



УДК 577.175.859'17

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ПРОСТАГЛАНДИНА E*Левченко Н. К., Торгов И. В., Мифтахов М. С.*,
Толстиков Г. А.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва;*** Институт химии Башкирского филиала Академии наук СССР, Уфа*

Работа посвящена хроматографическому разделению низкомолекулярных биорегуляторов — простагландинов, полученных синтетическим путем. Проанализировано около 30 различных образцов. На основе полученных данных выработаны практические рекомендации по использованию высокоэффективной жидкостной хроматографии для препаративного разделения изомеров и энимеров синтетических простагландинов в количестве до 300 мг.

За последние 10–15 лет методу высокоэффективной жидкостной хроматографии простагландинов посвящено большое количество работ, которые описывают в основном методики идентификации простагландинов в крови, изменение состава простагландинов в биологических жидкостях (количественный анализ содержания простагландинов в крови, изменение состава простагландинов в процессе их метаболизма в организме и т. д.) [1]. Так как природные простагландины не имеют хромофорных групп, позволяющих осуществлять их УФ-детектирование, хроматографические методы выделения и идентификации этих соединений чрезвычайно разнообразны и сложны, включают получение различных производных, анализ модельных смесей соединений и т. п.

Известно, например, разделение смесей простагландинов в виде *n*-бром- и *n*-нитрофенациловых эфиров, 7-метоксикумаринов, 9-антрацилкарбоксииэфиров [2]. Описано разделение смесей геометрических изомеров простагландинов по C8-положению (α - и β -изомеры), а также разделение по 15-гидроксигруппе [3]. Ряд авторов использует метод ВЭЖХ для разделения меченных тритием простагландинов [4].

Эти методы требуют проведения дополнительной химической модификации вещества, что сопровождается потерей некоторого количества исследуемого образца. Большинство определений проводится на уровне 20–100 нг вещества, что чрезвычайно трудоемко в препаративном варианте [5]. В литературе не встречается примеров проведения ВЭЖХ простагландинов в препаративных масштабах, что необходимо для химико-биологических и медицинских исследований.

Настоящая работа посвящена препаративной ВЭЖХ аналогов простагландина E, полученных синтетическим путем, очистке их от сопутствующих примесей и разделению на α - и β -изомеры по C8-положению и на энимеры по 15-гидроксиогруппе.

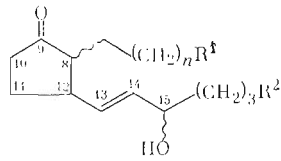
В работе достигнуто разделение лейкотриенов — синтетических предшественников простагландинов — со степенью чистоты не менее 98–99%.

Строение изомеров и энимеров (а также их идентификация в хроматографии) установлено по данным физико-химического анализа: УФ-, ИК-, ЯМР-, масс-спектрометрией и данными КД [6].

Большинство изученных нами образцов можно представить в виде общих формул аналогов простагландина E (I) — (XXV) и его предшествен-

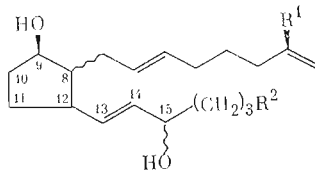
Сокращения: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография, ТСХ — тонкослойная хроматография. Условно использована номенклатура и нумерация атомов, принятая для простагландина E.

пиков — лейкотриенов (XXVI), (XXVII):



1-XXIII

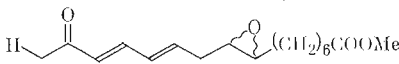
- | | |
|---|--|
| I: R ¹ =COOBu, R ² =n-OC ₆ H ₄ F, n = 5 | XV: R ¹ =COOH, R ² =Me, n = 8 |
| II: R ¹ =COOBu, R ² =n-OC ₆ H ₄ CF ₃ , n = 5 | XVI: R ¹ =COOH, R ² =Me, n = 10 |
| III: R ¹ =COOEt, R ² =n-OC ₆ H ₅ , n = 5 | XVII: R ¹ =COOH, R ² =Me, n = 12 |
| IV: R ¹ =COOEt, R ² =n-OC ₆ H ₄ Cl, n = 5 | XVIII: R ¹ =COOH, R ² =n-OC ₆ H ₄ F, n = 8 |
| V: R ¹ =COOEt, R ² =n-OC ₆ H ₄ F, n = 5 | XIX: R ¹ =COOH, R ² =n-OC ₆ H ₄ F, n = 10 |
| VI: R ¹ =H, R ² =n-OC ₆ H ₅ , n = 8 | XX: R ¹ =COOH, R ² =n-OC ₆ H ₄ F, n = 12 |
| VII: R ¹ =H, R ² =n-OC ₆ H ₄ F, n = 8 | XXI: R ¹ =COOH, R ² =n-OC ₆ H ₄ CF ₃ , n = 8 |
| VIII: R ¹ =H, R ² =n-OC ₆ H ₄ CF ₃ , n = 8 | XXII: R ¹ =COOH, R ² =n-OC ₆ H ₄ CF ₃ , n = 10 |
| IX: R ¹ =H, R ² =Me, n = 8 | XXIII: R ¹ =COOH, R ² =n-OC ₆ H ₄ CF ₃ , n = 12 |
| X: R ¹ =H, R ² =Me, n = 10 | |
| XI: R ¹ =H, R ² =Me, n = 12 | |
| XII: R ¹ =COOMe, R ² =Me, n = 8 | |
| XIII: R ¹ =COOMe, R ² =Me, n = 10 | |
| XIV: R ¹ =COOMe, R ² =Me, n = 12 | |



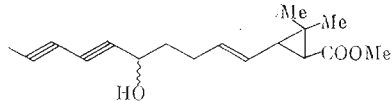
XXIV, XXV

XXIV: R¹=H, R²=Me

XXV: R¹=Me, R²=Me



XXVI



XXVII

Выбор оптимальных условий препаративного разделения методом ВЭЖХ упрощается, если предварительно получены данные ТСХ образцов в различных элюирующих системах, определены с помощью аналитической ВЭЖХ компонентный состав образца и содержание в нем примесей.

Были установлены существенные различия данных ТСХ на пластинках Silufol UV₂₅₄ и на пластинках Kieselgel F₂₅₄ (см. таблицу); в свою очередь исследование образца в прямо-фазовой и обращенно-фазовой хроматографии в разных элюирующих системах позволяет выбрать такие условия, которые обеспечивают выделение и одновременное разделение на изомеры и эпимеры со степенью чистоты 98–99% на уровне 0,2–0,3 г (рис. 1–3) и за короткий промежуток времени (не более 0,5 ч).

Обращенно-фазовая хроматография простагландинов в большей мере подходит для аналитических определений, так как требует использования водных элюентов, которые затруднительно удаляются из фракций, что может сопровождаться разложением вещества.

ВЭЖХ большинства соединений (I)–(XIV), кроме свободных кислот и диолов (XV)–(XVII), (XXIV), (XXV), а также синтетических лейкотриенов (XXVI), (XXVII), проводилась на высокоэффективных колонках при изократическом элюировании смесью этилацетата в петролейном эфире (рис. 4–6) либо в режиме градиентного элюирования водным метанолом. При ВЭЖХ феноксипроизводных использовали УФ₂₅₄-детектирова-

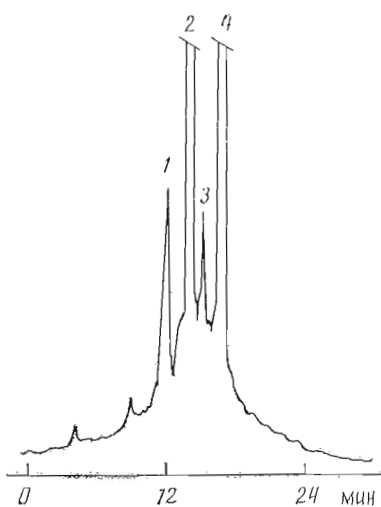


Рис. 1

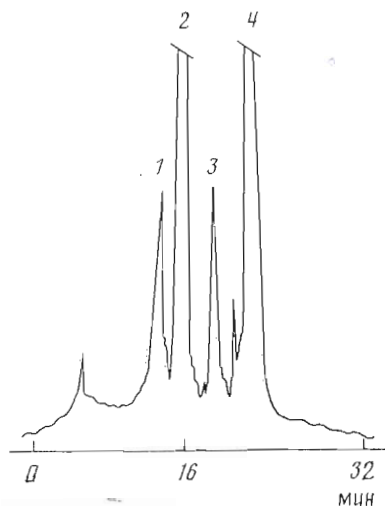


Рис. 2

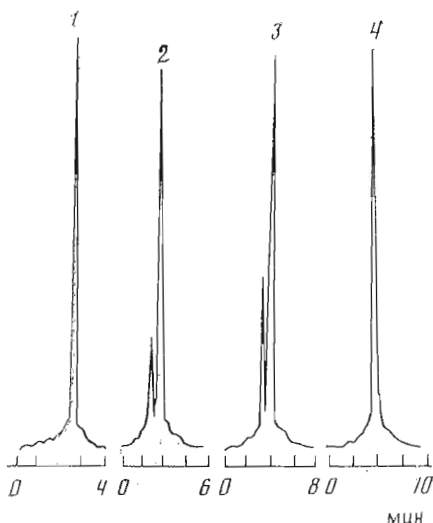


Рис. 3

Рис. 1. Preparative ВЭЖХ бутилового эфира (I) на колонке Lichrosorb Si60 в системе этилацетат – петролейный эфир (35:65). 2, 4 – эпимеры по 15-гидроксигруппе; 1, 3 – α - и β -изомеры

Рис. 2. Preparative ВЭЖХ бутилового эфира (I) на колонке Zorbax Sil в системе этилацетат – петролейный эфир (35:65). Обозначения те же, что и на рис. 1

Рис. 3. Аналитический контроль чистоты выделенных фракций 1–4 бутилового эфира (I) (см. рис. 2). Условия: см. таблицу и «Экспер. часть»

пие. Вещества, не содержащие хромофорных групп, разделены аналогичным образом, но с использованием рефрактометрической детекции.

Разделенные вещества, степень чистоты которых оказалась по данным аналитической ВЭЖХ ниже 98%, рехроматографировали в менее полярной системе на тех же колонках.

Результаты ТСХ и ВЭЖХ изученных синтетических простагландинов и лейкотриенов представлены в таблице.

В результате проделанной работы впервые методом ВЭЖХ было осуществлено preparative разделение синтетических простагландинов на α - и β -изомеры и на эпимеры по 15-гидроксигруппе с высокой степенью чистоты (98–99%) и в значительных количествах (до 300 мг).

Для каждой группы изучаемых образцов – свободных кислот, их трифторфенокси-, хлорфеноксиэфиров, диолов, лейкотриенов – выбраны оптимальные условия ВЭЖХ, которые позволяют быстро и без потерь получить нужное соединение.

Экспериментальная часть

В работе использованы простагландины и лейкотриены, синтезированные по описанной ранее методике [6]. Использованные растворители марки ч.д.а. (Союзреактив) подготавливали по методикам [7], хранили над молекулярными ситами 4А. ТСХ проводили на пластинках Silufol UV₂₅₄ (Kavalier, ЧССР) и Kieselgel F₂₅₄

ТСХ и ВЭЖХ синтетических простагландинов и лейкотриенов *

| Образец | Silufol UV ₂₅₄ | R _f наблюдаемых пятен на пластинках Kieselgel F ₂₅₄ | Система растворителей | Условия ВЭЖХ | |
|----------|---------------------------|---|-----------------------|---------------|---------------|
| | | | | аналитической | препаративной |
| I | 0,43; 0,32 | 0,43; 0,32; 0,28 | а | А, а | Б, б ** |
| II | 0,40; 0,35 | 0,41; 0,30; 0,20 | а | А, а | Б, б ** |
| III | 0,35; 0,27 | 0,37; 0,29; 0,18 | а | А, а | Б, а ** |
| IV | 0,41; 0,33 | 0,43; 0,37; 0,29 | а | А, а | В, б ** |
| V | 0,40; 0,31 | 0,45; 0,36; 0,27 | а | А, а | В, а ** |
| VI | 0,42; 0,31 | 0,43; 0,27; 0,17 | в | А, а | В, б ** |
| VII | 0,42; 0,28 | 0,45; 0,29; 0,25 | в | А, а | В, в; Б, а ** |
| VIII | 0,45; 0,38 | 0,47; 0,35; 0,29 | в | А, а | Б, а; Б, б ** |
| IX | 0,20; 0,18 | 0,22; 0,18; 0,16 | г | А, г; Г, д | В, г ** |
| X | 0,17; 0,16 | 0,20; 0,18; 0,15 | г | А, г; Г, д | В, г ** |
| XI | 0,20; 0,17 | 0,22; 0,19; 0,16 | г | А, г; Г, д | В, г ** |
| XII | 0,68 | 0,70 | м | Г, и | Д, д *** |
| | 0,42 | 0,35 | в | | |
| XIII | 0,70 | 0,71 | м | Г, и | Д, д *** |
| | 0,40 | 0,33 | в | | |
| XIV | 0,69 | 0,70 | м | Г, и | Д, д *** |
| | 0,45 | 0,42 | в | | |
| XV | 0,37 | 0,37 | в | А, л; Г, и | Д, д *** |
| XVI | | | | | |
| β-изомер | 0,34 | 0,33 | в | А, л; Г, и | Д, д *** |
| α-изомер | 0,34; 0,24 | 0,30; 0,22 | в | А, л; Г, и | Д, д *** |
| XVII | | | | | |
| β-изомер | 0,34 | 0,34 | в | А, л; Г, и | Д, д *** |
| α-изомер | 0,41; 0,33 | 0,33; 0,24 | в | А, л; Г, и | Д, д *** |
| XVIII | 0,42; 0,31 | 0,45; 0,37 | а | А, л; Г, и | Д, д *** |
| | 0,65; 0,50 | 0,67; 0,55 | л | | |
| XIX | 0,50; 0,38 | 0,51; 0,40 | а | А, л | Д, д ** |
| | 0,70; 0,66 | 0,72; 0,61 | л | | |
| XX | 0,51; 0,39 | 0,47; 0,38 | а | А, л | Д, д ** |
| | 0,67; 0,64 | 0,51; 0,40 | л | | |
| XXI | 0,47; 0,25 | 0,48; 0,36 | а | Г, ж | Д, д ** |
| | 0,70; 0,63 | 0,71; 0,62 | л | Г, ж | Д, д ** |
| XXII | 0,45; 0,33 | 0,49; 0,31 | а | Г, ж | Д, д ** |
| | 0,71; 0,65 | 0,70; 0,60 | л | | |
| XXIII | 0,49; 0,31 | 0,50; 0,41 | а | Г, ж | Д, д ** |
| | 0,70; 0,42 | 0,67; 0,38 | л | | |
| XXIV | 0,40; 0,25; 0,20 | 0,58; 0,42; 0,25 | в | А, г; Г, д | Д, е ** |
| | 0,40; 0,30 | 0,41; 0,32; 0,28 | е | | |
| XXV | 0,20; 0,10 | 0,21; 0,12 | в | А, г; Г, д | В, е ** |
| | 0,40; 0,31 | 0,44; 0,32; 0,23 | е | | |
| XXVI | 0,42; 0,31 | 0,45; 0,37 | а | Г, ж; А, з * | |
| | 0,30; 0,08 | 0,35; 0,03 | и | | |
| | 0,60; 0,40 | 0,67; 0,32 | к | | |
| XXVII | 0,42; 0,31 | 0,45; 0,37 | а | Г, ж; А, з * | |
| | 0,65; 0,50 | 0,67; 0,55 | л | | |

* Хроматографические системы: а — этилацетат — петролейный эфир (35 : 65), б — этилацетат — петролейный эфир (25 : 75), в — этилацетат — петролейный эфир (50 : 50), г — MeOH — петролейный эфир (10 : 90), д — MeOH — вода (45 : 55), е — эфир — гексан (80 : 20), ж — MeOH в воде (градиент) от 5 до 100%, з — этилацетат — петролейный эфир (15 : 85), и — этилацетат — петролейный эфир (10 : 95), к — MeOH — петролейный эфир (15 : 85), л — MeOH — этилацетат — петролейный эфир (10 : 31,5 : 58,5), м — MeOH — этилацетат — петролейный эфир (15 : 18,85 : 66,15), н — MeOH в воде (градиент) от 50 до 100%. Условия разделения: А — колонка Zorbax Sil, УФ₂₅₄-детектирование; Б — Lichrosorb Si60; В — колонка Reprap Silica; рефрактометрическое детектирование; Г — колонка Zorbax ODS, УФ₂₅₄-детектирование; Д — колонка Lichrosorb RP8, УФ₂₅₄-детектирование. Остальные условия см. в «Экспериментальной части».

** Разделено на α- и β-изомеры и на эписмеры по 15-гидроксигруппе.

*** Разделено только на эписмеры.

(Merck, ФРГ). Обнаружение веществ проводили УФ-детектированием и опрыскиванием 2% спиртовым раствором анисового альдегида.

Аналитическую ВЭЖХ осуществляли на хроматографе, модель 830 (Dupont, США) на колонках Zorbax Sil, Zorbax ODS размером 4,6×250 мм при скорости потока 1,2–1,5 мл/мин с УФ₂₅₄-детектированием.

На том же приборе проводили препаративную ВЭЖХ на колонках Lichrosorb Si60, Lichrosorb RP8 размером 22,7×250 мм при скорости потока 14–17 мл/мин с УФ₂₅₄-детектированием. Пробу вводили в петлю емкостью 1 мл инжектора Rheodyne 7105 (США).

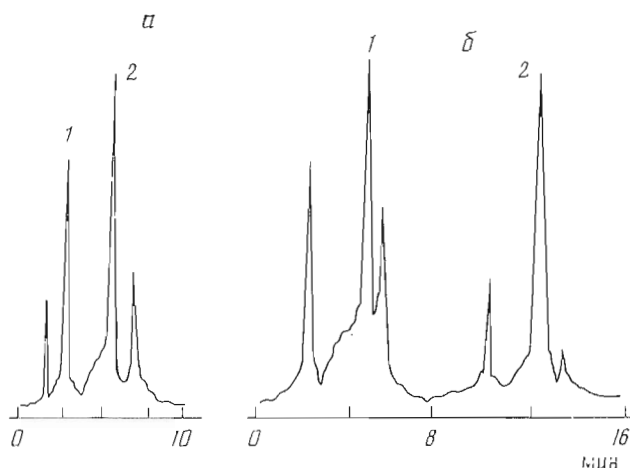


Рис. 4. ВЭЖХ лейкотриена (XXVII) в аналитическом (а) и препаративном (б) варианте. Условия: см. таблицу и «Экспер. часть». 1, 2 – эимеры по 15-гидрокси-группе

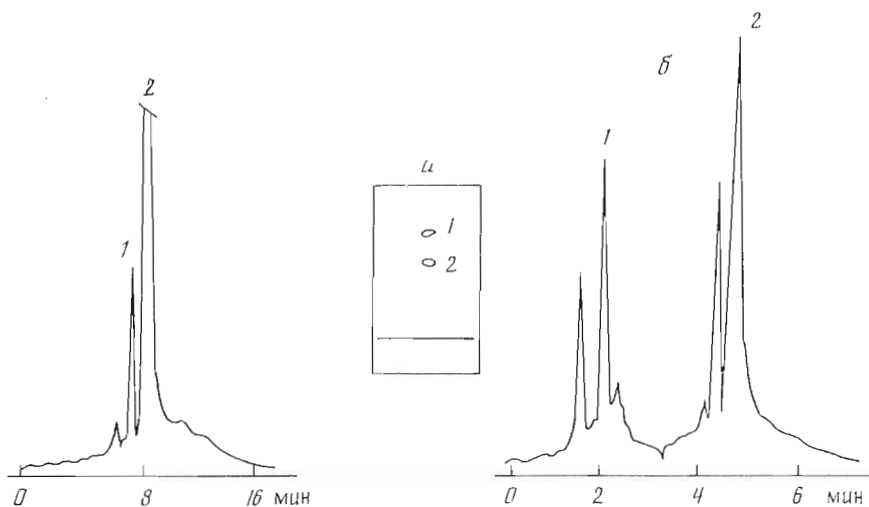


Рис. 5

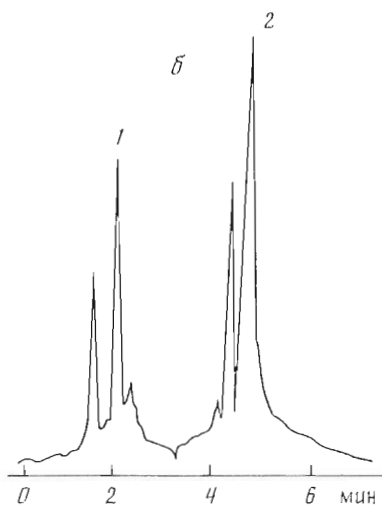


Рис. 6

Рис. 5. Preparative separation of *n*-трифторфеноксикислоты (XXI). Условия: см. таблицу и «Экспер. часть». 1, 2 – эимеры по 15-гидрокси-группе

Рис. 6. Анализ лейкотриена (XXVI) с помощью ТСХ в системе этилацетат – петролейный эфир (5:95) (а) и ВЭЖХ (б). Условия: см. таблицу и «Экспер. часть». 1, 2 – α - и β -эпоксид соответственно

Preparative ВЭЖХ осуществляли на приборе Waters Prep 500 (США) на колонке Reprapak Silica размером 57×300 мм при скорости потока 150–200 мл/мин с рефрактометрическим детектированием и вводом образца шприцем емкостью 10 мл.

После разделения фракции унаживали в вакууме при 20° С и определяли чистоту аналитической ВЭЖХ. Степень чистоты оценивали с помощью интегратора HP 3380 А (Hewlett-Packard, США).

ЛИТЕРАТУРА

1. Carr K., Sweetman B. J., Frölich J. C. // Prostaglandins. 1976. № 11. P. 3–14.
2. Makiko Hatsumi Shin-Ichi Kimata, Koschichiro Hiroso // J. Chromatogr. 1982. V. 253. № 2. P. 271–275.
3. Whorton A. R., Carr K., Smiegel M., Walker L., Ellis K., Oates J. A. // J. Chromatogr. 1979. V. 183. № 3. P. 64–71.
4. Borgeat P., de Lactos F. B., Picard S., Drapeau J., Vallerand P., Corey E. J. // Prostaglandins. 1982. № 23. P. 713–724.

5. Doehl J., Greibrokk T. // J. Chromatogr. 1985. V. 349. № 2. P. 431-435.
6. Данилова Н. А., Мифтахов М. С., Лонги М. И., Милле Ю. С., Толстикова Г. А. // Докл. АН СССР. 1959. Т. 273. № 3. С. 620-622.
7. Физер Л., Физер М. // Реагенты для органического синтеза/Ред. Кнузянц И. Л. М: Мир, 1971. Т. 2. С. 93, 210. Т. 3. С. 154, 310.

Поступила в редакцию
24.X.1986
После доработки
4.III.1987

HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF SYNTHETIC ANALOGUES OF PROSTAGLANDIN E

LEVTCHEIKO N. K., TORGOV I. V., MIFTAKHOV M. S.*, TOLSTIKOV G. A.*

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; * Institute of Chemistry, Bashkirian Department, Academy of Sciences of the USSR, Ufa*

High-performance liquid chromatography was used for separation, identification and purification of synthetic analogues of prostaglandin E, about 30 various samples being analysed. Basing on the data obtained, recommendation are given on the preparative HPLC separation (up to 300 mg scale) of structural isomers and epimers of synthetic prostaglandins.