალიზებლად, სისუფთავის შესაფასებლად, წამლის დაშლის სიჩქარის დასადგენად, მინარევების აღმოსაჩენად და სტაბილურობის მონიტორინგისთვის. ის გადამწყვეტ როლს თამაშობს წამლის შემუშავების, ფორმულირებისა და წარმოების პროცესებში {26}.

**გარემოს ანალიზი:** HPLC გამოიყენება გარემოს ისეთი ნიმუშების გასაანალიზებლად, როგორიცაა წყალი, ნიადაგი და ჰაერი. ხდება ბიოლოგიური დამაბინძურებლების: პესტიციდების, ტოქსინების იდენტიფიკაცია{31}.

**სურსათისა და სასმელის ანალიზი:** გამოიყენება საკვებისა და სასმელის ნიმუშების გასაანალიზებლად დანამატების, პესტიციდების, ტოქსინების, ვიტამინების, არომატების და სხვა ნაერთების იდენტიფიკაციისთვის. ეს ხელს უწყობს საკვების ხარისხის, უსაფრთხოებისა და რეგულაციების შესაბამისობის უზრუნველყოფას.

**კლინიკური დიაგნოსტიკა:** კლინიკურ ლაბორატორიებში ბიოლოგიური ნიმუშების გასაანალიზებლად, როგორიცაა სისხლი, შარდი და ქსოვილები წამლების, მეტაბოლიტების, ჰორმონების, ვიტამინების და სხვა ბიომარკერების კონცენტრაციის გასაზომად. ის ხელს უწყობს დაავადების დიაგნოზს, წამლების თერაპიულ მონიტორინგს და ფარმაკოკინეტიკური კვლევებს {27} {28}.

**სასამართლო მეცნიერება:** მეთოდი გამოიყენება სასამართლო ლაბორატორიებში ნარკოტიკების ბოროტად გამოყენების, ტოქსიკოლოგიური სკრინინგის, უკანონო ნივთიერებების იდენტიფიკაციისა და რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის, კვალი მტკიცებულებების ანალიზისა და ბიოლოგიური ნიმუშების სასამართლო ექსპერტიზის შესამოწმებლად {30}.

**ქიმიური ანალიზი:** HPLC ფართოდ გამოიყენება ქიმიურ კვლევაში ნაერთების იზოლაციისთვის, გაწმენდისა და დახასიათებისთვის. ის ხელს უწყობს რთული ნარევების იდენტიფიცირებასა და განცალკევებას, რეაქციის პროდუქტების ანალიზს, ქიმიური სტრუქტურების დადგენას და რეაქციის კინეტიკის შესწავლას.

**ბიოქიმიური ანალიზი:** HPLC გამოიყენება ბიოქიმიასა და ბიოტექნოლოგიურ კვლევაში ბიომოლეკულების გასაანალიზებლად, როგორიცაა ცილები, პეპტიდები, ამინომჟავები, ნუკლეინის მჟავები, ნახშირწყლები და მეტაბოლიტები. ის ხელს უწყობს ცილა-

პროტეინის ურთიერთქმედების, ფერმენტული აქტივობის, ტრანსლაციური ცვლილებების და მეტაბოლური გზების შესწავლას {27} {28}.

**ნავთობქიმიური ანალიზი:** HPLC გამოიყენება ნავთობის ინდუსტრიაში ნედლი ნავთობის, რაფინირებული პროდუქტებისა და დანამატების გასაანალიზებლად ხარისხის კონტროლისთვის, მინარევების შესაფასებლად, შემადგენლობის მონიტორინგისთვის და ნახშირწყალბადების პროფილის დასახასიათებლად {29}.

ეს მხოლოდ რამდენიმე მაგალითია მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის გამოყენების ფართო სპექტრისა. HPLC-ის მრავალფეროვნება მას ღირებულ ანალიზურ ინსტრუმენტად აქცევს მრავალ სამეცნიერო დისციპლინაში.

## 2.3 მას-სპექტრომეტრია

მას-სპექტრომეტრია არის ანალიზური ინსტრუმენტი, რომელიც გამოიყენება ნიმუშების მოლეკულური ან ატომური მასების განსაზღვრისათვის. ეს გაზომვები ხშირად შეიძლება გამოყენებულ იქნას ნიმუშის კომპონენტების ზუსტი მოლეკულური წონის გამოსათვლელად. ეს მეთოდი გამოსადეგია უცნობი ნაერთების იდენტიფიცირებისთვის მოლეკულური წონის განსაზღვრისთვის, მოლეკულების სტრუქტურისა და ქიმიური თვისებების დასადგენად. მას-სპექტრომეტრია გამოიყენება მრავალ მეცნიერულ სფეროში: ბიოლოგიაში, მეტალურგიაში,მედიცინაში, არქეოლოგიასა და გეოლოგიაში.

ზოგიერთ მას-სპექტრომეტრიის ხელსაწყოში ხდება აირადი ნიმუშების ბომბარდირება ელექტრონების ნაკადით, რის შედეგადაც ვიღებთ იონიზირებულ მოლეკულებსა და მის ფრაგმენტებს. შემდეგ დადებითად დამუხტული ნაწილაკების ნაკადი გამოიწოვება აირის ნაკადიდან ძაბვის ელექტროდით და იყოფა იონების მასისა და მუხტის ფარდობის (m/z) შესაბამისად. ასეთ განაწილებას აფიქსირებს, არეგისტრირებს მას სპექტრი და ვიღებთ შესაბამისი ფარდობითი ინტენსივობის პიკებს. ამ უკანასკნელის მიხედვით ვიგებთ ნიმუშში არსებული მოლეკულების შესახებ. პიკების შესწავლით და მათი ინტენსივობების გათვალისწინებით ვადგენთ მოლეკულების ზუსტ ფორმულასა და მასებს. მეთოდი საკმაოდ ზუსტი და მგრძნობიარეა {32-33}.

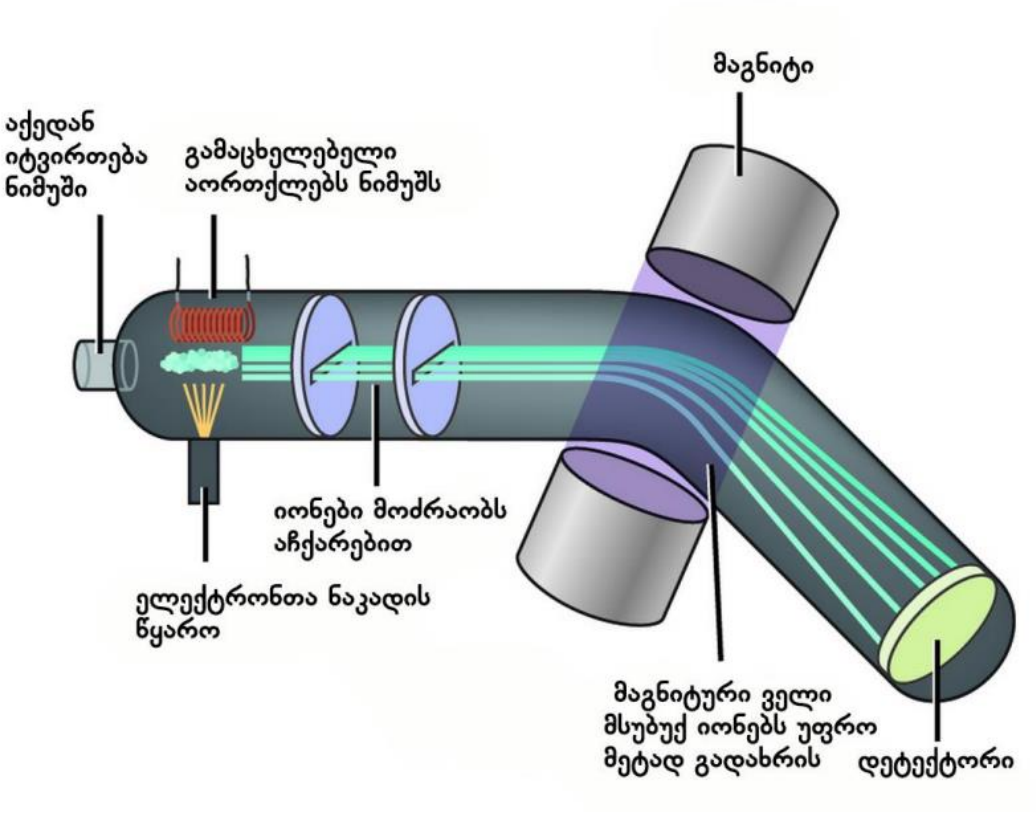
მას-სპექტრომეტრიის ხელსაწყოში პროცესები რამდენიმე ეტაპად მიმდინარეობს:

1. **იონიზაცია -** აქცევს ნიმუშის მოლეკულებს დამუხტულ იონებად.ნიმუშს ეცემა ელექტრონების მაღალი ენერგიის სხივი. ელექტრონებს საკმარისი ენერგია აქვთ ნიმუშში არსებული ატომებიდან ელექტრონების მოსახლეჩად. არსებობს იონიზაციის რამდენიმე სახესხვაობა: ელექტროშეფრქვევის იონიზაცია (ESI) და

მატრიცის დახმარებით ლაზერული დესორბცია/იონიზაცია (MALDI). მატრიცით დამხმარე ლაზერული დესორბცია/იონიზაცია (MALDI) არის რბილი იონიზაციის ტექნიკა, რომელიც გამოიყენება მას სპექტრომეტრიაში ისეთი დიდი მოლეკულების გასაანალიზებლად, რომლებიც ან არამდგრადია ან თერმულად არასტაბილურია. ეს ტექნიკა საშუალებას იძლევა მოვახდინოთ ბიომოლეკულების (მაგ. დნმ, ცილები, პეპტიდები და შაქარი) და დიდი სინთეზური ორგანული მოლეკულების (მაგ. პოლიმერები, დენდრიმერები და სხვა მაკრომოლეკულები) იდენტიფიკაცია {32}.

იონიზაციის წყაროს კამერაში მოთავსებულია ვოლფრამის ძაფი (ვარვარა), რომელიც გაცხელების შედეგად აფრქვევს ელექტრონებს. არსებობს ელექტრონული იონიზაცია: ელექტრონების ნაკადი მიმართულია კამერაში შემომავალი ნიმუშის მართობულად. ელექტრონები აჩქარდებიან ანოდისკენ. ნიმუში კამერაში შესვლამდე უნდა აორთქლდეს ე.ი, იონურ წყაროში უნდა შევიდეს როგორც გაზური ფაზის მოლეკულები {33}.

2. **იონების დაყოფა** – იონები მოძრაობენ აჩქარებით ელექტრულ ველში და ხვდებიან მაგნიტურ ველში, სადაც იონები იცვლიან მოძრაობის ტრაექტორიას და დაიყოფიან მასა-მუხტი შეფარდების (m/z) თანახმად; ნეიტრალური ნაწილაკები არ იცვლიან მოძრაობის მიმართულებას. მაგნიტურ ველში უფრო მეტად გადაიხრება მაღალი მუხტის მქონე იონები, ვიდრე დაბალი მუხტის მქონე. ე.ი იონების გადახრის ხარისხი მათ მუხტზე და სიჩქარეზეა დამოკიდებული.
3. **დეტექტირება**- იონების გაფილტვრის შედეგად მიღებული იონური ნაკადი ფიქსირდება სხვადასხვა ტიპის დეტექტორებით: ელექტრონული გამამრავლებელი, მრავალარხიანი ფირფიტა, ფარადეის ცილინდრი, ფოტოგამაძლიერებელი (სცინტილაციური მთვლელი) {33}. განცალკევებული იონები იზომება და იგზავნება მონაცემთა სისტემაში სპექტრი უბრალოდ არის იონების m/z თანაფარდობები, რომლებიც წარმოდგენილია ნიმუშში მათი ინტენსივობის მიხედვით.




ნახ 6. მას სპექტრომეტრის ზოგადი სქემა {33}.

**გამოყენება** - მას-სპექტრომეტრია იძლევა უცნობი ნაერთების იდენტიფიკაციის საშუალებას წინასწარ მომზადებული საკალიბროების დახმარებით. იონების ფრაგმენტაციამ და მასა-მუხტის თანაფარდობამ შეიძლება მოგვაწოდოს მნიშვნელოვანი ინფორმაცია ნაერთის სტრუქტურის, ელემენტარული შემადგენლობისა და ფუნქციური ჯგუფების შესახებ. მას-სპექტრომეტრია გადამწყვეტ როლს ასრულებს პროტეომიკაში, ბიოლოგიურ სისტემებში ცილების შესწავლაში. იგი გამოიყენება ცილების იდენტიფიკაციის, დახასიათებისა და რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის. მას-სპექტრომეტრიას შეუძლია გააანალიზოს ცილების ფერმენტული მონელების/დაშლის შედეგად წარმოქმნილი პეპტიდური ფრაგმენტები, რაც გვაწოდებს ინფორმაციას ცილებში ამინომჟავების თანმიმდევრობებისა და ტრანსლაციური ცვლილებების შესახებ. მას-სპექტრომეტრია არის ძირითადი ტექნიკა მეტაბოლომიკის კვლევებში. განაპირობებს მეტაბოლიტების იდენტიფიკაციას და რაოდენობრივ განსაზღვრას. ის გვეხმარება მეტაბოლური გზების გაგებაში, ბიომარკერების აღმოჩენაში და დაავადების მექანიზმების შესწავლაში. მნიშვნელოვანია იზოტოპური თანაფარდობის ანალიზში: მას სპექტრომეტრია იძლევა ნიმუშებში იზოტოპური თანაფარდობის გაზომვის საშუალებას, რაც ღირებულია სხვადასხვა სამეცნიერო დარგებში {34-37}.

## 2.4 ენანტიოსელექტიური სითხური ქრომატოგრაფია და ნარკოტიკების ენანტიოსელექტიური ანალიზი. მეთორფანი და მისი მეტაბოლიტები

ენანტიოსელექტიური თხევადი ქრომატოგრაფია, ასევე ცნობილი, როგორც ქირალური თხევადი ქრომატოგრაფია, არის მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის (HPLC) სპეციფიკური რეჟიმი, რომელიც გამოიყენება ენანტიომერების დაყოფისა და ანალიზისთვის. ენანტიომერები არის სტერეოიზომერები, რომლებიც ისე შეესაბამება ერთმანეთს როგორც ობიექტი და მისი სარკულლი ანარეკლი. მათ აქვთ იგივე ქიმიური სტრუქტურა, მაგრამ განსხვავდებიან ატომების სივრცითი განლაგებით {23}.

ენანტიოსელექტიური თხევადი ქრომატოგრაფიაში ქრომატოგრაფიული სვეტის სტაციონარული ფაზა შეიცავს ქირალურ სელექტორს ( მოლეკულას ან მოლეკულების ჯგუფს), რომელიც შერჩევით ურთიერთქმედებს ერთ ენანტიომერთან. ენანტიომერი, რომელსაც აქვს უფრო მაღალი აფინურობა ან უფრო ძლიერი ურთიერთქმედება ქირალურ სელექტორთან, უფრო დიდხანს დარჩება სვეტში, რაც გამოიწვევს მის უფრო ნელ გამორეცხვას სხვა ენატიომერთან შედარებით. შეკავების დროში ეს განსხვავება იძლევა ენანტიომერების დაყოფის საშუალებას.

ენაანტიოსელექტიური თხევადი ქრომატოგრაფია ფართოდ გამოიყენება ფარმაცევტულ, აგროქიმიურ და ქიმიურ მრეწველობაში, აგრეთვე კვლევით და ანალიზურ ლაბორატორიებში, სადაც მნიშვნელოვანია ენანტიომერების დაყოფა და ანალიზი. ეს მეთოდი გამოიყენება ქირალური პრეპარატების ანალიზში მათი ენანტიომერული სისუფთავის დასადგენად და ცალკეული ენანტიომერების ფარმაკოკინეტიკის შესაფასებლად {3}.

ბევრი ბუნებრივი პროდუქტი, როგორიცაა ეთერზეთები, არომატიზატორები, სუნამოები და ბიოაქტიური ნაერთები, არსებობს ენანტიომერების ნარევების სახით. ენაანტიოსელექტიური თხევადი ქრომატოგრაფია გამოიყენება ამ ენანტიომერული ნარევების დაყოფისა და ანალიზისთვის ხარისხის კონტროლის, იდენტიფიკაციისა და დახასიათების მიზნით. სითხურ ქრომატოგრაფიას დიდი როლი აქვს გარემოსა და კრიმინალისტურ ანალიზში, გამოიყენება ქირალური დამაბინძურებლების, პესტიციდების და ნარკოტიკების შესასწავლად. ეს ხელს უწყობს დაბინძურების წყაროების იდენტიფიცირებას და მათი გარემოზე ზემოქმედების გააზრებას {39}.

როგორც შესავალშია აღნიშნული, ქირალური პრეპარატი მეთორფანი (3-მეთოქსი-17-მეთილ-მორფინანი, $C_{18}H_{25}NO$) არის ქირალური ნაერთი და არსებობს ორი ენანტიომერის სახით: დექსტრომეთორფანი (DXM) და ლევომეთორფანი (LVM). იხ. ნახ 1-2

DXM მცირე დოზით არის ხველების საწინააღმდეგო საშუალება, ხოლო მაღალი კონცენტრაციით ის ჰალუცინოგენს  წარმოადგენს. ლევომეთორფანი (LVM) მცირე კონცენტრაციითაც კი ძლიერი ნარკოტიკია. ასეთი განსხვავებული ფარმაკოლოგიური ეფექტის გამო, ბუნებრივია, ენანტიომერებს აქვთ განსხვავებული იურიდიული სტატუსი. DXM არის ფარმაცევტული ნივთიერება, ხოლო LVM არის კონტროლირებადი ოპიოიდური ნარკოტიკი.

მეთორფანის ენანტიომერები ორგანიზმში მიმდინარე ქიმიური პროცესების შედეგად გარდაიქმნებიან მეტაბოლიტებად.ძირითად მეტაბოლიტებს (O- დემეთილ, N- დემეთილ და O,N-დიდემეთილი) შორის O- დემეთილირებული მეტაბოლიტი განიხილება, როგორც პირველ რიგში პასუხისმგებელი ნივთიერება ფარმაკოლოგიურ აქტივობაზე. იხ. ნახ 3

LVM-ის O-დემეთილირებულ მეტაბოლიტ ლევორფანოლს აქვს 5-ჯერ უფრო ძლიერი ოპიოიდური, თვისებები, ვიდრე მორფინს. აღნიშნული ფაქტორიდან გამომდინარე, სასამართლო ექსპერტიზის თვალსაზრისით, პრეპარატის დიფერენცირებისათვის მნიშვნელოვანია განისაზღვროს მეთორფანის ენანტიოსელექტიური ანალიზი {4}.

საერთაშორისო, აშშ-სა და ევროპის ფარმაკოპეას აქვს მეთოდი ლევომეთორფანისა და დექსტრომეთორფანის ენანტიოსელექტიური განსაზღვრისთვის ცელულოზა 3 ანუ 4-მეთილბენზოატის სვეტზე. სამეცნიერო ლიტერატურაში ეს მეთოდი ნაკლებადაა ფოკუსირებული მეტაბოლიტებისთვის. ძირითადად განსაზღვრავენ მხოლოდ დექსტრომეთორფანსა და დექსტროფანს. რაც შეეხება ლევომეთორფანს და მის მეტაბოლიტს - ლევორფანოლს მათი განსაზღვრის მეთოდზე ინფორმაცია ფაქტობრივად არ გვაქვს. დექსტრომეთორფანისა და მისი ენანტიომერების განსაზღვრა ხორციელდება კაპილარული ელექტროფორეზით (დეტექტორი- ულტრაიისფერ-ხილული).

დღესდღეობით მუშავდება მეთოდი, რომელიც ზომავს დექსტროფანსა და მის მეტაბოლიტებს ერთდროულად. ეს მეთოდი დაფუძნებულია მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიასა და მას-სპექტრომეტრის ტანდემზე {4}.

თავდაპირველად პილაინენმა და  კოსტიაინენმა გამოაქვეყნეს სტატია ამფეტამინის, მეთორფანისა და პროპოქსიფენის ენანტიომერების ნარევის დაყოფის შესახებ. მათ გამოიყენეს ორი სხვადასხვა ქირალური სტაციონარული ფაზა, ვანკომიცინი და ბეტა-ციკლოდექსტრინი (β-CD) {40} {4}.

მოგვიანებით, კიმმა და მისმა თანამშრომლებმა ასევე შეიმუშავეს მეთოდი მესქის გამოყენებით, რომლის საშუალებითაც დაიყო დექსტრომეთორფანის მთავარი

მეტაბოლიტები:3-ჰიდროქსიმორფინანი, 3-მეთოქსიმორფინანი და 17-ჰიდროქსი -მეთილმორფინანი {41}. 2011 წელს ჰანაჯირმა და სხვებმა DXM-ის, LVM-ის და მათი მეტაბოლიტების დაყოფა მოახერხეს ვირთაგვის პლაზმაში, თმაში და შარდში. დაყოფა მოხდა CD-Ph სვეტზე, მოძრავი ფაზა გამოიყენეს 0.1% -იანი ჭიანჭველას მჟავა აცეტონიტრილში. სვეტზე დაიყო N,O დიდემეთილ და O- დემეთილ მეტაბილიტები.

დექსტრო- და ლევომეთორფანის ენანტიოსელექტიური დაყოფა ადამიანის პლაზმაში მოახერხა ტალიარომ და მისმა თანამშრომლებმა კაპილარული ელექტროფორეზის საშუალებით (ულტრაიისფერი დეტექტორით). ჯერჯერობით ტალიაროს ეს შემუშავებული მეთოდი არის ყველაზე ვალიდური ასეთი ექსპერიმენტისთვის, თუმცა აქვს ნაკლოვანებაც. როცა საქმე ეხება მცირე კონცენტრაციების განსაზღვრას ულტრაიისფერი დეტექტორი შესაძლოა არ იყოს მგრძნობიარე. ამ მიზეზის გამო შემუშავდა მეთოდი, რომელიც ვალიდურია მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია & მას სპექტრომეტრიის გამოყენებით დექსტორმეთორფანის, ლევომეთორფანისა და მათი მეტაბოლიტების ენანტიოსელექტიურ ანალიზისათვის {4}.

# 3. ექსპერიმენტული ნაწილი

## 3.1 გამოყენებული აპარატურა

კვლევისთვის გამოყენებულ იქნა სითხური ქრომატოგრაფი & მას-სპექტრომეტრი Agilent Technologies 1290 Infinity & Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS. იხ. სურ.1

სითხური ქრომატოგრაფის შემადგენლობაა : ნიმუშების ავტომატური მიმწოდებელი, სვეტების თერმოსტატი, ულტრაიისფერი დეტექტორი და ბილარული ტუმბო. ხელსაწყო იმართება და მონაცემების დამუშავება ხდება კომპიუტერში ჩატვირთული სპეციალური პროგრამის საშუალებით. ეს არის საკუთრივ Agilent Technologies-ს მიერ შემუშავებული პროგრამა.

**სურ 1. მაღალეფექტრული სითხური ქრომატოგრაფი & მას სპექქტრომეტრი. Agilent Technologies 1290 Infinity & Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS**.

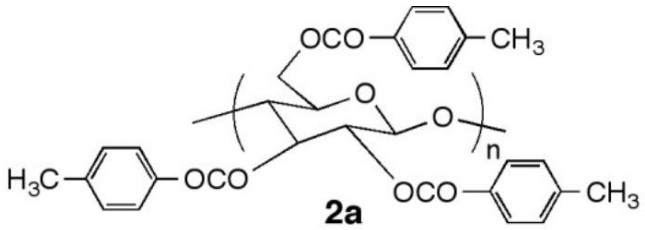
## 3.2 გამოყენებული ნივთიერებები

**მოძრავი ფაზა** - განსაზღვრავს დაყოფის სელექტივობას სტაციონარულ ფაზაზე. სკრინინგის დროს ჩვენ გამოვიყენეთ რამოდენიმე მოძრავი ფაზა სხვადასხვა პროცენტული შემადგენლობის დანამატებით.მაგალითად ვამატებდით დეაირირებულ წყალს ან ამონიუმის ჰიდროქსიდს. ძრითადად გამოყენებული მოძრავი ფაზებია:

1. MeOH 100%
2. MeOH + 0.1% $H_20$
3. MeOH + 10% $H_20$
4. MeOH + 0.4 % $NH_4OH$ + 5% $H_20$
5. MeOH + 0.4 % $NH_4OH$ + 10% $H_20$
6. ACN + 0.1% $H_20$
7. ACN + 0.4 % $NH_4OH$
8. ACN + 0.4 % $NH_4OH$ + 5% $H_20$
9. ACN + $NH_4CH_3CO_2$

რაც შეეხება სტაციონარულ ფაზებს სკრინინგში გამოყენებულია

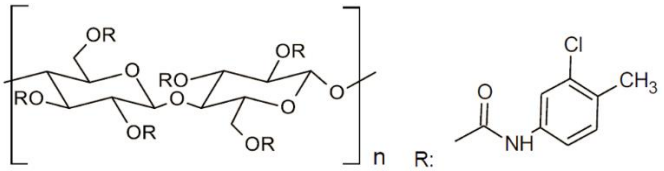
1. Cellulose 3 / Cellulose tris (4-methylbenzoate)




**2a**

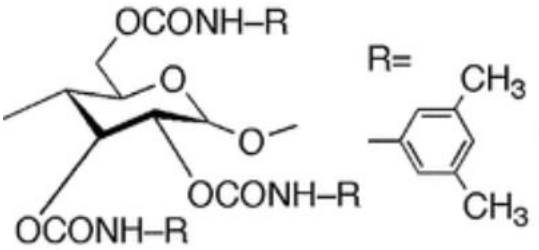
**Chiral stationary phase**

2. Cellulose 4 / Cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate)



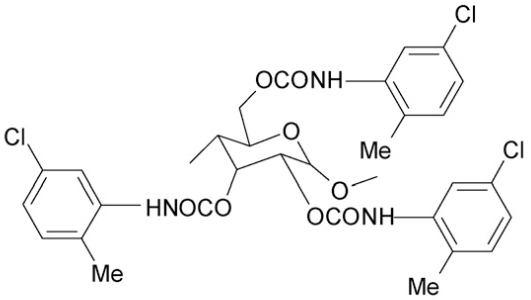

Cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate)

3. Amylose 1 / Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)




**ADMPC**

4. Amylose 2 / Amylose tris(5-chloro-2-methylphenylcarbamate)




Amylose tris(5-chloro-2-methylphenylcarbamate)

4. გარდა ზემოთ ჩამოთვლილისა გამოვიყენეთ შემდეგი სვეტებიც; Sp1; iSp2; iSp9; iSp10B ; iSp 11.

## 3.3 ნიმუშის მომზადება

ექსპერიმენტში საანალიზო ნიმუშს წარმოადგენს ნარევი LVM-ის, DXM-ის, Dextrorphan-ისა და Levorphanol-D3. ცნობილი კონცენტრაციების ეს ნიმუშები მივიყვანეთ 1000 ნგ/მლ კონცენტრაციამდე მეთანოლით განზავებით. ავიღეთ თითოეული ნიმუში 250 მკლ, შესაბამისად მივიღეთ 1 მლ-იანი ნარევი 25 ნგ/მლ კონცენტრაციით.

## 4.4 ნიმუშის ანალიზი და პირობები

ნიმუშის ანალიზი მიმდინარეობდა MRM მეთოდით. რაც გულისხმობს, რომ ხელსაწყომ უნდა მიჩვენოს ჩემთვის სასურველი კონკრეტული ნაერთების მოლეკულური მასების პიკები. ცხრილ 8-ში ნაჩვენებია DXM-ის, LVM-ისა და მათი მეტაბოლიტების მოლეკულური მასები და იონიზაციის შედეგად წარმოქმნილი ფრაგმენტები. სპექტრზე სწორედ ამ ფრაგმენებს ვიღებთ.

ნაკადის სიჩქარე- 1მლ/წთ

UV დეტექტორის ტალღის სიგრძე- 220 ნმ და რეაგირების დრო > 0.1 წთ

ინჟექტირების მოცულობა - 20 µl

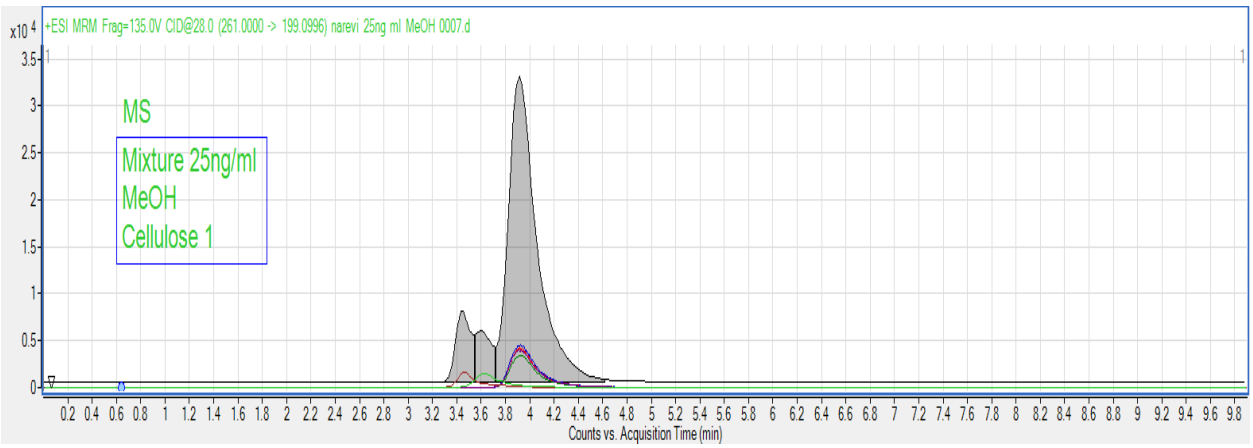
წნევის ზედა ზღვარი - 600 ბარი / ტემპერატურა - $20^0$-$25^0$ C

ცხრილი 8. DXM-ის, LVM-ისა და მათი მეტაბოლიტების მოლეკულური მასები და იონიზაციის შედეგად წარმოქმნილი ფრაგმენტები.

| ნივთიერებები | მოლეკულური მასა გრ/მოლ | მოლეკულური იონი (m/z) | პროდუქტ იონი (m/z) |
|---|---|---|---|
| DXM | 271.4 | 272.4 | 215.1<br>213.1<br>171.1<br>147.1 |
| LVM | 271.4 | 272.4 | 215.1<br>213.1<br>171.1<br>147.1 |
| Dextrorphan | 257.4 | 258 | 201.0<br>199.0<br>157.1<br>258.4 |
| Levorphanol | 257.4 | 258 | 196.1<br>154.1 |
| DXM-D3 | 274.4 | 275.4 | 218.2<br>216.1<br>174.1<br>150.1 |
| Levorphanol-D3 | 260.4 | 261 | 199.1<br>157.1 |
| Dextrorphan-D3 | 260.4 | 261 | 157.1<br>133.2 |

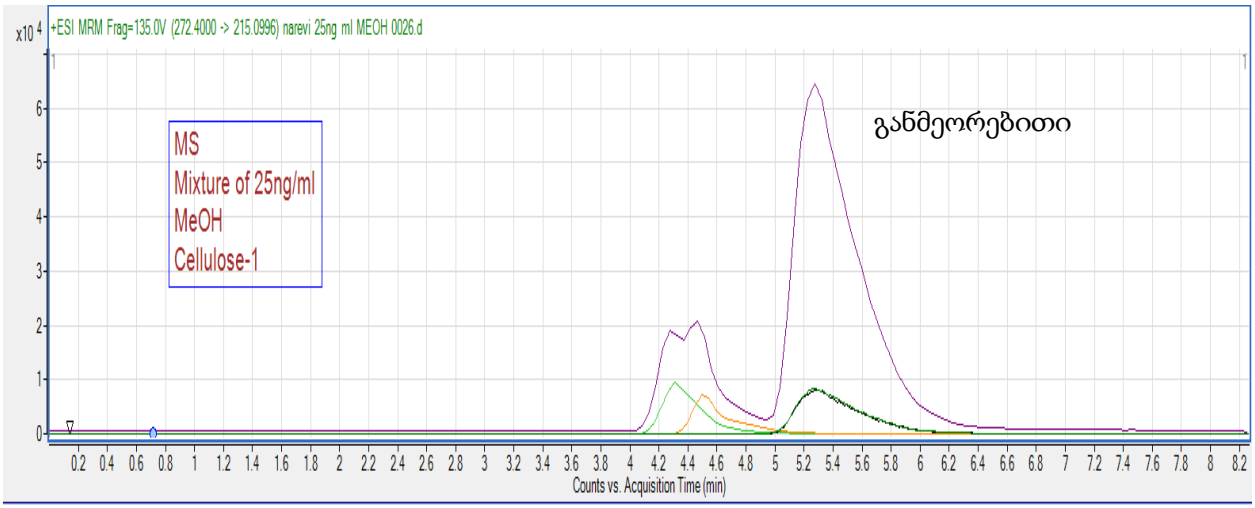
# 4.კვლევის შედეგები და მათი განხილვა

სკრინინგი დავიწყეთ მოძრავი ფაზა MeOH 100%- იანი ხსნარით სხვადასხვა სვეტებზე.

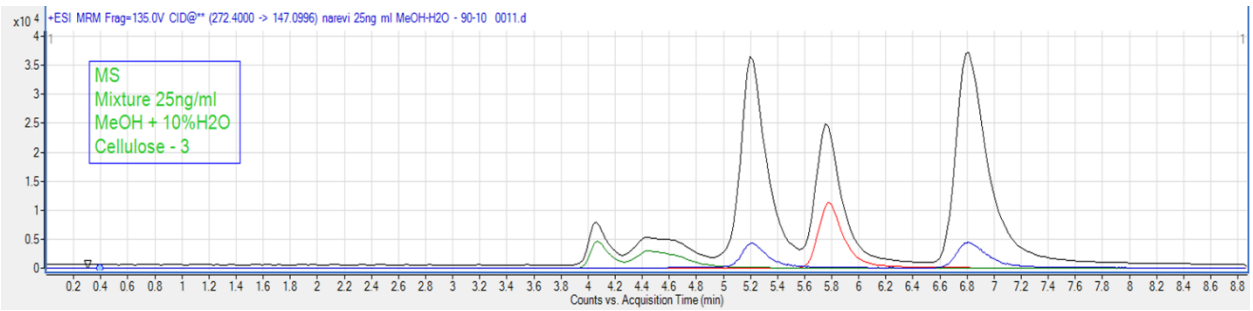



● Cellulose 1 სვეტზე ვხედავდთ ნივთიერებებს, თუმცა არ გვაქვს ფუძისეული დაყოფა, პიკები ფარავს ერთმანეთს და შესაბამისად მეტაბოლიტების გარჩევა ვერ ხდება. ასევე სვეტზე ვერ ხდება ლევომეთორფანის დაყოფა.

ვინაიდან მეთოდი ახალი,ა ჩვენ ვასრულებდით განმეორებით ანალიზსაც, თუმცა ხშირ შემთხვევაში ვიღებდით იგივე შედეგს.

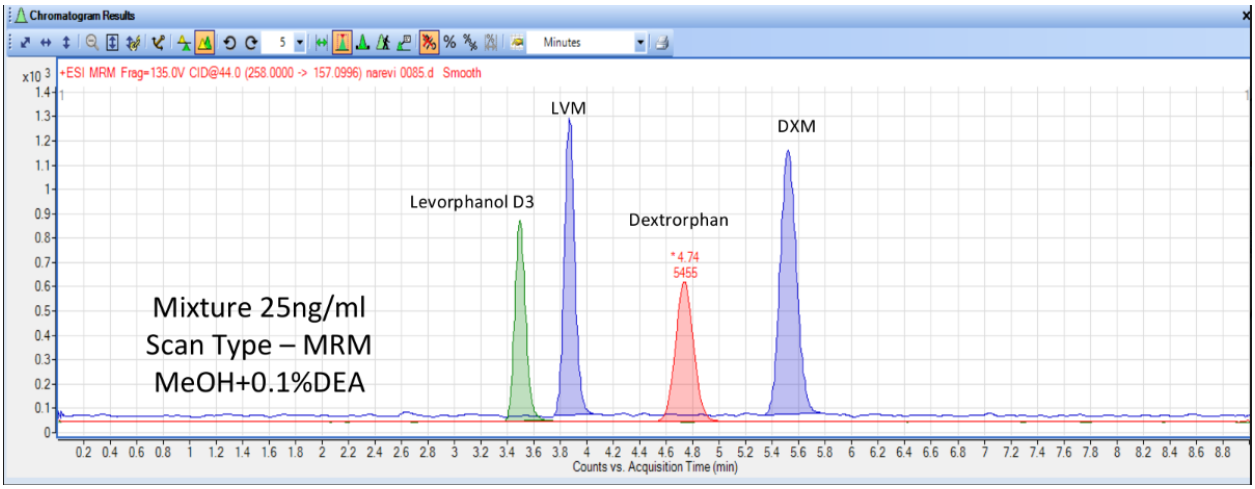


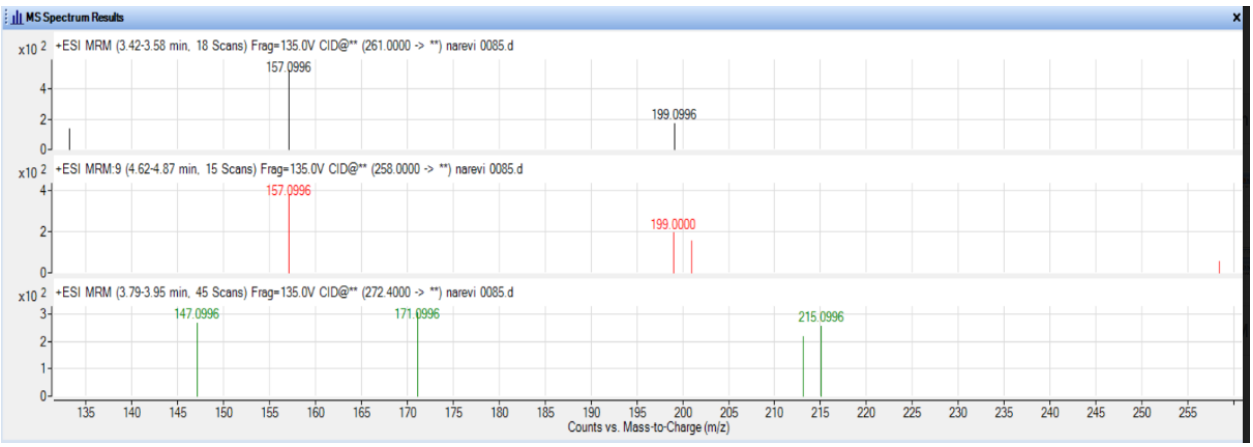

● იგივე სვეტზე შევცვალეთ ფაზა. გამოვიყენეთ MeOH + 10% $H_20$. ნიმუშის შეკავების დრო მით უფრო ხანგრძლივია, რაც მეტია წყლის შემცველობა ელუენტში.




აღნიშნულ სპექტრში არის მცირე გადაფარვები, რაც არ არის ხელსაყრელი. არ გვაქვს იდეალური ფუძისეული დაყოფა, ძლიერაა გაფართოებული Levorphanol D3- ის პიკი. ეს უკანასკნელი პირველივე გამოდის ქრომატოგრაფიულ სვეტზე. 10% წყლის დამატებამ აშკარად გამოიღო შედეგი და მივიღეთ უკეთესი დაყოფა ვიდრე გვქონდა 100%-იანი მეთანოლის შემთხვევაში.

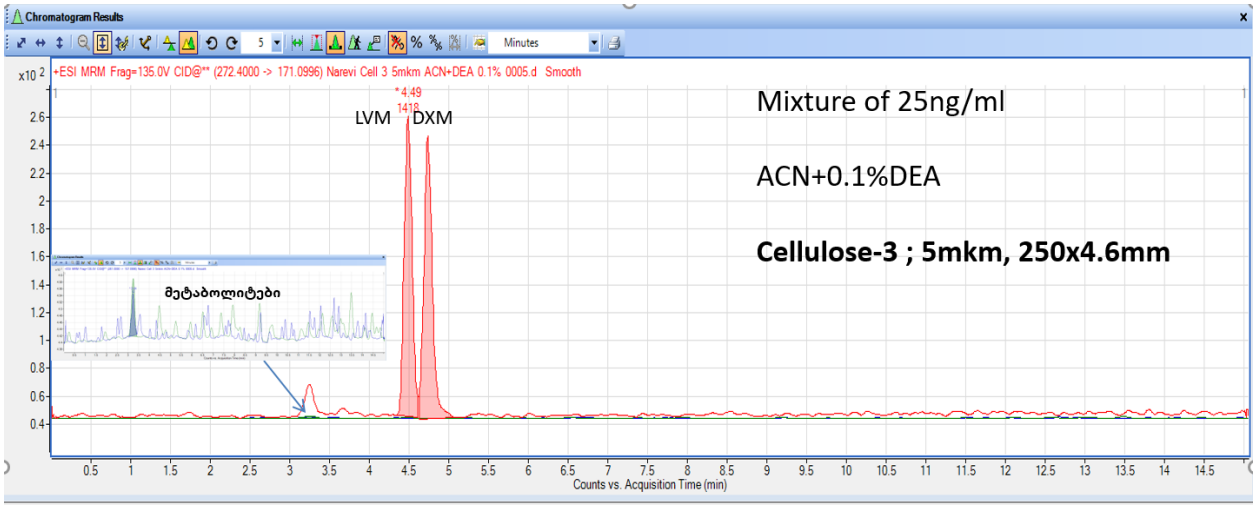
● შევამცირეთ მოძრავ ფაზაში წყლის კონცენტრაცია, გამოვიყენეთ MeOH + 0.1% $H_2O$. სვეტი ისევ Cellulose 3. შედეგად მივიღეთ ფუძისეული დაყოფები, ვიწრო და მაღალი გარჩევითობის პიკები. უნდა აღინიშნოს ის ფაქტიც, რომ მეთოდის უპირატესობა არის მცირე დროში ენანტიომერების და მისი მეტაბოლიტების დაყოფა. აპარატურას Levorphanol D3- ის, LVM-ის, Dextrorphan-ისა და DXM-ის დაყოფისათვის მხოლოდ 6 წუთი დასჭირდა.



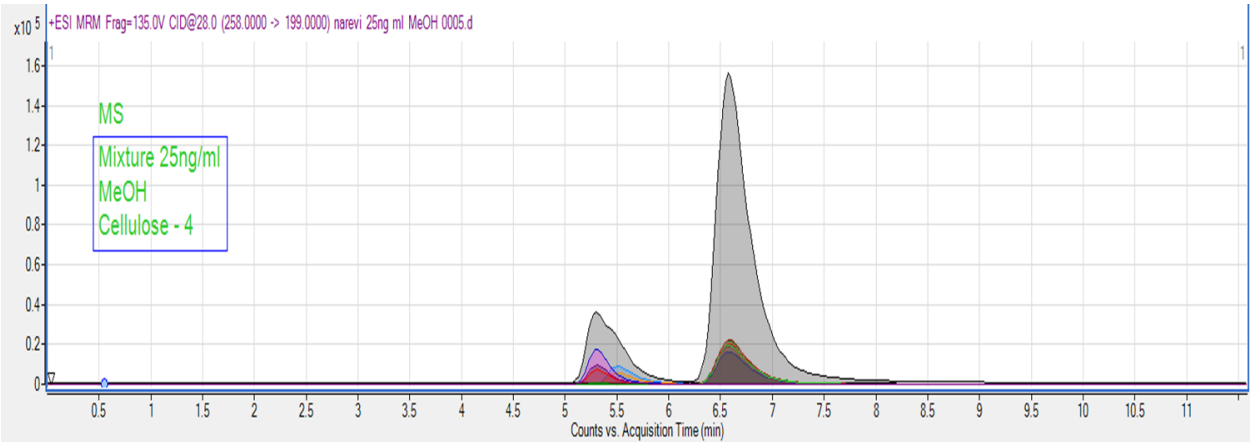



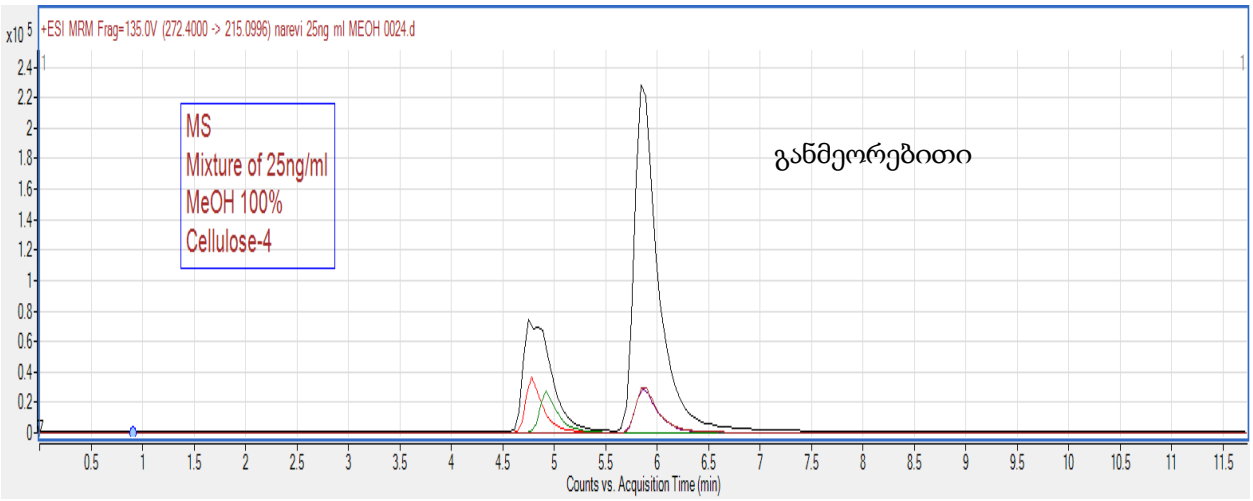
● გარდა ზემოთ აღნიშნული სვეტისა და ფაზისა, ჩვენს მიერ ჩატარებულ სკრინინგში ვერსად  მივიღეთ უფრო უკეთესი დაყოფა.

● Cellulose 3 სვეტზე მოძრავი ფაზის ACN +  0.1% $H_20$ თანაობისას ვერ დავინახეთ მეტაბოლიტები. მათი პიკები დაიკარგა ხმაურში.

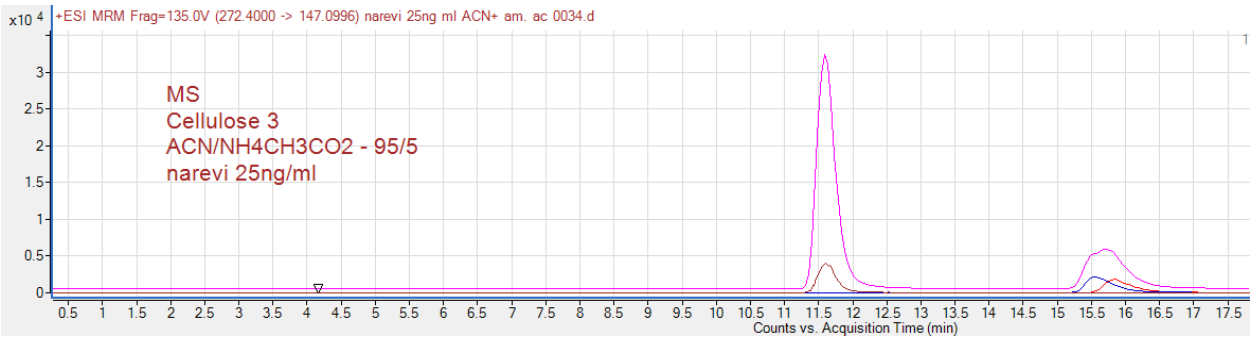



● Cellulose 4 სვეტზე სუფთა მეთანოლის ფაზით არ დაიყო მეტაბოლიტები. პიკებიც გაფართოებულია.

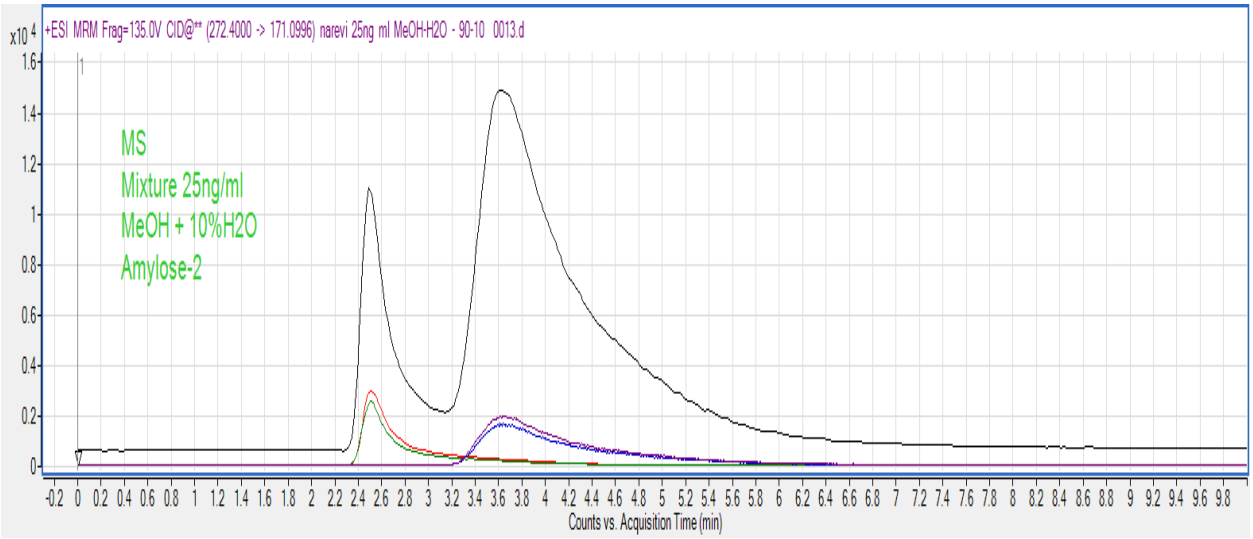


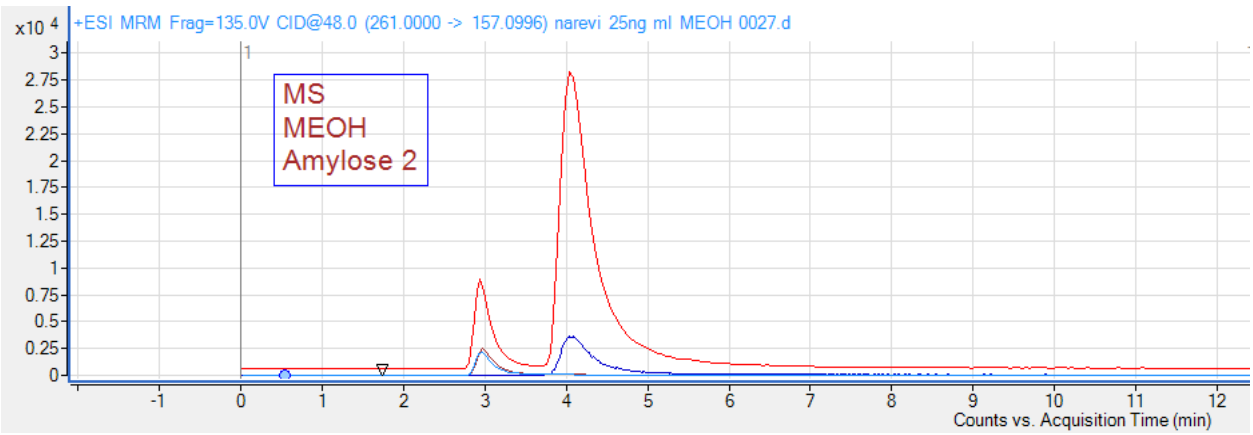



● Cellulose 3 სვეტზე შევცვალეთ მოძრავი ფაზა: გამოვიყენეთ ACN + $NH_4CH_3CO_2$ რომლის საშუალებითაც არ დაიყო ენანტიომერები, მცირე / გაფართოებული პიკები მივიღეთ, თუმცა გაიზარდა ანალიზის ხანგრძლივობა. DXM-ის შესაბამისი პიკი დაახლოებით 15,5- 16 წუთზე მივიღეთ.

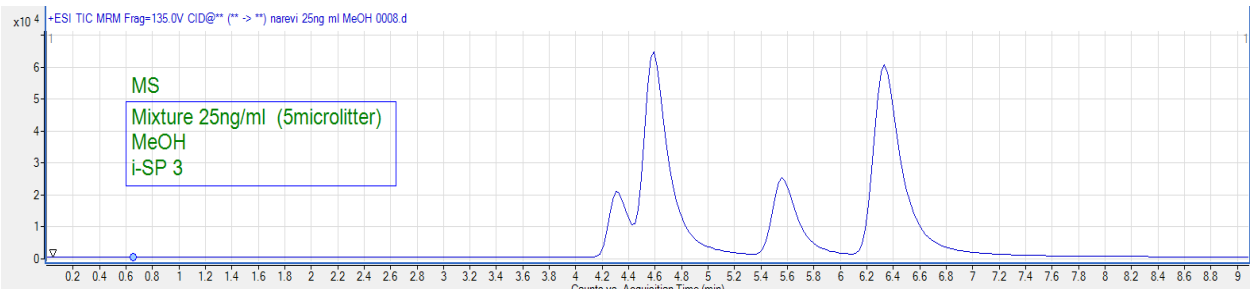



● დაყოფები ვერ მივიღეთ Amylose 2 სვეტზე. DXM-ის პიკი გაფართოებულია, არაა ფუძისეულად დაყოფილი.ასევე ვერ მოხდა მეტაბოლიტების დაყოფაც.მოძრავ ფაზად გამოვიყენეთ სუფთა მეთანოლიც და MeOH + 10% $H_20$.

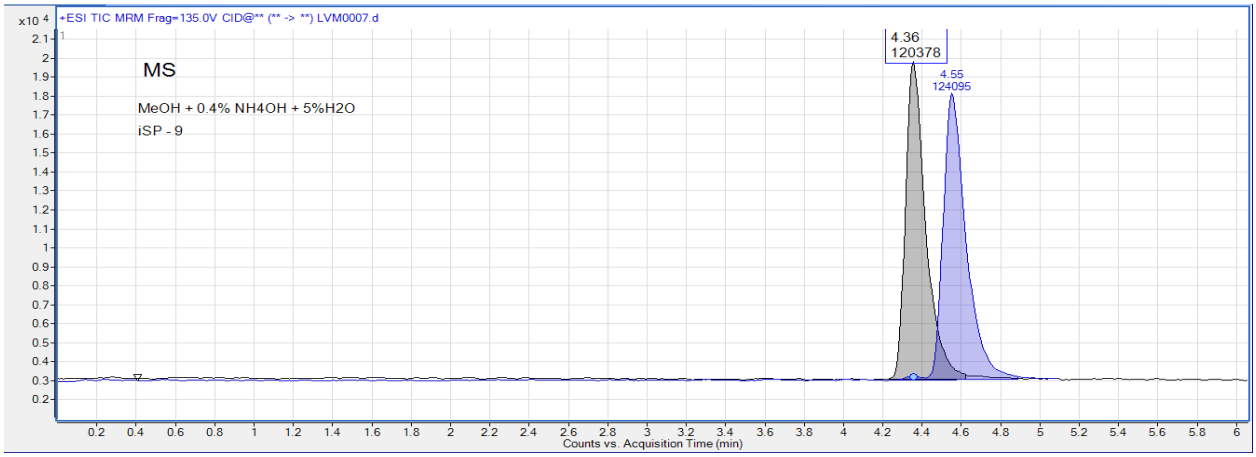


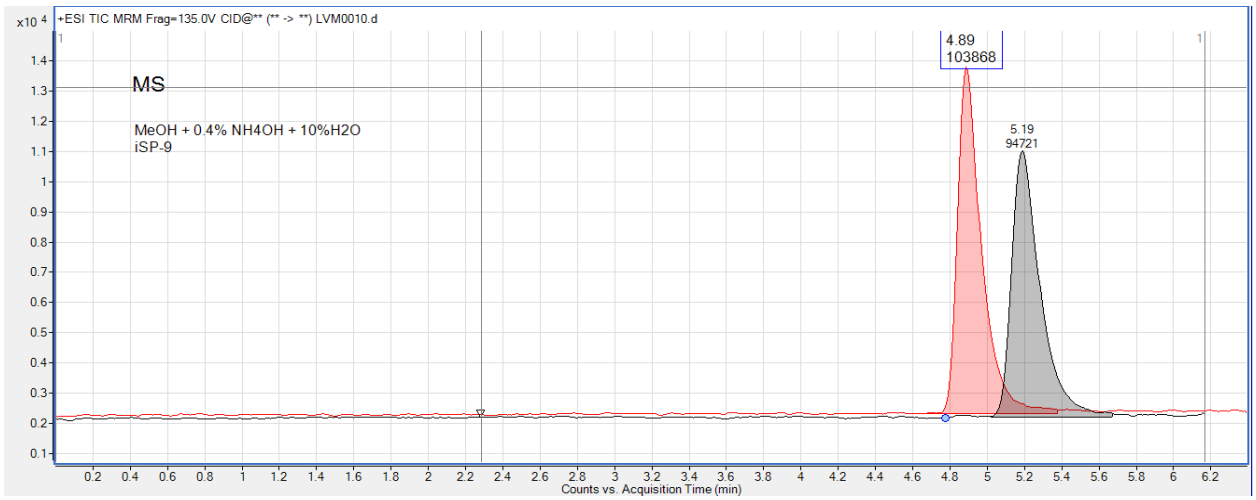




●ასევე გაფართოებული პიკები მივიღეთ i-SP 3 სვეტზე სუფთა მეთანოლის ფაზის გამოყენებით. არ დაიყო LVM და Levorphanol D3.

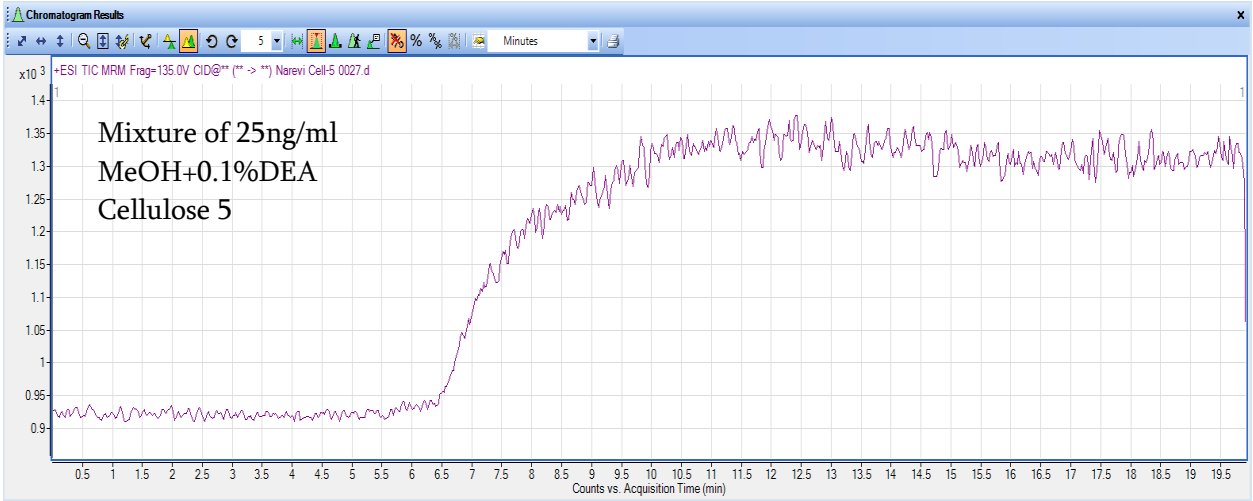


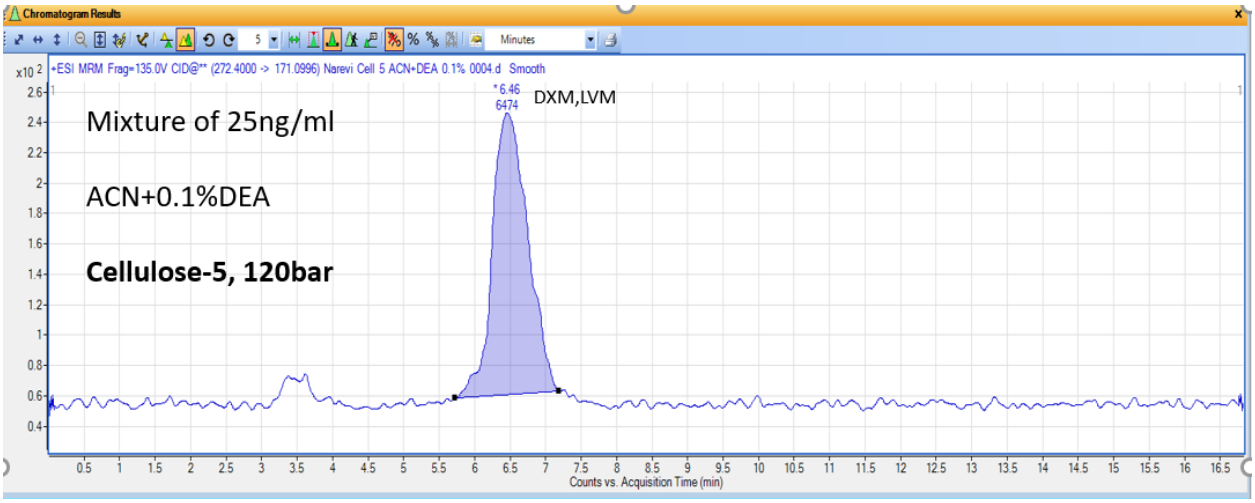

● DXM-ის და LVM-ის დაყოფა ვცადეთ iSp 9 სვეტზე. მოძრავი ფაზა MeOH + 0.4 % $NH_4OH$ + 5% $H_20$, მოგვიანებით გავაკეთეთ 10%-იანი დეაირებული წყლის დამატებითაც. შედეგი დაახლოებით ერთნაირი იყო. ენანტიომერების პიკებმა ერთმანეთი გადაფარა.



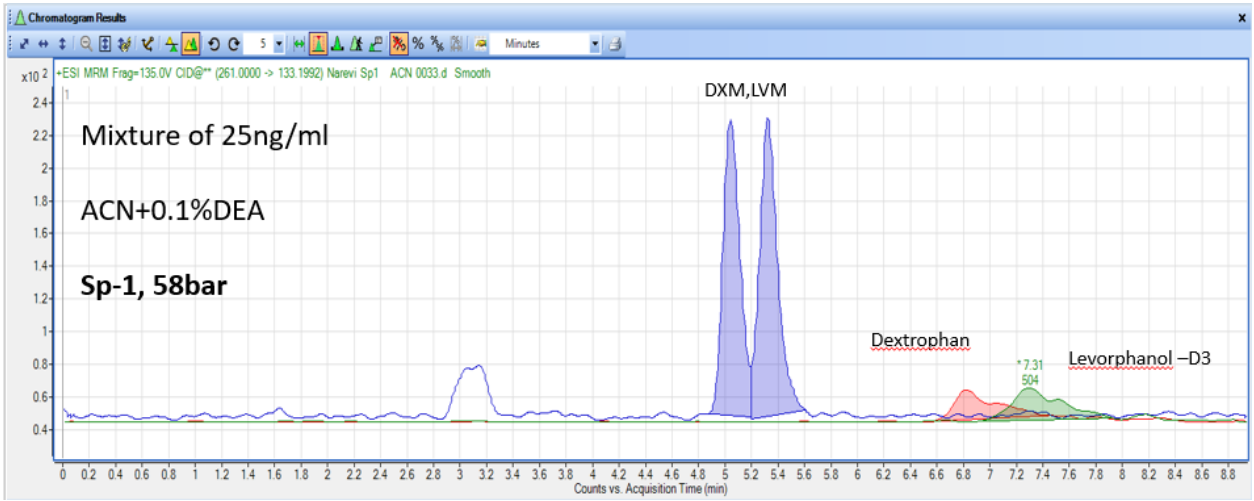



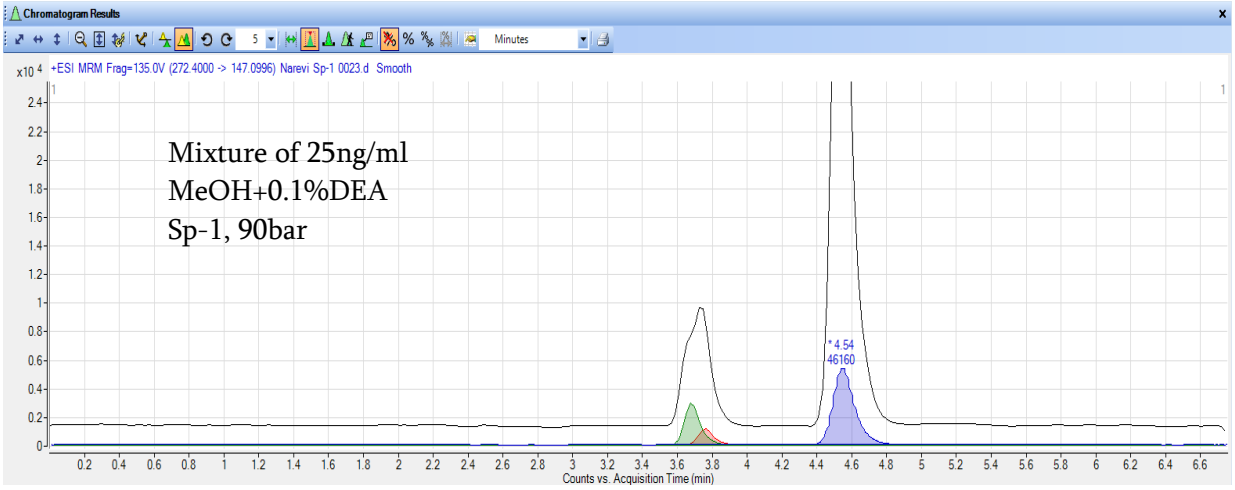

● ფაქტორბრივად ვერაფერი ვერ განისაზღვრა Cellulose 5 სვეტზე MeOH+ 0.1% $H_20$-ის გამოყენება. ACN + 0.1% $H_20$ ფაზის თანაობისას დავინახეთ მხოლოდ DXM-ისა და LVM-ის პიკი.



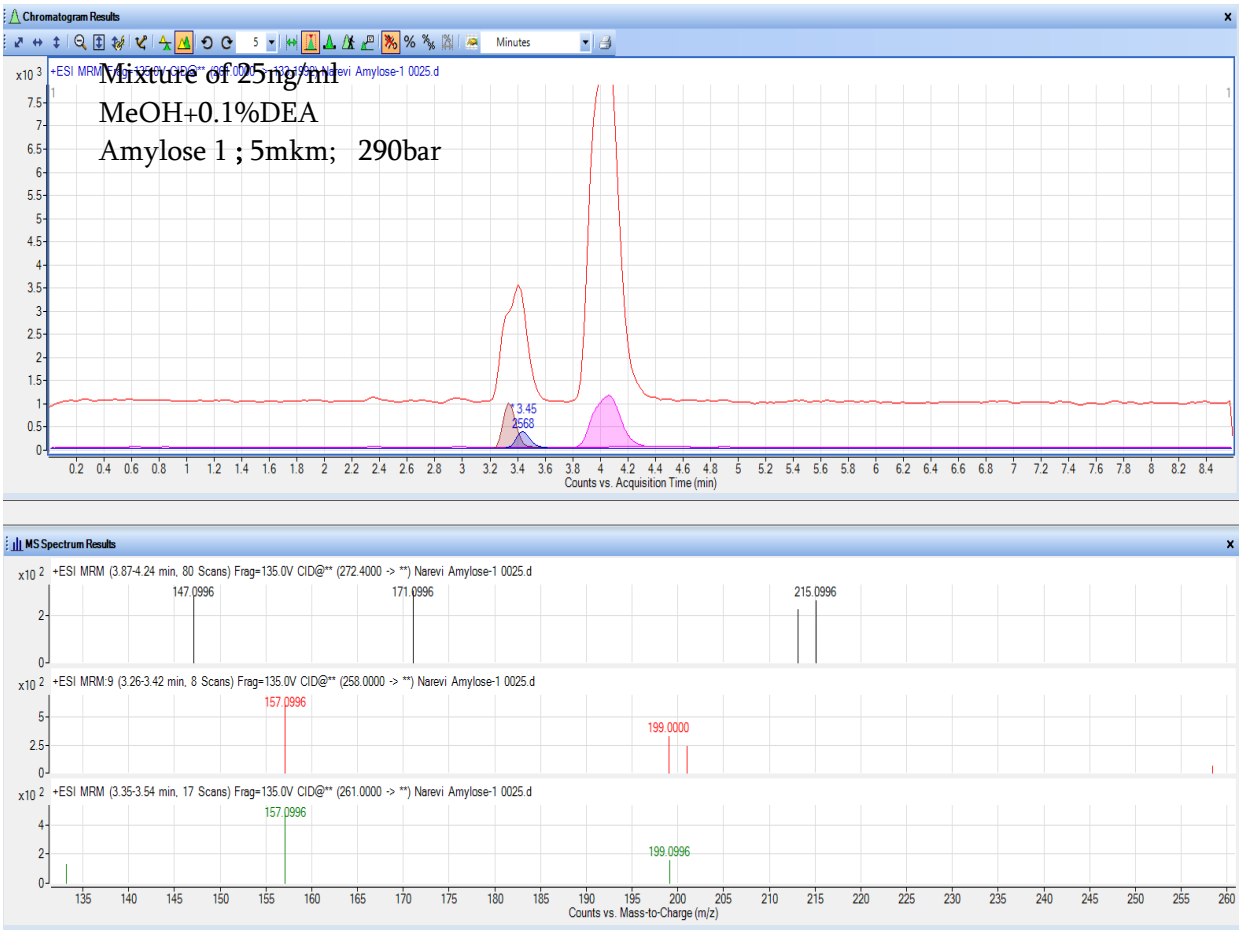




- არასასურველი შედეგი მივიღეთ Sp 1 სვეტზე. ACN + 0.1% $H_2O$ გვაქვს შედარები კარგი შედეგი, თუმცა მეტაბოლიტები ვერ დაიყო.

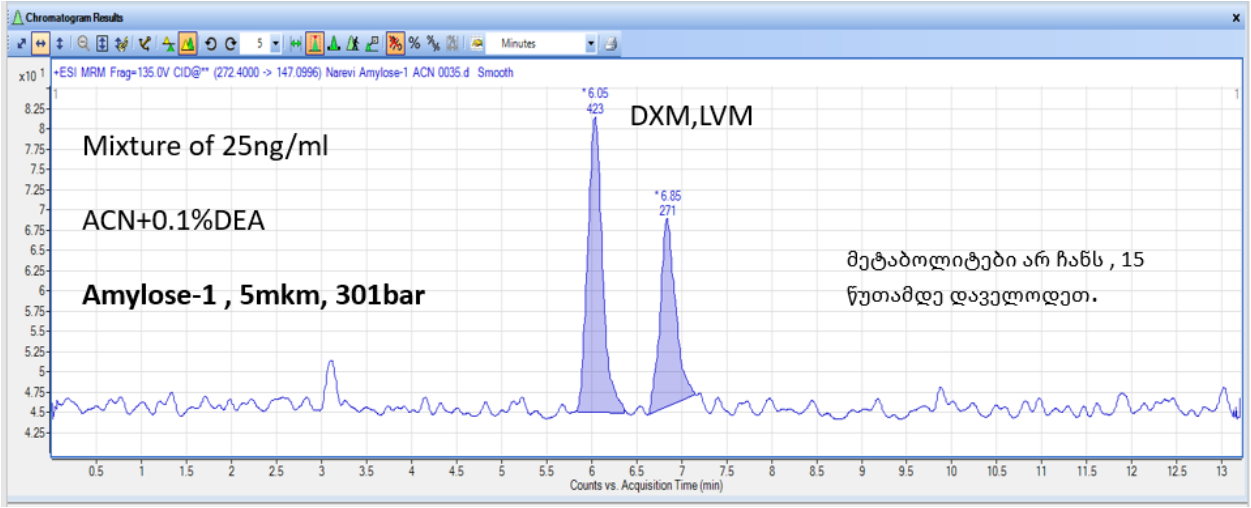




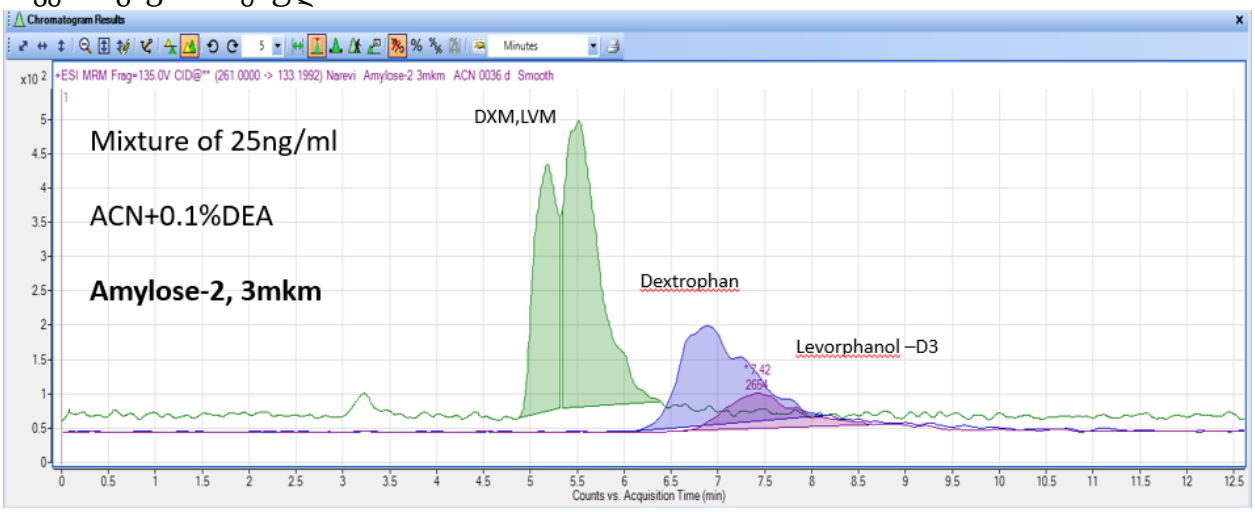

● მეტაბოლიტების დაყოფა ვერ მივიღეთ Amylose 1 სვეტზე MeOH+0.1% დეაირებული წყლის თანაობისას. მსგავსი შედეგი იყო Amylose 2 - ის შემთხვევაშიც.



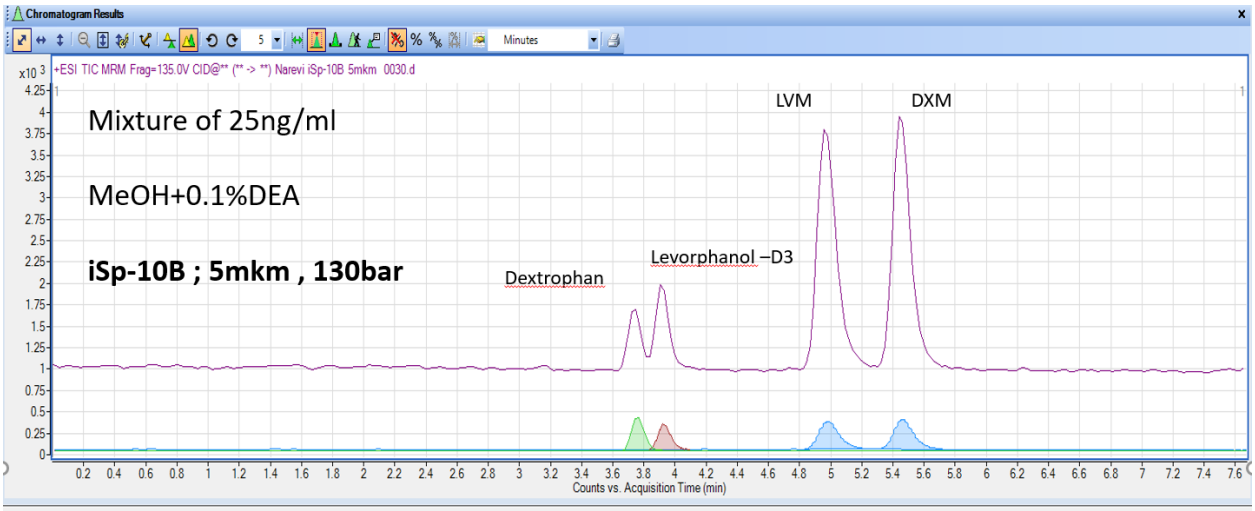

● Amylose-1 სვეტზე ACN + 0.1% $H_2O$ -ის თანაობისას ვერ დავინახეთ მეტაბოლიტები.



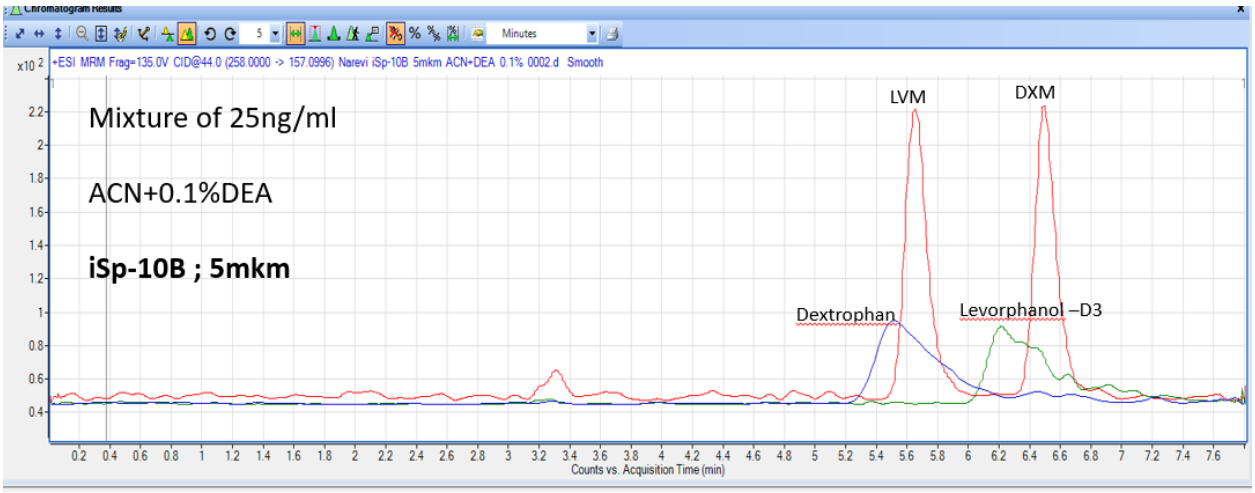

● Amylose 2 სვეტზე დავინახეთ მეტაბოლითები, მაგრამ არ გვაქვს ფუძისეული დაყოფები და პიკების გაფართოებულია.



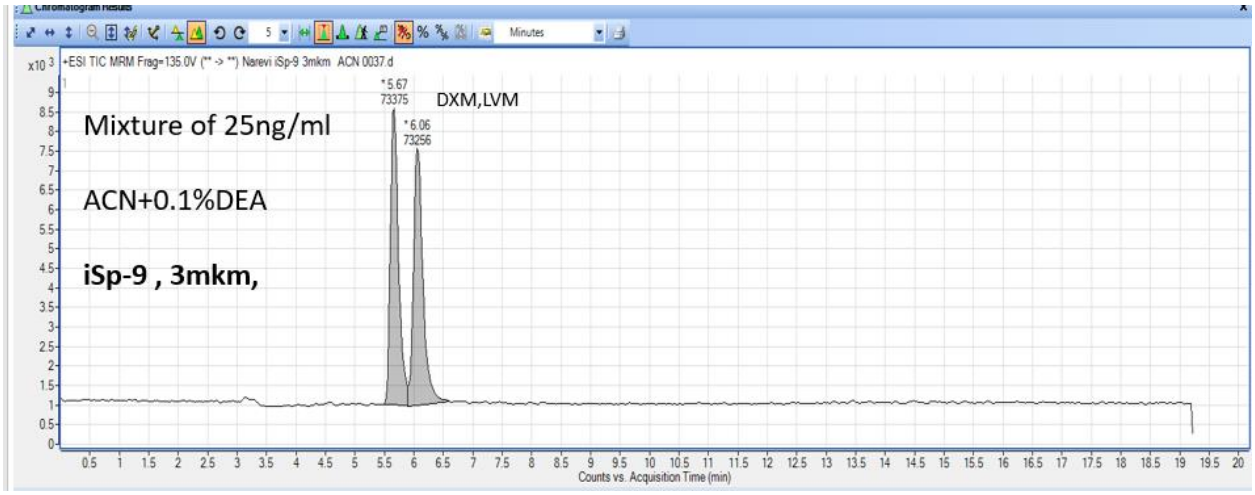

● საკმაოდ თვალსაჩინო დაყოფა გვიჩვენა iSp 10B სვეტმა მოძრავი ფაზა MeOH+0.1%DEAსაშუალებით. თუმცა აქ არ გვაქვს მეტაბოლიტების კარგი ფუძისეული დაყოფა. Cellulose 3 გვაძლევს ამ შემთხვევაში ბევრად უკეთეს შედეგს.

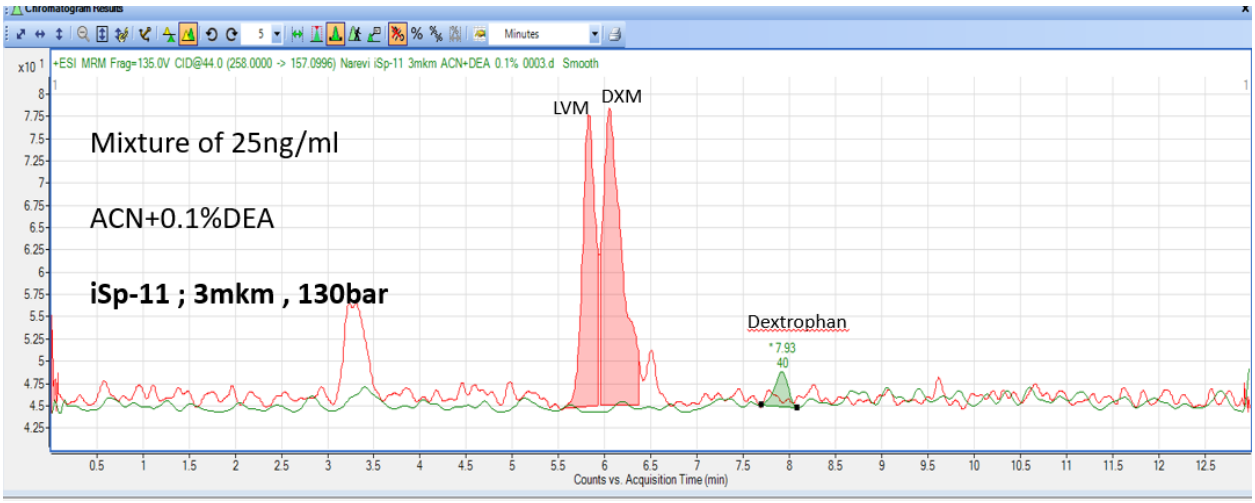



იგივე სვეტი ACN + 0.1% $H_2O$ ფაზის თანაობისას ვერ ყოფს მეტაბოლიტებს, თუმცა დაიყო LVM და DXM.




● მეტაბოლიტების დაყოფებს ვერ ვიღებთ iSp 9 და iSp 11 სვეტებზე ACN + 0.1% $H_2O$ ფაზის თანაობისას.



# 5.დასკვნა

მეთორფანისა და მისი ენანტიომერების ენანტიოსელექტიური დაყოფის ოპტიმიზაციის მეთოდის სკრინინგის შემდეგ, საბოლოოდ, ყველაზე კარგი შედეგი მივიღეთ Lux Cellulose-3 სვეტზე MeOH + 0.1% $H_2O$ მოძრავი ფაზის გამოყენებით. აპარატი მუშაობდა MRM მეთოდით ანუ ნივთიერებების  მოლეკულური მასებისა და იონების დეტექტირებით.

# 6.გამოყენებული ლიტერატურა

{1} A. David Rodrigues Bristol-Myers Squibb Research & Development Princeton - Drugs and the pharmaceutical sciences, Drug-Drug Interactions Second Edition, New Jersey, USA.

{2} Lien Ai Nguyen, Hua He, Chuong Pham-Huy - International journal of Biomedical science Chiral Drugs.

{3} An official website of the United States government, National Library of Medicine (National Center For Biotechnology Information)- Drug testing: technical complication of a complex social issue.

{4} Alfredo Fabrizio Lo Faro ,Diletta Berardinelli ,Giorgia Sprega,Anastasio Tini, Jeremy Carlier,Tivadar Farkas, Francesco Paolo Busardo, Bezhan 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-.

{5} United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC)- World Drug Report 2022, Methodological Annex, Research an Trend Analysis Branch UNODC, Vienna. © United Nations, June 2022.

{6} John Snowdon - Drug overdose death rates in different countries: Who should be alarmed , Sydney University, Concord Hospital General Hospital, Sydney, NSW, Australia, 2022.

{7} National Institute on Drug Abuse-NIDA, Trends & Statistic, Drug Overdose death rates, February 9, 2023.

{8} official website of ESPAD, 2019 წლის სტატისტიკა.

{9} ბესელია ა. გეგენავა, ვ. კირთაძე, ი. მღებრიშვილი, თ. ოთიაშვილი, დ. რაზმაძე, მ. სტურუა, ლ.ქუთელია, ლ. ჯავახიშვილი - ნარკოვითარება საქართველოში 2018, თბილისი 2019.

{10} Amy Griffin , Julianne Henry , K. Paul Kirkbride , Ben Painter , Adrian Linacre - A survey of the effects of common illicit drugs on forensic DNA analysis ,Forensic Science International, July 2022.

{11} Xiaogang Qu , Jonathan B. Chaiers- Analysis of drug- DNA binding data, 7 January 20004. Journal ELSEVIER.

{12} Drug Testing- Gerald F. O'Malley , DO, Grand Strand Regional Medical Center; Rika O'Malley , MD, Grand Strand Medical Center Reviewed/Revised Dec 2022

{13} Karen E. Moeller, Kelly C. Lee And Julie C. Kissack - Urine Drug Screening: Practical Guide for Clinicians, Pharmd, Bcpp- 2008.

{14} International Council For Harmonisation Of Technical Requirements For Pharmaceuticals For Human Use Ich Harmonised Guideline Analytical Procedure Developmen Q14 Draft version,Endorsed on 24 March 2022

{15} United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC)- Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens, UNITED NATIONS New York, 2009.

{16} Lane Harper, Jeff Powell & Em M. Pijl- An overview of forensic drug testing methods and their suitability for harm reduction point-of-care services. Harm Reduction Journal-volume 14, (2017)

{17} Agilent Technologies Consumer electronics company official website. Agilent.com

{18} გ. ჯიბუტი- ქირალური ნივთიერებების დაყოფის ოპტიმიზაცია მაღალეფექტურ სითხურქრომატოგრაფიაში პოლისაქარიდული ქირალური სტაციონარული ფაზების გამოყენებით

{19} ლ. ჭანკვეტაძე - „სითხური ქრომატოგრაფია“-სალექციო კურსი

{20} მ.რუხაძე -,, ნივთიერებათა ანალიზის ქრომატოგრაფიული მეთოდები'' სალექციო კურსი

{21} Meyer V. R, John Wiley & Sons- Practical High-Performance Liquid Chromatography, 2004.

{22} . Snyder L. R., Kirkland J. J. and Glajch J. L -Practical HPLC Method Development, New York, Wiley-Interscience, 2nd ed., 1997.

{23} რუსუდან კაკავა- ახალი ქირალური სულფოქსიდების სინთეზი, მათი ენანტიომერების დაყოფა მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის მეთოდით და ქირალური გამოცნობის მოლეკულური მექანიზმების კვლევა, თბილისი 2018.

{24} მ. რუხაძე- სალექციო კურსი: „ნარევთა დაყოფის ინსტრუმენტული მეთოდები“ 2014წ;

{25} თეიმურაზ ანდრონიკაშვილი, კობა ამირხანაშვილი, ნინო ბურკიაშვილი - ქრომატოგრაფიის საწყისები,თბილისი 2006.

{26} Branko Nikolin , Belma Imamović, Saira Medanhodzić-Vuk, Miroslav Sober- High performance liquid chromatography in pharmaceutical analysis, May 2004. (NIH)

{27} J Schmid, K Beschke -The use of high-performance liquid chromatography in biochemical and medical analyses (NIH).

{28} Marco Nestola , Andrea Thellmann- Determination of vitamins D2 and D3 in selected food matrices by online high-performance liquid chromatography-gas chromatography-mass spectrometry (HPLC-GC-MS) , 2014 sep 6. (NIH)

{29} Sasan Jahanshahi , Leila Badiefar , Mahvash Khodabandeh , Mohammad Ali Heidarnia , Bagher Yakhchali - Bioremediation of a salty petrochemical wastewater containing bisphenol A by a novel indigenous Pseudomonas pseudoalcaligenes, 2022 Dec 29 (NIH)

{30} W Franklin Smyth , Peter Brooks- A critical evaluation of high performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry and capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry for the detection and determination of small molecules of significance in clinical and forensic science , 2004 Jun 25.

{31} Heba Shaaban , Tadeusz Górecki - Current trends in green liquid chromatography for the analysis of pharmaceutically active compounds in the environmental water compartments. 2015 Jan (NIH).

{32} Eurofins EAG Laboratories- Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)

{33} მარინა რუხაძე - მას სპექტრომეტრიული მეთოდი (სალექციო კურსი)

{34} Svitlana Rozanova , Katalin Barkovits , Miroslav Nikolov , Carla Schmidt , Henning Urlaub, Katrin Marcus - Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomics,2021.

{35} D I Papac , Z Shahrokh Mass spectrometry innovations in drug discovery and development, 2001

{36} Sungjune Kim , Donghwi Kim , Maeng-Joon Jung , Sunghwan Kim -Analysis of environmental organic matters by Ultrahigh-Resolution mass spectrometry-A review on the development of analytical methods , 2021 Jan

{37}- Zeland Muccio , Glen P Jackson- Isotope Ratio Mass Spectrometry , 2009 Feb.

{38} Róbert Berkecz, Dániel Tanács, Antal Péter, and István Ilisz- Enantioselective Liquid Chromatographic Separations Using Macrocyclic Glycopeptide-Based Chiral Selectors, 2021

{39} Sanganyado , Zhijiang Lu , Wenhua Liu -Application of enantiomeric fractions in environmental forensics: Uncertainties and inconsistencies, 2020

{40} K. Pihlainen, R. Kostiainen, Effect of the eluent on enantiomer separation of controlled drugs by liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection- electrospray ionisation tandem mass spectrometry using vancomycin and native beta-cyclodextrin chiral stationary phases, J. Chromatogr. A 1033 (2004)

{41} 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)