نویسندگان
مریم یوسفی[۱و۳]*
زهرا بهراد[۲و۳]
محمود نادری[۲و۳]
m.yousefi@avicenna.ac.ir

فازهای ساکن کایرال در کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

واژه‌های کلیدی
کروماتوگرافی مایع، فاز ساکن و کایرال

چکیده

فازهای ساکن کایرال بسیاری وجود دارند، اما به‌طور متداول پنج نوع فاز ساکن کایرال در کروماتوگرافی مایع مورد استفاده قرار می‌گیرد. اولین نوع، فازهای ساکن پروتئینی هستند که از اتصال پروتئین‌های طبیعی به سیلیکا به وجود می‌آیند. از آنجایی که پروتئین‌ها دارای تعداد زیادی مراکز کایرال هستند، می‌توانند با مولکول‌های کوچکی که گزینش‌گری کایرالی بالایی دارند، برهم‌کنش ایجاد نمایند.

دومین نوع فازهای ساکن کایرال که پیرکل[۴] پیشگام ساخت آن است، از ترکیبات کایرال با وزن مولکولی پایین که به سیلیکا اتصال یافته‌اند تشکیل شده‌است. هر گروه اتصال یافته تعداد محدودی مرکز کایرال در دسترس دارند اما به علت اندازه کوچک این مولکول‌ها، تعداد زیادی از آن‌ها را می‌توان به سیلیکا متصل ساخت. به همین دلیل نمونه مورد آنالیز با احتمال بالاتری با مراکز کایرال برهم‌کنش انجام می‌دهند. سومین نوع فازهای ساکن پلیمری، فازهای ساکن پلیمری بر پایه سلولز و آمیلوز هستند که توسط اوکاماتو[۵] توسعه یافتند. در این نوع فاز ساکن، گروه‌های برهم‌کنش کننده موردنظر به سلولز اتصال یافته و سپس روی بستر سیلیکا پوشش داده می‌شوند.

چهارمین نوع فازهای ساکن، گلیکوپپتیدهای ماکروسیکلیک هستند که به وسیله آرمسترانگ[۶] معرفی شدند. این نوع فازهای ساکن هم دارای تعداد زیادی مراکز کایرال به همراه حفره‌های مولکولی هستند که مولکول‌های حل شونده می‌توانند وارد آن‌ها شده و با گروه‌های همسایه برهم‌کنش داشته باشند. ویژگی‌های فضایی مولکول حل شونده، درجه ورود مولکول‌ها و متعاقب آن میزان برهم‌کنش را تعیین می‌کند که این عامل بر میزان انرژی برهم‌کنش و بزرگی درجه بازداری تأثیرگذار است. در نهایت، پنجمین گروه فازهای ساکن، فازهای سیکلودکسترینی هستند که چگونگی بازداری آن‌ها مشابه بازداری در کروماتوگرافی گازی است. در کروماتوگرافی مایع، فازهای ساکن سیکلودکسترینی به بسترهایی چون سیلیکا اتصال یافته و با روش مشابه ساخت فازهای معکوس ساخته می‌شوند.

مقدمه

کایرالیته نقش مهمی را در فرآیندهای بیولوژیکی بازی می‌کند و انانتیومرهای یک مولکول بیواکتیو، اغلب اثرات بیولوژیکی مختلفی دارند. برای مثال، همه خواص دارویی یک دارو می‌تواند تنها ناشی از یک انانتیومر باشد و یا هر دو انانتیومر، فعالیت دارویی با کمیت و کیفیت کاملا مشابه داشته باشند. در بعضی موارد نیز، انانتیومرها فعالیت دارویی با کیفیت مشابه اما کمیت متفاوت دارند. از آنجایی که سنتز داروها با روش‌های شیمیایی، مخلوطی از انانتیومرها را ایجاد می‌نماید، ضروری است که میزان ناخالصی ایزومری در ترکیب دارویی فعال به‌صورت دقیق و کمی تعیین گردد. بررسی دقیق خلوص انانتیومری بسیار مهم است زیرا ناخالصی ایزومری ممکن است اثرات سمی یا دارویی ناخواسته‌ای داشته باشد. تعیین ناخالصی انانتیومری ناچیز در نمونه از یک ترکیب دارویی تک انانتیومری در حضور یک دسته از ناخالصی‌هایی که ساختار مشابهی دارند و همچنین در حضور مقدار زیادی از انانتیومر اصلی مورد انتظار، چالشی اساسی است.

در سال ۱۹۶۶ یک گروه از موسسه علمی وایزمن[7] برای نخستین بار، اولین جداسازی موفق انانتیومرها را با استفاده از کروماتوگرافی گازی گزارش دادند. پیشرفت‌های بعدی در کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا[8] باعث پیشرفت بیشتری در این زمینه شد [۱]. امروزه بیش از ۶۰ نوع ستون وجود دارد که توانایی جداسازی انانتیومرها را دارا هستند. چالش بزرگ پیش رو، روش آزمون و خطا برای انتخاب یک ستون خاص برای جداسازی کایرال است.

تشکیل دیاسترومرها برای اهداف کروماتوگرافی می‌تواند به دو روش انجام شود: روش اول، تشکیل دیاسترومرهای ناپایدارکه مابین انانتیومرها و فاز ثابت کایرال (CSP)[9] در طول فرآیند کروماتوگرافی اتفاق می‌افتد که جداسازی مستقیم نامیده می‌شود. روش دوم، تولید دیاسترومرهای پایدار است که از واکنش شیمیایی بین انانتیومرهای مورد نظر و معرف مشتق‌ساز کایرال پیش از کروماتوگرافی به‌وجود می‌آید. چنین فرآیندی، جداسازی غیرمستقیم نامیده می‌شود. جداسازی غیرمستقیم انانتیومرها تنها زمانی که جداسازی مستقیم با شکست مواجه می‌شود، روش مناسبی است.

مسیر استرئوشیمیایی واکنش دو ترکیب کایرال (راسمیک A و راسمیک B) برای ایجاد پیوند کووالانسی بدون تاثیر روی مرکز نامتقارن به‌صورت زیر خواهد بود [۲].

$$[(\pm)\text{-A}] + [(\pm)\text{-B}] \longrightarrow [+\text{A}+\text{B}] + [+\text{A}-\text{B}] + [-\text{A}+\text{B}] + [-\text{A}-\text{B}]$$

اولین و آخرین ترکیب، یک جفت انانتیومر و دومین و سومین ترکیب، جفت انانتیومر دوم را تشکیل می‌دهند. در مقابل، اولین و سومین محصول و دومین و چهارمین محصول هم با یکدیگرجفت‌های دیاسترومر هستند. در یک محیط کایرال هر چهار محصول باید قابل جداسازی باشند. هر چند، به دلیل اینکه دیاسترومرها ویژگی‌های فیزیکی وشیمیایی متفاوتی دارند، کروماتوگرافی غیرکایرال این مخلوط منجر به دو پیک می‌شود.

به‌منظور ایجاد یک محیط کایرال دو راه اصلی وجود دارد که یکی استفاده از فاز متحرک کایرال و دومی استفاده از فاز ساکن کایرال است. در ادامه به اجمال به مزایا و معایب راه نخست پرداخته و استفاده از فاز ساکن کایرال نیز که هدف اصلی این نوشتار است به تفصیل مورد بحث قرار خواهد گرفت.

فازهای متحرک کایرال به‌صورت گسترده در کروماتوگرافی در سال‌های ۱۹۸۰-۱۹۶۰ استفاده شدند. ترکیب‌های فعال که قادر به تشکیل کمپلکس‌های جفت یون فلزی و قفسی بودند به‌منظور ایجاد گزینش‌گری کایرال در کروماتوگرافی فاز معکوس متداول و همچنین کروماتوگرافی فاز نرمال به فاز متحرک در حضور ستون‌های غیرکایرال اضافه شدند.

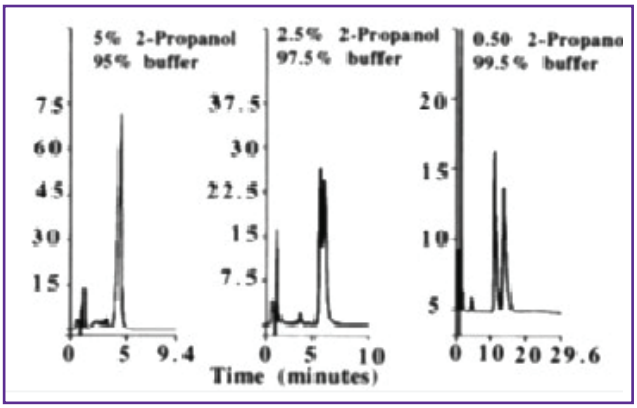
استفاده از فازهای متحرک کایرال معایب و همچنین مزایایی دارد. برای مثال، تعادل‌های چند گانه‌ای که در فاز متحرک و فاز ثابت اتفاق می‌افتد، توضیح سازوکار جداسازی را پیچیده‌تر می‌کند. حضور ماده افزوده شده به فاز متحرک آشکارسازی را دشوار می‌سازد. برای مثال، زمانی که از شناساگر UV استفاده می‌شود، افزاینده‌هایی با جذب UV نسبتا بالا حد تشخیص انانتیومرهای جدا شده را کاهش می‌دهد. علاوه‌بر این، انانتیومرهای تبدیل شده به فرم کمپلکس با لیگاند کایرال وارد سل آشکارساز می‌شود. این کمپلکس‌ها دیاسترومر هستند، بنابراین از نظر میزان جذب و همچنین ویژگی‌های دیگر نیز ممکن است تفاوت داشته باشند. در نتیجه لازم است که برای هر انانتیومر یک منحنی کالیبراسیون جداگانه وجود داشته باشد. از طرف دیگر، استفاده از فاز متحرک کایرال مزایایی نیز دارد که آن را بسیار جذاب می‌کند. بسیاری از افزاینده‌های کایرال به سادگی در دسترس هستند و یا به آسانی سنتز می‌شوند و همچنین می‌توان از فاز ثابت غیرکایرال که به‌صورت چشمگیری از فازهای ثابت کایرال ارزانتر هستند، استفاده نمود. در این روش، فاز متحرک کایرال می‌تواند به آسانی از دستگاه کروماتوگرافی شسته شود و همچنین با یک افزاینده دیگر برای جداسازی‌های بعدی جایگزین شود. فاز متحرک کایرال انعطاف‌پذیری بیشتری نسبت به جداسازی مستقیم در مقایسه با فازهای ثابت کایرال ارائه می‌کند.

فازهای ساکن کایرال

◈ فازهای ساکن پروتئینی

تعدادی فاز ساکن پروتئینی تجاری وجود دارند که برای جداسازی دسته وسیعی از ترکیبات مورد استفاده قرار می‌گیرند. α۱- اسید گلیکوپروتئین که با نام Chiral-AGP فروخته می‌شود، پروتئین بسیار پایداری است که به ذرات سیلیکای دارای قطر ۵μm اتصال یافته است. این فاز ساکن معمولاً با مخلوط دوگانه حلال‌ها که حاوی مقادیر کمی (۱۰ – ۱ درصد) از ۲- پروپانول، اتانول یا استونیتریل هستند، به کار برده می‌شوند. میزان حلال می‌تواند بازداری مطلق انانیتومرها و همچنین گزینش‌گری کایرال را کنترل نماید.

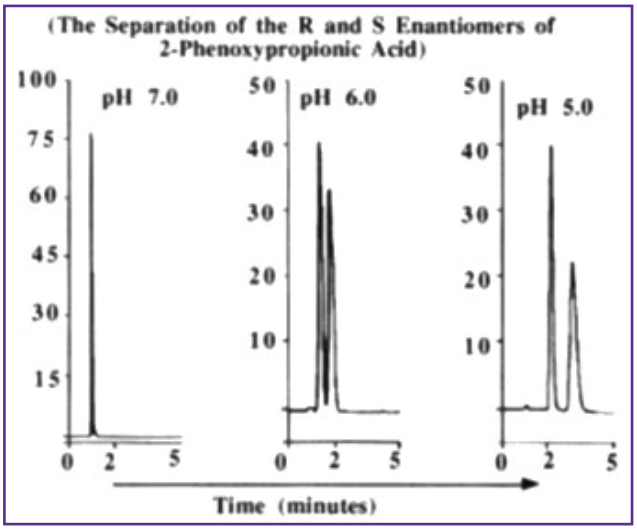
در شکل (۱) مثالی از اثر میزان حلال آلی بر بازداری و گزینش‌پذیری در کروماتوگرافی که جداسازی انانتیومرهای مترو پرولول را نشان می‌دهد، آورده شده‌است. هر قدر که میزان آب بیشتر و میزان حلال آلی کم‌تر باشد، بیشتر برهم‌کنش‌ها قطبی نبوده بلکه هیدروفوبی خواهند بود. همچنین دیده می‌شود که گزینش‌پذیری بیشتر فاز ثابت کایرال ناشی از کاهش مقدار ۲-پروپانول بوده که با افزایش زمان بازداری نیز همراه است و این پدیده به آن معناست که هر قدر انانتیومری بیشتر با فاز ساکن برهم‌کنش داشته باشد به‌صورت خاصی با فاز ساکن، نسبت به ایزومر دیگر خود پیوند برقرار می‌کند.



شکل ۱: اثر میزان حلال آلی بر بازداری و تفکیک انانیتومرهای پرولول روی ستون Chiral-AGP

فاز ساکن مذکور همچنین دارای گروه‌های یونی است که با روش یونی با حل شونده برهم‌کنش می‌کند، مشروط بر آن که pH فاز متحرک معادل pKa گروه‌های یونی تنظیم شود تا گروه‌ها، قابل یونیزه شدن بوده و زوج یون تشکیل ندهند. نقطه ایزوالکتریک AGP معادل ۲/۵ است و نشان‌دهنده آن است که تا pH ۷، بار منفی خواهد داشت. مثالی از تأثیر pH در جداسازی انانیتومرهای ۲-فنوکسی پروپیونیک اسید را در کروماتوگرام شکل (۲) می‌توان مشاهده نمود. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، بازداری مطلق و گزینش‌گری کایرال هر قدر که pH کاسته می‌شود افزایش می‌یابد و تنها ۲ واحد تغییر در pH از شستشوی هم‌زمان دو نمونه به جداسازی با فاکتور جداسازی بسیار بالا منجر می‌شود.

به‌طور کلی ستون‌های Chiral-AGP معمولاً برای جداسازی انانیتومرهای دارای گروه‌های آمین نوع دوم و سوم و ترکیبات دارای اتم نیتروژن در حلقه به کار می‌روند.



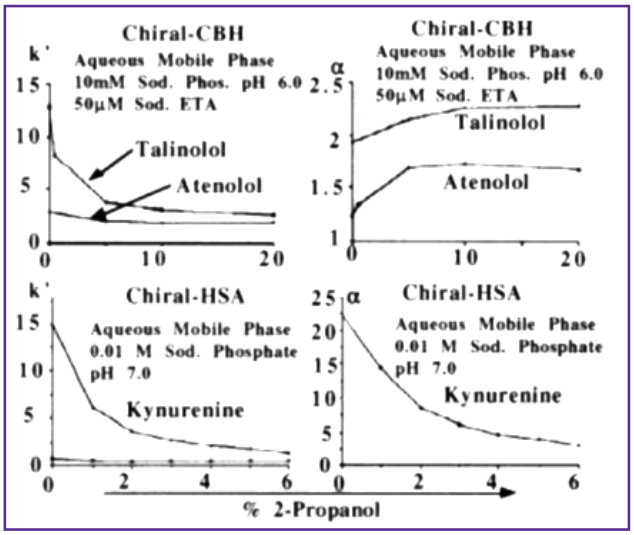
شکل ۲: تأثیر pH بر بازداری و تفکیک انانیتومرهای ۲-فنوکسی پروپیونیک اسید روی ستون Chiral-AGP

پروتئین دیگر با عملکرد مشابه، اوالبومین[۱۰] است که از سفیده تخم‌مرغ به‌دست می‌آید. به‌طور کلی شرایط کار با این نوع ستون‌ها مشابه AGP است، گرچه در برخی موارد تعویض ترتیب شستشوی انانیتومرها گزارش شده‌است. سلوبیوهیدرولاز[۱۱] روی سیلیکاژل تثبیت شده و به‌عنوان فاز ساکن بسیار موثری از آن استفاده می‌شود. این ستون به‌صورت تجاری با نام Chiral-CBH وجود دارد. این نوع ستون‌ها به ویژه برای جداسازی داروهای بازی، جداسازی انانیتومرهای حاوی گروه‌های آمین نوع اول و داروهایی چون نور متانفرین و اکتوپامین مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ستون‌ها با مخلوطی از ۲-پروپانول یا استونیتریل به همراه بافر فسفات به‌عنوان فاز متحرک استفاده می‌شوند. از آنجایی که این ستون‌ها آنزیمی هستند و با فلزات به راحتی تخریب می‌شوند از یک عامل کیلیت کننده مانند اتیلن دی آمین تترا استات برای حذف هرگونه آلودگی فلزی در سیستم باید استفاده نمود. به شیوه مشابه Chiral-AGP بازداری و گزینش‌گری کایرال را می‌توان با pH فاز متحرک و میزان حلال آلی کنترل نمود.

دیگر فاز پروتئینی ساکن، از اتصال آلبومین سرم انسانی به بستر سیلیکا ایجاد می‌شود که این نوع ستون‌ها با نام تجاری Chiral-HSA وجود دارند.

هر سه فاز پروتئینی مذکور به شیوه مشابهی عمل می‌کنند و به‌طور کلی می‌توان گفت گزینش‌گری کایرال و بازداری با استفاده از pH و میزان حلال آلی فاز متحرک کنترل می‌شود. با این وجود گزینش‌گری برای هر زوج انانتیومر، از فاز ساکنی به فاز ساکن دیگر با آن که همه پروتئینی هستند، متفاوت است. این پدیده در شکل (۳) نشان داده شده‌است که بازداری انانیتومرهای تالینولول و آتنولول با افزایش میزان ۲-پروپانول در فاز متحرک کاهش می‌یابد که با در نظر داشتن آن که نیروهای

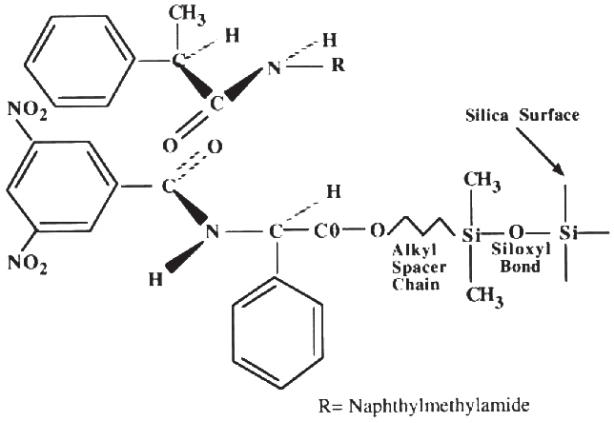
پراکندگی مسئول بازداری هستند، قابل انتظار است. از سوی دیگر، گزینش‌گری کایرال فاز ساکن نسبت به دو انانیتومر با افزایش میزان ۲-پروپانول افزایش می‌یابد. در این مورد واضح است که گزینش‌گری کایرال به علت افزایش نیروهای پراکندگی در برابر ایزومر بیشتر بازداری شده‌است و این پدیده مجدداً نشان می‌دهد که پیش‌بینی درجه گزینش‌گری کایرال در یک ستون کایرال خالص با نمونه‌های ناشناخته مشکل است. مجدداً باید تأکید شود که توجیه علت رفتار جداسازی ویژه، نسبتاً آسان است اما پیش‌بینی آن قبل از جداسازی مشکل است.



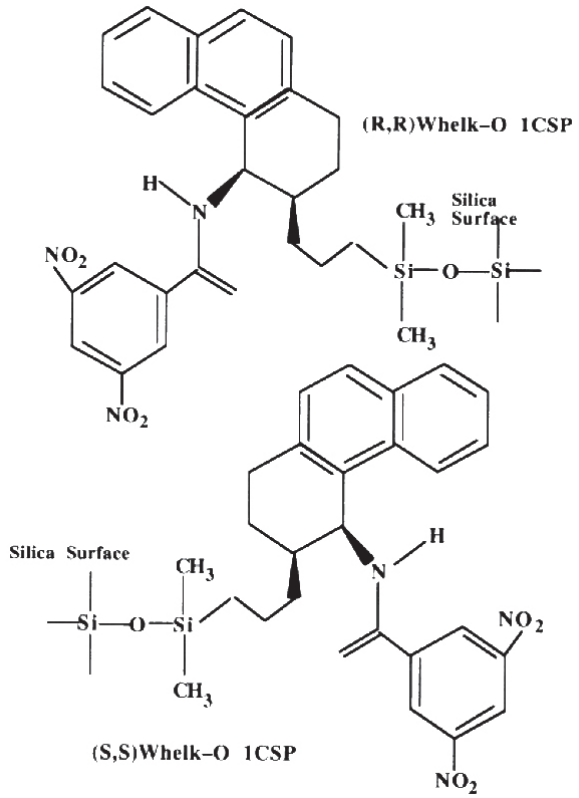
شکل ۳: اثر غلظت ۲-پروپانول روی بازداری و تفکیک انانیتومرهای جداسازی شده با دو فاز ساکن پروتئینی مختلف Chiral-CBH و Chiral-HSA.

◈ فازهای ساکن نوع پیرکل

فازهای ساکن پیرکل فازهایی هستند که در آنها ترکیبات کایرال با وزن مولکولی پایین به سیلیکا متصل شده‌اند، این فازها تعداد محدودی مراکز کایرال دارند اما به علت اندازه کوچک این مولکول‌ها، تعداد زیادی از آن‌ها را می‌توان به سیلیکا متصل ساخت [۳]. تعداد بسیاری از این فازها مورد مطالعه قرار گرفته و در جداسازی انواع مختلف ترکیبات کایرال استفاده شده‌اند. البته این نوع فازهای ساکن مشکلات دیگری نیز دارندکه ناشی از آرایش فضایی خاص مراکز کایرال و دیگر گروه‌های اطراف آن است. فاصله پیوند نسبتاً کوتاه عامل کایرال با سیلیکا، نزدیک شدن برخی از مولکول‌ها را محدود می‌کند؛ بنابراین، مراکز کایرال مولکول‌های موردنظر نمی‌توانند با مراکز کایرال فاز ساکن برهم‌کنش داشته باشند. با این وجود برای برخی مولکول‌های خاص، این آرایش فضایی مساعد است. به‌عنوان مثال، LC-I- و LC-(S- دی نیترو بنزوییل فنیل گلایسین برای جداسازی انانیتومرهای ۱-نفتیل متیل آمید ایبوپروفن به شیوه‌ای که در زیر نمایش داده شده‌است، مناسب هستند. آرایش فضایی اطراف مرکز کایرال نشان‌دهنده آن است که یکی از کنفیگوراسیون‌ها مناسب‌تر از دیگری است.



به‌منظور گسترده نمودن توانایی‌های فلزهای پیرکل، گروه‌های قطبی و گروه‌هایی که قابل قطبی شدن هستند به مولکول‌ها اضافه شدند. متداول‌ترین این نوع فازهای ساکن کایرال، فازهای (R,R) Whelk-01 و (S,S) Whelk-01 هستند. ساختار این فازها در شکل زیر نشان داده شده‌است.

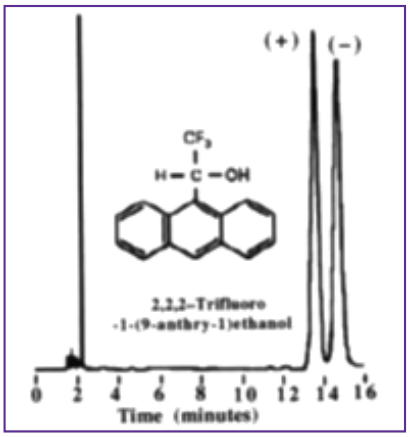


این نوع فازها انعطاف‌پذیرتر بوده و کاربرد وسیع‌تری نسبت به فاز ساکن قبلی دارند. این مولکول‌ها به‌صورت کووالانسی به سیلیکا متصل شده‌اند و تقریباً با همه حلال‌ها قابل استفاده هستند. اما دیده شده‌است، زمانی که در روش فاز نرمال از آن‌ها استفاده می‌شود، عملکرد بهتری دارند. باید در اینجا خاطر نشان نمود که خصلت قطبش‌پذیری حلقه آروماتیک در عملکرد این فاز ساکن تأثیر به‌سزایی دارد.

از آنجا که فازهای ساکن پیرکل در هر دو فرم (R) و (S) وجود دارند، معکوس کردن ترتیب شویش یک جفت انانیتومر امکان‌پذیر است. این فاز ساکن در اصل برای جداسازی انانیتومرهای ناپروکسن

طراحی شده اما به تدریج استفاده زیادی در جداسازی اپوکسیدها، الکل‌ها، دیول‌ها، آمیدها، ایمیدها و کاربامات‌ها پیدا کرده است.

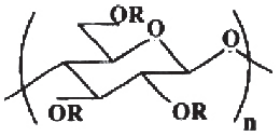
دیگر فاز ساکن پیرکل که قطبیت بسیار بالایی دارد، با روش مشابهی سنتز شده و ساختار آن در زیر نشان داده شده‌است. این فاز ساکن هم بسیار متنوع و هم دارای گروه‌های برهم‌کنش کننده متعددی است که با گروه‌های مجاور مراکز کایرال نمونه مورد آنالیز برهم‌کنش می‌کنند. این فاز ساکن برهم‌کنش قطبی بسیار قوی از طریق گروه کربونیل، گروه آمید و حلقه آروماتیک نیترو دار خود ایجاد می‌کند. این نوع ستون‌ها را هم می‌توان در شرایط فاز نرمال و یا فاز معکوس به کار برد. در شکل (۴) فاز متحرک می‌تواند شامل مخلوط (هگزان / اتانول) برای فاز نرمال و یا (آب / متانول) برای فاز معکوس باشد.



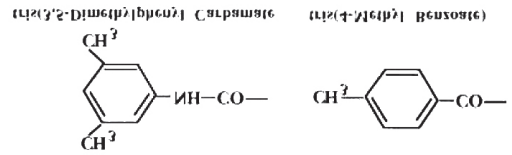
شکل ۴: جداسازی ایزومرهای ۲،۲،۲- تری فلورو -۱-(۹-آنتریل-L)- اتانول روی ستون SUPER COSIL TM LC-I-Phenyl urea در شرایط فاز نرمال

◈ فازهای ساکن بر پایه مشتقات سلولز و آمیلوز

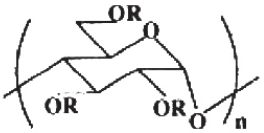
فازهای ساکن سلولزی امروزه در دسترس هستند که روی بسترهای سیلیکایی تثبیت شده و عمدتاً به دو دسته کلی تقسیم‌بندی می‌شوند؛ دسته‌ای که از پلیمرهای سلولزی و دسته‌ای که از پلیمرهای آمیلوزی مشتق شده‌اند. وزن مولکولی آن‌ها تا ۴۰/۰۰۰ دالتون گزارش شده‌است. تفاوت اساسی میان این دو دسته آن است که نوع سلولزی، ساختار خطی دارند در حالی که نوع آمیلوزی ساختار مارپیچی دارند. هر دو نوع سلولزی و آمیلوزی حاوی پنج مرکز کایرال است؛ به همین دلیل این پلیمرها دارای تعداد زیادی از مراکز فعال کایرال هستند و احتمال برهم‌کنش نمونه موردنظر با مراکز کایرال بسیار بالا است. ساختار نوع سلولزی به فرم زیر است:



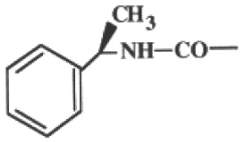
این نوع فازهای ساکن به‌وسیله اوکاماتو توسعه یافته و امروزه دو مشتق اصلی آن (که در زیر ساختار آن‌ها نشان داده شده‌است) استفاده می‌شوند [۴].



هر دو ساختار قادر به برهم‌کنش قطبی هستند؛ به علاوه هسته آروماتیک آنها می‌تواند خصلت قطبش پذیری را فراهم آورد و با هر گروه قطبی موجود در نمونه مورد آنالیز، برهم‌کنش‌های قوی ایجاد نماید. ساختار آمیلوزی تا حدی متفاوت است که در شکل زیر نشان داده شده‌است.



آمیلوز نیز با تریس (۳، ۵-دی متیل فنیل کاربامات) و تریس [(S)— α متیل بنزیل کاربامات] مشتق‌سازی می‌شود.



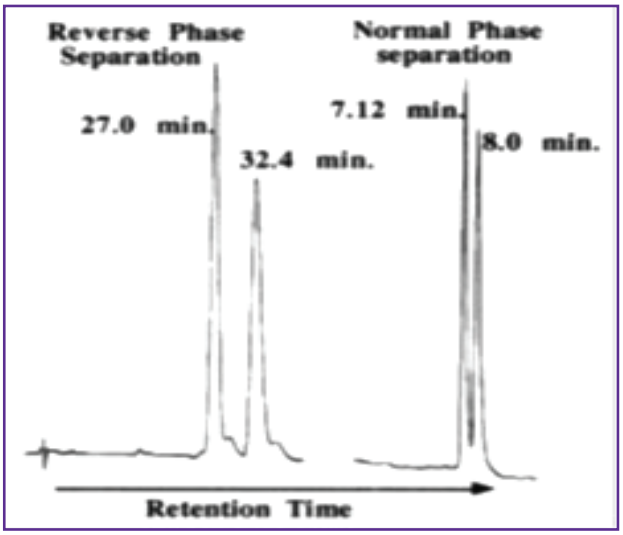
Tris[(S)-α-Methylbenzyl Carbamate]

به دلیل آن که این نوع فازها روی سیلیکا پوشش‌دهی شده و به روش شیمیایی به آن متصل نمی‌شوند محدودیت‌هایی از نظر نوع، سرعت فاز متحرک و دمای اعمال شده وجود دارد. مخلوط هپتان / الکل حلالی است که به‌عنوان فاز متحرک توصیه می‌شود و نشان‌دهنده آن است که عمده نیروهای برهم‌کنش موثر بر بازداری و انتخاب‌گری، قطبی هستند. برای جلوگیری از دنباله‌دار شدن پیک‌ها که از حضور سایت‌هایی با فعالیت بسیار بالا ناشی می‌شود، مقادیر اندک از اسید آلی (تری فلورو استیک اسید) و یا باز آلی (تری اتیل آمین) معمولاً ۰/۱۶ درصد به فاز متحرک افزوده می‌شود و به بلوکه کردن سایت‌های فعال و بهبود تقارن پیک کمک می‌کند. در عمل دیده شده‌است که مشتقات خاص به‌عنوان مثال، تریس (۳، ۵ — دی متیل فنیل کربامات)، مقاومت بیشتری نسبت به انحلال دارند. در نتیجه این فازهای ساکن را می‌توان با مخلوط متانول / آب یا استونیتریل / آب با احتیاط به کار برد. یک نمونه از جداسازی کایرال با شیوه‌های مختلف کروماتوگرافی در شکل (۵) نشان داده شده‌است.

حلال استفاده شده در روش فاز معکوس، بافر آبی / متانول V/V ۶۵/۳۵ و در روش فاز نرمال، اتانول / هگزان V/V ۹۵/۵ بود. همان‌طور که قابل پیش‌بینی است، فاکتور جداسازی (α) در روش فاز معکوس ۱/۲۰ به‌طور قابل ملاحظه‌ای بزرگ‌تر از میزان آن در روش فاز نرمال α=۱/۱۳ است. این پدیده منعکس کننده برهم‌کنش‌های غیرقطبی بیشتر این مشتق نسبت به برهم‌کنش‌های قطبی آن است.

البته این نکته را هم باید مدنظر داشت که تغییر در روش

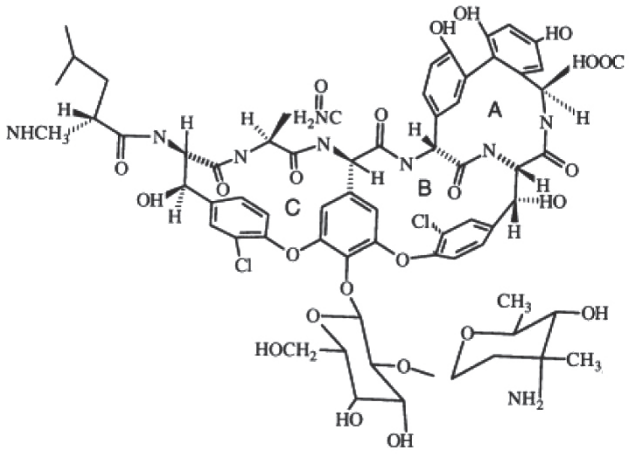
کروماتوگرافی امری برگشت‌پذیر نیست. برای مثال، اغلب امکان‌پذیر است که روش قطبی را به روش کروماتوگرافی معکوس تغییر داد اما معمولاً تبدیل روش مجدد به روش قطبی امکان‌پذیر نیست. دلیل آن نیز برخی تغییرات مورفولوژیکی در فاز ساکن است که گزینش‌گری کایرال را از بین می‌برد.



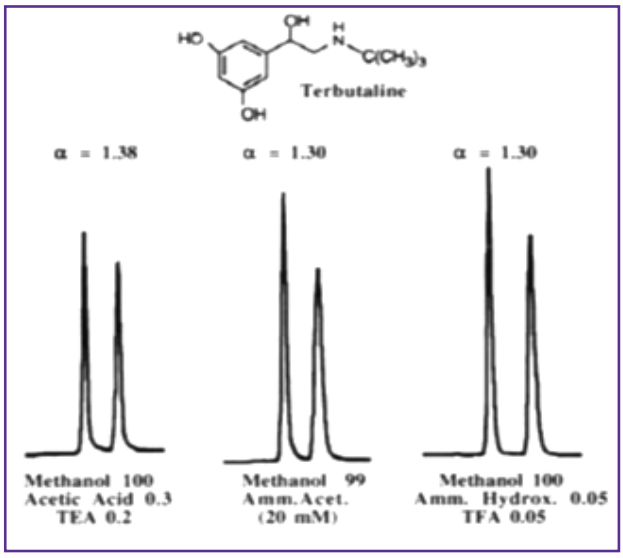
شکل ۵: جداسازی یک زوج انانیتومر روی ستونی با فاز ساکن سلولزی (مشتق‌سازی شده با کاربامات) در هر دو شیوه فاز نرمال و فاز معکوس

◈ فازهای ساکن ماکروسیکلی گلیکو پپتیدی

فازهای ساکن کایرال ماکروسیکلی در ابتدا به وسیله آرمسترانگ معرفی شدند [۵]. یکی از روش‌های ساخت این فازها اتصال کووالانسی وانکومایسین به سطح ذرات سیلیکاژل است. وانکومایسین دارای ۱۸ مرکز کایرال است که سه حفره تشکیل داده‌اند و از طریق پنج حلقه آروماتیک به هم متصل هستند. گروه‌های قویاً قطبی مجاور ساختارهای حلقوی برهم‌کنش‌های قطبی قوی با ماده مورد آنالیز برقرار می‌کنند. این نوع فاز ساکن با فاز متحرک حاوی ۱۰۰-۰ درصد از حلال آلی پایدار است. ساختار وانکومایسین در شکل زیر نشان داده شده‌است. A، B و C حفره‌های نگهداری ماده مورد آنالیز هستند، pKهای وانکو مایسین ۲/۹، ۷/۲، ۸/۶، ۹/۶، ۱۰/۴ و ۱۱/۷ و نقطه ایزو الکتریک آن ۷/۲ است.



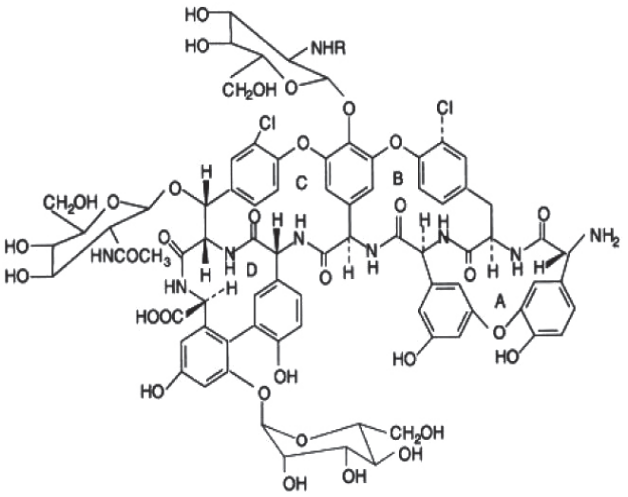
وانکومایسین یک فاز ساکن کایرال بسیار پایدار است که ظرفیت نمونه نسبتاً بالایی دارد؛ زمانی که به سطح سیلیکاژل متصل می‌شود با فازهای متحرک که حاوی درصد آب بالایی هستند و همچنین با فاز معکوس و یا با حلال‌های آلی که درصد بالایی دارند، به‌عنوان یک فاز ساکن قطبی قابل استفاده است. به‌عنوان مثال، زمانی که به‌صورت فاز معکوس استفاده می‌شود، مخلوط قطبی آب / THF فاز متحرک بسیار موثری است. برعکس زمانی که از فاز ساکن قطبی استفاده می‌شود، مخلوط n-هگزان / اتانول مناسب است. وانکومایسین دارای تعدادی گروه قابل یونیزه شدن است که باعث می‌شود در محدوده pHهای مختلفی (pH۴ تا pH۷) گزینش‌گری کایرال داشته باشد. بافرهای آمونیوم نیترات، تری اتیل آمونیوم استات و سدیم سیترات همگی با این فاز عملکرد رضایت‌بخشی داشته‌اند. به غیر از کنترل pH، اثر نوع بافر تأثیر کم یا بسیار ناچیزی بر گزینش‌گری کایرال دارد. این مسئله را می‌توان در کروماتوگرام نشان داده شده درشکل (۶) مشاهده نمود که برای همه بافرها صرف‌نظر از ماهیت شیمیایی بافر، گزینش‌گری کایرال یکسانی به‌دست می‌آید.



شکل ۶: جداسازی ایزومرهای تربوتالین با استفاده از بافرهای مختلف

در این نوع فازهای ساکن، حفره‌ها، کم عمق‌تر از حفرهای موجود در سیکلو دکسترین‌ها بوده بنابراین، برهم‌کنش‌ها ضعیف‌تر هستند. البته این امر باعث تبادل سریع‌تر نمونه میان فازها و کارایی بهتر ستون می‌شود.

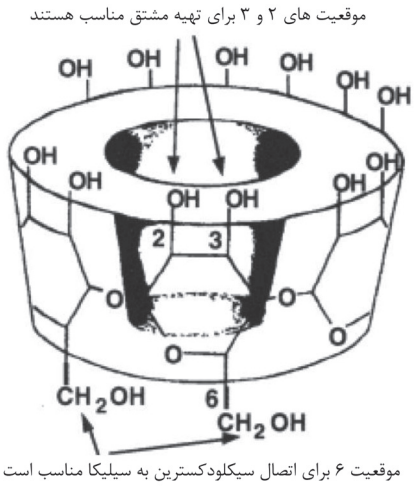
از دیگر گلیکوپپتید ماکرولیتیک که در کروماتوگرافی کایرال استفاده می‌شود گلیکوپپتید آمفوتری تئی‌کوپلانین[۱۲] است که به‌صورت تجاری با نام CHIROBIOTIC T موجود است. این ترکیب نیز به ذرات سیلیکاژل با قطر ۵μm با پیوند کووالانسی متصل می‌شود. تئی کوپلانین ۲۰ مرکز کایرال و چهار حفره دارد. گروه‌های همسایه به شدت قطبی هستند و حلقه آروماتیک، قطبش پذیری را فراهم می‌آورد. ساختار تئی‌کوپلانین در شکل زیر نشان داده شده‌است.



این فاز ساکن، مکمل فاز وانکومایسین است و با همان فازهای متحرکی که قبلاً ذکر شد، قابل استفاده است. این احتمال هم وجود دارد که در مورد یک ترکیب خاص یک فاز گزینش‌گری کایرال فراهم آورد در حالی که دیگری غیرگزینشگر باشد.

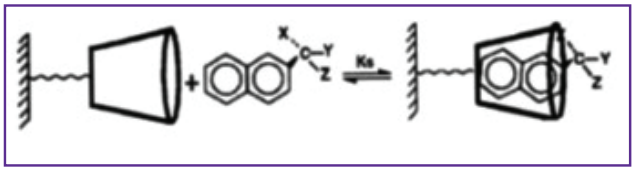
◈ فاز های ساکن سیکلو دکسترینی

سه نوع سیکلودکسترین α، β و γ و یا مشتقات اتصال یافته آن‌ها به سیلیکا در کروماتوگرافی مایع مورد استفاده قرار می‌گیرند. ساختار سیکلودکسترین در شکل زیر نمایش داده شده‌است.



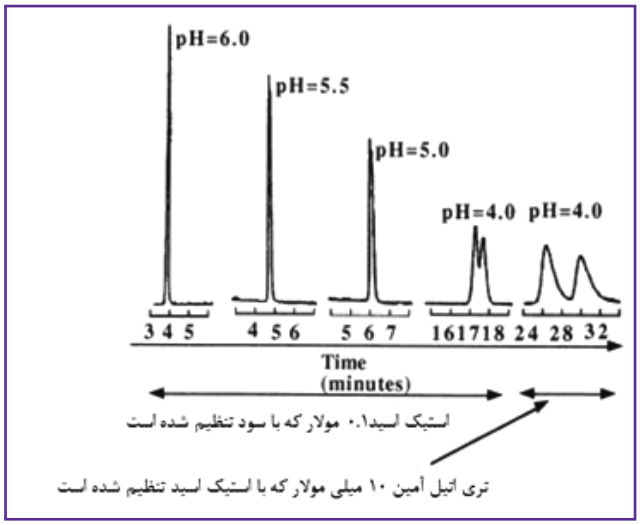
یک یا هر دو گروه‌های کربوکسیل نوع اول (موقعیت ۶) را می‌توان برای اتصال سیکلودکسترین به سیلیکا مورد استفاده قرار داد. گروه‌های هیدروکسیل نوع دوم (موقعیت‌های ۲ و ۳) را می‌توان به‌طور گزینشی مشتق‌سازی نمود، به‌طور معمول ابتدا موقعیت (۲) و سپس موقعیت (۳) مشتق‌سازی می‌شود.

تعداد متنوعی از مشتقات سیکلودکسترین برای ایجاد انواع خاص و افزایش گزینش‌گری کایرال سنتز گردیده‌اند. داده‌های X-ray نشان‌دهنده آن است که ساختارهای β و γ صلب هستند در حالی که ساختار α مقداری انعطاف‌پذیرتر است. بنابراین، مولکول‌های حل‌شونده اگر از لحاظ فضایی ساختار مناسبی داشته باشند می‌توانند از طریق نیروهای پراکندگی یا یونی با گروه‌های همسایه نزدیک خود برهم‌کنش داشته باشند. وارد شدن یک حل شونده درون ساختار سیکلودکسترین در شکل شماره (۷) نشان داده شده‌است. تفاوت ساختار فضایی دو ایزومر منجر به گزینش‌گری متفاوت می‌شود.



شکل ۷: دیاگرامی که چگونگی ورود مولکول حل‌شونده درون ساختار سیکلودکسترین را نشان می‌دهد.

سیکلودکسترین‌ها می‌توانند غلظت بالای بافر را تحمل نموده و در ناحیه pH ۳ تا ۱۴ پایدار باشند. اما از آنجایی که سیلیکا در pHهای بالاتر از ۸، محلول است پایداری ماتریکس سیلیکا، پایداری فازهای سیکلودکسترینی را به محدوده ۳ تا ۷ محدود می‌سازد. فازهای ساکن سیکلودکسترینی در هر دو روش کروماتوگرافی فاز نرمال و یا معکوس مورد استفاده قرار می‌گیرند. همانند فازهای ساکن کایرال دیگر، برهم‌کنش‌های غیرقطبی با ساختارهای سیکلودکسترینی را می‌توان با استفاده از حلال‌های قطبی و برهم‌کنش‌های قطبی را با حلال‌های غیرقطبی کنترل نمود. درصورت حضور برهم‌کنش‌های یونی نیز می‌توان مقدار آن‌ها را با pH و نوع بافر کنترل نمود. تغییرات اندک در pH و تغییر نوع بافر می‌تواند بسیار تعیین کننده باشد. مثالی از اثر تغییرات pH و نوع بافر بر جداسازی انانتیومرهای یکی از مشتقات D، L- فنیل آلانین در شکل (۸) آورده شده است.



شکل ۸: اثر pH و نوع بافر برگزینش‌گری کایرال

همان‌گونه که مشاهده می‌شود تغییر pH از ۵ به ۴ باعث افزایش قابل ملاحظه گزینش‌گری کایرال شده‌است. با تغییر نوع بافر از اسید استیک که pH آن با سود تنظیم شده به بافر تری اتیل آمینی که با استیک اسید تنظیم شده است، تغییر قابل ملاحظه ای در تفکیک دو انانتیومر رخ می دهد و این تغییر منجر به تفکیک

کامل دوانانتیومر می شود. البته باید این مسئله را هم در نظر داشت که زمان بازداری از ۱۸ دقیقه به ۳۲ دقیقه افزایش یافته است که نشان‌دهنده آن است که برهم‌کنش میان حل‌شونده و فاز ساکن قوی‌تر و برهم‌کنش میان حل شونده و فاز متحرک ضعیف‌تر شده‌است.

نتیجه‌گیری

یکی از تخصصی‌ترین زمینه‌های کروماتوگرافی، جداسازی انانتیومرهاست. امروزه فازهای ساکن کایرال متنوعی در اختیار پژوهشگران است که بنا به نوع ترکیب مورد آنالیز و برهمکنش‌هایی که با فاز ساکن خواهد داشت انتخاب می‌گردند. پنج نوع فاز ساکن کایرال به صورت متداول در کروماتوگرافی مورد استفاده قرار می‌گیرند که عبارتند از فازهای پروتئینی، پیرکل، پلی ساکاریدی، گلیکوپپتیدی و سیکلودکسترینی.

فازهای ساکن پروتئینی گزینش‌گری بالایی داشته و دسته وسیعی از مواد را جداسازی می‌کنند و از آنجا که با فازهای متحرک آبی قابل استفاده هستند برای نمونه های بیولوژیکی استفاده می‌شوند اما بسیار حساس بوده، ظرفیت نمونه کمی داشته و باید با دقت بالایی مورد استفاده قرار گیرند تا طول عمر مناسبی داشته باشند. جداسازی در ستون‌های نوع پیرکل اغلب با فازهای متحرک غیرقطبی و یک حلال قطبی برای اصلاح قطبیت انجام می‌شود. ساختار، نوع، قطبیت و غلظت حلال اصلاح کننده قطبیت اثر بسیار زیادی بر جداسازی دارد. اساس جداسازی در این فازها برهمکنش‌های π-π، پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش‌های دو قطبی-دو قطبی است. ستون‌های پلی ساکاریدی کاربرد وسیع، کارآیی بسیار خوب و ظرفیت نمونه بالایی دارند و در جداسازی‌های تهیه‌ای نیز می‌توان از آن‌ها استفاده نمود. ستون‌های گلیکوپپتیدی از اتصال یک گلیکوپپتید به ذرات سیلیکاژل ساخته شده و ظرفیت نمونه نسبتاً بالایی نیز دارند. ستون‌های سیکلودکسترینی را می-توان با همه انواع حلال‌ها مورد استفاده قرار داد و همچنین در کاربردهای تهیه‌ای نیز قابل کاربرد هستند. از آنجا که با حلال‌های آبی نیز سازگار هستند برای آنالیز نمونه‌های بیولوژیکی مناسب هستند.

پی‌نوشت

۱. دکتری شیمی آلی، مرکز تحقیقات ریز فناوری زیستی، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن‌سینا

۲. کارشناس ارشد شیمی آلی، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

۳. عضو کارگروه تخصصی کروماتوگرافی شبکه آزمایشگاهی فناوری‌نانو

4. Pirkle

5. Okamato

6. Armstrong

7. Weizmann

8. High-performance liquid chromatography (HPLC)

9. Chiral stationary phase

10. Ovalbumin

11. Cellobiohydrolose

12. Teicoplanin

مراجع

[1] E. Gil-Av, B. Feibush, and R. Tetrahedron Lett. 7 (1966), 1009.

[2] J. Gal, Indirect methods for the chromatographic resolution of drug enantiomers, in I.W.Wainer (ed.), Drug Stereochemistry Analytical Methods and Pharmacology, Marcel Dekker, New York, 1993, pp. 65–106.

[3] W. H. Pirkle and D. W. House, J. Org. Chem., 44(1979)1957.

[4] Y. Okamato, Chem. Lett., (1986)1237.

[5] D. W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill, and J. R. Chen, Anal. Chem., 66(9) (1994)1473.