



УДК 577.543.7

ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В СИНТЕЗЕ ЛЕЙКОТРИЕНОВ  $A_4$  И  $C_4$ 

Галушко С. В., Белик М. Ю., Сорочинский А. Е.,  
Горнилов А. М., Кухарь В. П.

*Институт биоорганической химии Академии наук УССР,  
Киев*

Изучено хроматографическое поведение метиловых эфиров лейкотриенов  $A_4$ ,  $C_4$ , лейкотриена  $C_4$ , некоторых промежуточных и побочных продуктов их синтеза в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. Найдены оптимальные условия хроматографирования.

Лейкотриены — высокоактивные биорегуляторы, интенсивно исследуемые в настоящее время, синтезу которых посвящены обзоры [1–4]. При получении лейкотриенов широко используется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Для выделения метилового эфира лейкотриена  $A_4$  (ЛТА<sub>4</sub>) и его изомеров в основном применялась ВЭЖХ на силикагеле [5–7], лейкотриен  $C_4$  (ЛТС<sub>4</sub>) и изомеры его метилового эфира выделяли в условиях изократической обращенно-фазовой ВЭЖХ. Данные по хроматографированию для метилового эфира ЛТА<sub>4</sub> в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ весьма ограничены, лишь в работе [8] для выделения этого соединения использовалась градиентная ВЭЖХ. Наиболее удобно использование одного вида хроматографии для всех стадий синтеза, причем весьма полезно знать условия как градиентного, так и изократического режимов анализа и выделения требуемых продуктов.

В работах, где указаны условия хроматографирования ЛТС<sub>4</sub> и его метилового эфира, главным образом применялись подвижные фазы (ПФ), содержащие метанол, однако количественные данные о влиянии концентрации этого растворителя в ПФ на удерживание лейкотриенов и сопутствующих им соединений практически отсутствуют. Наличие у ЛТС<sub>4</sub> нескольких функциональных групп, способных к ионизации в пределах рН, используемых в обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ, требует получения зависимостей влияния концентрации ионов водорода в ПФ на удерживание. В настоящее время рН элюентов поддерживается равным 5,3–5,6 [9–10], 4,7 [11], 2,5 [12]; обоснование выбранных величин и пределы возможных отклонений не приводятся. Следует отметить, что применение ВЭЖХ в синтезе лейкотриенов в основном ограничивается анализом и выделением конечных продуктов, в то время как этот метод может быть полезен как при оптимизации других стадий, так и для контроля синтеза и выделения промежуточных продуктов.

Цель настоящей работы — изучение поведения в условиях ОФ-ВЭЖХ метилового эфира ЛТА<sub>4</sub> (IV), ЛТС<sub>4</sub> (VI) и его метилового эфира (V), а также некоторых исходных, промежуточных и побочных продуктов, присутствующих в реакционных смесях при синтезе лейкотриенов; получение некоторых параметров, характеризующих взаимодействие этих соединений с поверхностью гидрофобного сорбента; определение оптимальных условий хроматографирования изученных веществ при помощи ОФ-ВЭЖХ.

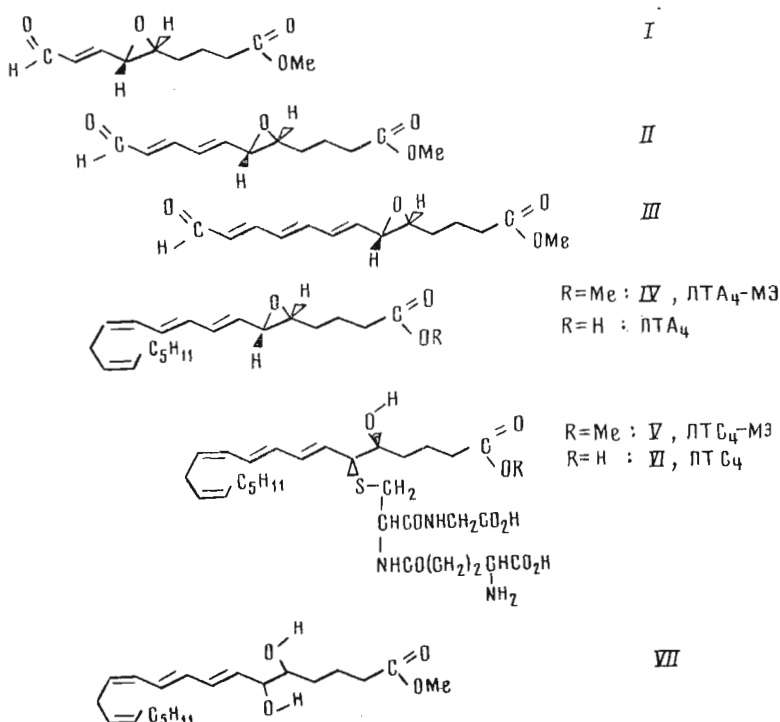
При хроматографировании лейкотриенов в условиях ОФ-ВЭЖХ в случае использования ацетатных буферных растворов (именно такие растворы используются, как правило, при анализе и выделении этих соединений)

ЛТА<sub>4</sub> и ЛТС<sub>4</sub> — лейкотриены  $A_4$  и  $C_4$ , ПФ — подвижная фаза, ОФ — обращенно-фазовая, МЭ — метиловый эфир.

часто отмечается низкая эффективность хроматографической системы [10]. Для устранения размывания хроматографических пиков вследствие наличия в сорбенте микропримесей металлов рекомендуют использовать добавки к элюентам комплексона III [13]. Добавки этого хелатирующего агента вызывают резкое ускорение коррозии аппаратуры и в ряде случаев затрудняют использование спектрофотометрического детектора. Как правило, металлы-комплексобразователи, присутствующие в небольших количествах в ПФ и сорбенте, образуют прочные фосфатные комплексы. Мы применили в качестве водного компонента ПФ фосфатный буферный раствор. Опыты показали, что в присутствии такого буфера наблюдается хорошая эффективность как в изократическом, так и в градиентном режиме ОФ-ВЭЖХ.

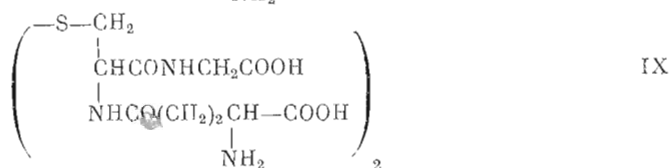
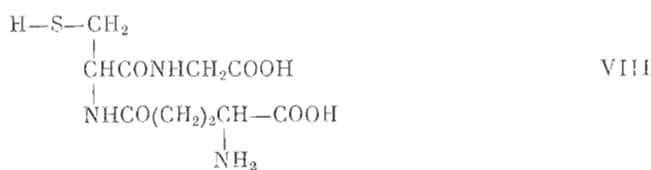
Лейкотриены обладают значительной удерживаемостью на октадецильных сорбентах, и для их элюирования необходимы ПФ, содержащие метанол в больших концентрациях. Стандартизация показаний стеклянных электродов и определение pH в таких средах является сложной задачей [14]. Наиболее просто воспроизвести экспериментальные условия, измеряя pH водного буферного раствора, который в дальнейшем используется для приготовления ПФ. Нами использовался этот способ приготовления элюентов при построении зависимостей коэффициентов емкости ( $k'$ ) от pH (рис. 1). Для устранения влияния изменения ионной силы при изменении pH к элюенту добавляли сульфат аммония до концентрации  $10^{-2}$  М. Повышение ионной силы ПФ вследствие небольших добавок сульфата аммония приводит к уменьшению коэффициентов емкости ЛТС<sub>4</sub> и ЛТС<sub>4</sub>-МЭ, что соответствует характеру поведения заряженных соединений в условиях ОФ-ВЭЖХ [15].

Для ЛТС<sub>4</sub> характерно увеличение коэффициента емкости ( $k'$ ) при изменении pH от 7,3 до 4,8 на величину около 0,6/ед. pH, а затем резкое возрастание удерживания при дальнейшем понижении pH. Сопоставляя зависимости для ЛТС<sub>4</sub> (VI) и его метилового эфира (V) (рис. 1), можно сделать вывод, что возрастание коэффициентов емкости в интервале pH 7,3–4,8 для ЛТС<sub>4</sub> обусловлено наличием карбоксильной группы углеводородного фрагмента, рK<sub>a</sub> которой, видимо, находится в пределах 6–7. Для ЛТС<sub>4</sub>-МЭ имеются два участка, где pH не влияет на удерживание: 5,6–7,5 и 3,8–5,4. Перегиб в области pH 5,4–5,6 позволяет определить зна-



чение  $pK_a$  слабодиссоциированной карбоксильной группы глицинового остатка, входящего в состав глутатионового фрагмента ЛТС<sub>4</sub>, в данных экспериментальных условиях равным 5,5. Резкое возрастание удерживания при  $pH < 4,5$  свидетельствует о переходе  $\alpha$ -карбоксильной группы глутаминового остатка в неионизированное состояние.

При всем разнообразии существующих схем синтеза лейкотриенов многие из них включают сходные стадии и реагенты [5, 7, 16–19]. Ключевым структурным блоком в синтезе лейкотриенов А<sub>4</sub>, С<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> и Е<sub>4</sub> является метил-6-формил-5*S*,6*R*-эпоксигексаноат [5], в дальнейшем по реакции Виттига превращающийся в метил-8-формил-5*S*,6*S*-эпокси-7*E*-октаеноат (I) [5, 7, 16] или (5*S*,6*S*)-метил-10-формил-5*S*,6*S*-эпокси-7*E*,9*E*-декадиеноат (II) [17–19], ЛТА<sub>4</sub>-МЭ (IV) и затем в соответствующие лейкотриены. Все эти соединения имеют протяженные гидрофобные фрагменты, в связи с чем можно предположить большую площадь их контакта с поверхностью октадецильных сорбентов в условиях ОФ-ВЭЖХ. В соответствии с сольвофобной теорией изменение поверхностного натяжения ПФ в значительной степени должно влиять на коэффициенты емкости таких соединений [20, 21]. Для оптимизации условий хроматографирования в таких случаях обязательным является изучение зависимости удерживания от содержания органического растворителя в ПФ.



На рис. 2 показано влияние концентрации метанола в ПФ на удерживание этих соединений, а также трифенилфосфилоксида (X), побочного продукта реакции Виттига, и метилового эфира дигидроксиэйкозатетраеновой кислоты (VII), продукта взаимодействия эфира (IV) с водой [4]. В изученных диапазонах концентраций  $\ln k'$  линейно зависит от содержания метанола в ПФ. Параметры уравнения  $\ln k' = A - Bc_{\text{MeOH}}$  приведены в

Таблица 1

Параметры уравнения  $\ln k' = A - Bc_{\text{MeOH}}$

Вещество	Интервал изученных $c_{\text{MeOH}}$ (%) в ПФ*	A	B · 10 <sup>3</sup>	Вещество	Интервал изученных $c_{\text{MeOH}}$ (%) в ПФ*	A	B · 10 <sup>3</sup>
I	40–60	3,57±0,16	57,7±3,2	VI	50–65	10,87±0,1	170±1,9
II	40–60	5,4±0,15	83±3	VII	80–95	11,50±0,22	120±2,6
III	55–75	7,13±0,2	94,2±5	VIII	0–2,9	(222±8,3) · 10 <sup>-3</sup>	113±5,5
IV	80–95	10,57±0,6	102±6,6	IX	0–2,9	(128±6,9) · 10 <sup>-3</sup>	230±3,6
V	65–75	11,70±0,12	155±1,7	X	55–70	7,91±0,2	102±5

\* Водный компонент ПФ — 10<sup>-2</sup> М фосфатный буфер, pH 7,1; для соединений (VIII), (IX) — 10<sup>-2</sup> М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10<sup>-2</sup> М фосфатный буфер, pH 3,4.

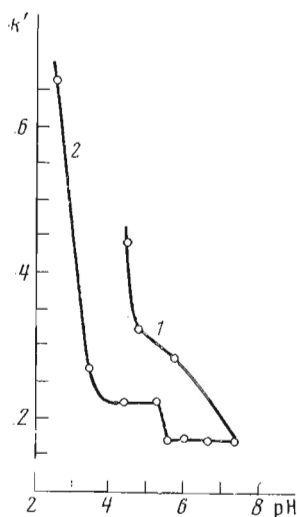


Рис. 1

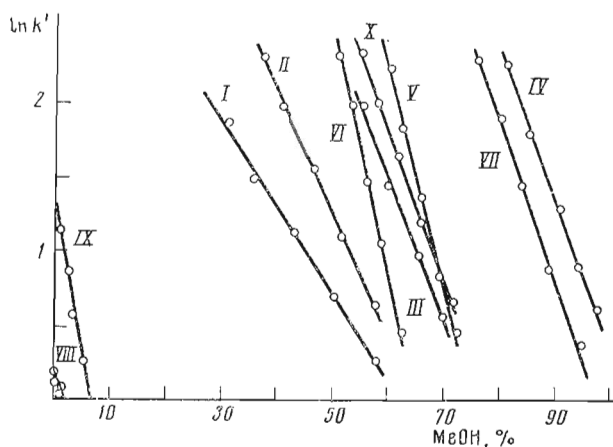


Рис. 2

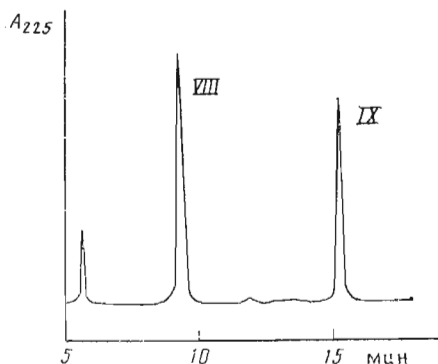


Рис. 3

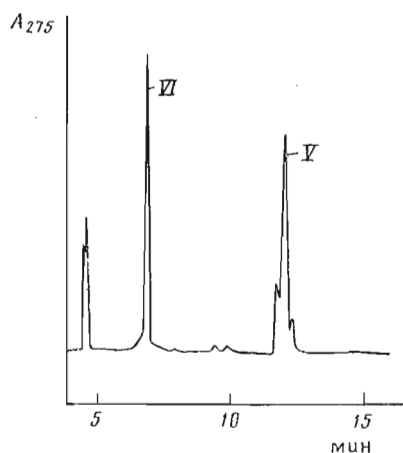


Рис. 4

Рис. 1. Влияние pH ПФ на удерживание ЛТС<sub>4</sub> (1) и ЛТС<sub>4</sub>-МЭ (2). ПФ — 10<sup>-2</sup> М Н<sub>3</sub>РO<sub>4</sub>, нейтрализованная аммиаком; 10<sup>-2</sup> М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; метанол в концентрации 65 (1) и 75% (2)

Рис. 2. Влияние концентрации метанола в ПФ на удерживание соединений (1)–(X). ПФ — метанол — 10<sup>-2</sup> М фосфатный буфер, pH 7,1

Рис. 3. Разделение окисленного и восстановленного глутатиона. ПФ — 10<sup>-2</sup> М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 10<sup>-2</sup> М фосфатный буфер, pH 3,4; 1,5% MeOH

Рис. 4. Разделение ЛТС<sub>4</sub> (VI) и его метилового эфира (V) в ПФ 69% MeOH — 10<sup>-2</sup> М фосфатный буфер, pH 7,1

табл. 1. Полученные результаты позволяют выбрать оптимальные условия хроматографирования и регулировать удерживание интересующих соединений.

Лучшими условиями для хроматографирования ЛТС<sub>4</sub>-МЭ являются пределы pH 4,3–5,3 и 5,9–7,5 (рис. 1). При этих условиях значения коэффициентов емкости наиболее стабильны. Для ЛТС<sub>4</sub> такими пределами являются pH 5,0–7,5. Таким образом, рекомендуемые значения pH 5,6 для ЛТС<sub>4</sub>-МЭ [10] и 4,7 [11], 2,5 [12] для ЛТС<sub>4</sub> не являются оптимальными. При этих значениях удерживание резко зависит от pH и небольшие погрешности при определении кислотности элюента в максимальной степени сказываются на воспроизводимости результатов хроматографирования. Значительное увеличение коэффициента емкости при pH < 4,5 вследствие уменьшения степени диссоциации карбоксильных групп пептидного

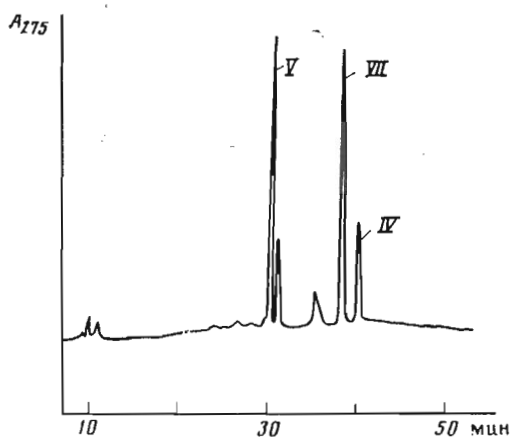


Рис. 5

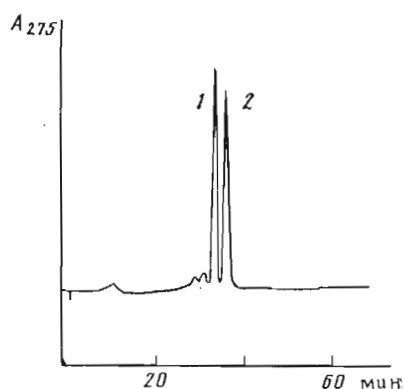


Рис. 6

Рис. 5. Хроматограмма реакционной смеси при препаративном выделении метилового эфира ЛТС<sub>4</sub>. ПФ —  $10^{-2}$  М фосфатный буфер, рН 7,1; градиент MeOH 50–100% за 30 мин

Рис. 6. Разделение 7Z- (1) и 7E- (2) изомеров соединения (II). ПФ — 40% MeOH —  $10^{-2}$  М фосфатный буфер, рН 7,1

компонента позволяет осуществлять хроматографирование высокополярного глутатиона, используемого при синтезе ЛТС<sub>4</sub>, весьма слабо удерживаемого в условиях ОФ-ВЭЖХ. При рН 3,4 (0,01 М фосфатный буфер, 0,01 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) легко контролировать в восстановленном глутатионе (VIII) содержание основной примеси — глутатиона окисленного (IX) (рис. 3).

Поскольку метиловый эфир ЛТА<sub>4</sub> в кислом элюенте вследствие раскрытия эпоксидного цикла превращается в дигидроксипроизводные [4], оптимальными при хроматографировании этого соединения и ЛТС<sub>4</sub> являются рН 6,9–7,3 (рис. 4).

Из рис. 2 и табл. 1 видно, что небольшие изменения в концентрации метанола в ПФ приводят к значительному изменению коэффициентов емкости соединений. Наиболее крутая зависимость коэффициента емкости от концентрации метанола в элюенте наблюдается для ЛТС<sub>4</sub>. Для воспроизводимости результатов хроматографирования в этом случае необходимо точное соблюдение состава ПФ: концентрации метанола, ионов водорода и ионной силы. Кроме того, при анализе реакционной смеси взаимодействия метилового эфира (IV) с глутатионом, а также препаративном выделении соединений (V) и (VI) целесообразно использование элюентов с рН < 3, поскольку вследствие резкого увеличения удерживания этих соединений уменьшается селективность разделения их с побочными продуктами превращения эфира (IV), не содержащими ионизируемых групп. Для выделения метилового эфира (V) весьма эффективно также использование градиентного режима элюирования. Резкое увеличение коэффициентов емкости при уменьшении концентрации метанола в ПФ в этом случае способствуют достижению высокой эффективности разделения. На рис. 5 приведена хроматограмма реакционной смеси для получения ЛТС<sub>4</sub>-МЭ путем взаимодействия эфира (IV) с глутатионом в метанольной среде. Использование колонки 7,8×300 мм позволяет при помощи градиентной ОФ-ВЭЖХ за один цикл выделять 1,0–1,5 мг ЛТС<sub>4</sub>-МЭ.

В синтезе природных лейкотриенов используется 7E-изомер (II). По реакции Виттига образуется смесь 7E- и 7Z-изомеров [19]. Селективность разделения изомеров при уменьшении концентрации метанола в ПФ возрастает (табл. 2). Полное разделение достигается при концентрации метанола 40% и менее, что позволяет осуществлять контроль разделения изомеров (II) при получении 7Z-изомера (II), применяемого для синтеза 7Z-изомеров лейкотриенов (рис. 6).

Используя основные положения сольвофобной теории [20], по результатам хроматографических экспериментов можно получить некоторые ха-

Параметры селективности разделения веществ

Соединения	$\Delta(\Delta A)$ , нм <sup>2</sup>	$-\Delta(\Delta G_{int})$ , кДж/моль, при концентрации метанола в ПФ, об. %				$-\Delta(\Delta G_{cav})$ , кДж/моль, при концентрации метанола в ПФ, об. %			
		0	40	60	80	0	40	60	80
II, I	0,36	9,2	2,1	0,9	-0,4	15,5	8,4	7,2	5,9
II (7E), II (7Z)	0,09	1,9	0,2	-0,1	-0,4	3,8	2,1	1,8	1,5
III, II	0,16	6,2	3,1	2,5	2,0	6,9	3,7	3,2	2,6
IV, III	0,11	9,9	7,8	7,4	7,0	4,8	2,6	2,2	1,8
IV, V	-0,75	-12,5	2,4	5,1	7,7	-32,5	-17,6	-15,0	-12,4
VI, V	-0,21	-0,6	3,6	4,3	5,1	-9,2	-5,0	-4,2	-3,5
IV, VII	0,25	5,5	0,5	-0,3	-1,2	10,9	5,9	5,0	4,2
VII, V	-0,50	-6,9	3,0	4,7	6,5	-21,6	-11,7	-10,0	-8,2
IX, VIII	0,28	2,7				12,1			

характеристики взаимодействия веществ с гидрофобной поверхностью. В табл. 2 приведены значения  $\Delta(\Delta G_{int})$  (изменение свободной энергии сорбции;  $\Delta(\Delta G_{int}) = -RT \ln \alpha$ , где  $\alpha$  — отношение коэффициентов емкости соединений),  $\Delta(\Delta A)$  (изменение площади контакта с поверхностью гидрофобного сорбента при переходе от одного соединения к другому), а также  $\Delta(\Delta G_{cav})$  (вклад в  $\Delta(\Delta G_{int})$ , определяемый величиной  $\Delta(\Delta A)$  и свойствами ПФ). Значения  $\Delta(\Delta A)$  рассчитывали с помощью соотношения [20], считая, что при небольшом изменении концентрации метанола в элюенте различия в энергии ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий соединений с ПФ практически постоянны. В области концентрации метанола 0–10% наблюдается резкое уменьшение поверхностного натяжения ( $\gamma$ ) ПФ. Основной вклад в изменение коэффициента емкости соединений вносит член  $\Delta G_{cav}$  [20]:

$$-\Delta G_{cav} = [N\Delta A + 4,86N^{1/3}(K^e - 1)V^{2/3}] \gamma, \quad (1)$$

где  $V$  — средний молярный объем растворителя;  $K^e$  — величина, характеризующая свойства растворителя [20, 21];  $N$  — число Авогадро.

В этом случае, используя уравнение (1), по зависимости  $\ln k' = f(\gamma, K^e, V^{2/3})$  можно рассчитать значение  $\Delta A$ . Для восстановленной формы глутатиона эта величина составила 0,93 нм<sup>2</sup>. Полученные результаты (табл. 2) позволяют сделать некоторые выводы относительно взаимодействия веществ с гидрофобной поверхностью октадецильного сорбента. Увеличение площади контакта при переходе от соединения (I) к (II) на величину (0,36 нм<sup>2</sup>), значительно превышающую площадь двух групп  $-\text{CH}_2-$  (~0,22 нм<sup>2</sup>) [22], может свидетельствовать об иной ориентации диена (II) относительно поверхности сорбента по сравнению с (I). Логично предположить, что во взаимодействие соединения (I) с углеводородной поверхностью основной вклад вносят атомы углерода C2–C4. Значительным образом сольватированный фрагмент C5–C9 с гидрофильными эпоксидным циклом и альдегидной группой ориентирован в элюент. При введении двух метиловых групп гидрофобность фрагмента существенно повышается и во взаимодействии с алкильными группами сорбента вступают кроме атомов C2–C4 также атомы C7–C10. Дальнейшее наращивание цепи, видимо, не приводит к изменению ориентации молекулы относительно поверхности, вследствие чего при переходе от соединения (II) к триену (III) площадь контакта увеличивается на величину, близкую площади группировки  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2-$ . При переходе от триена (III) к метилому эфиру ЛТА<sub>3</sub> (IV) добавляется протяженный гидрофобный алкильный фрагмент C13–C20. Энергия сорбции резко возрастает ( $\Delta(\Delta G_{int})_{H_2O} = -9,9$  кДж/моль), в то время как площадь контакта с поверхностью увеличивается весьма незначительно. Это можно объяснить лишь тем, что обладающая большим средством к октадецильному сорбенту алкильная часть молекулы эфира (IV) полностью находится в контакте с гидрофобным поверхностным слоем,

а более гидрофильная часть вместе с жестким 7E,9E,11Z-триеновым фрагментом ориентирована в элюент.

Площадь гидрофобного контакта при переходе от ЛТА<sub>4</sub>-МЭ (IV) к ЛТС<sub>4</sub>-МЭ (V) увеличивается на величину, близкую площади контакта с сорбентом глутатиона. Этот момент может свидетельствовать о том, что ориентация углеводородного и пептидного блоков относительно гидрофобной поверхности при образовании метилового эфира (V) значительно не изменяется.

Несколько неожиданным на первый взгляд представляется увеличение площади взаимодействия с поверхностью сорбента ЛТС<sub>4</sub> (VI) по сравнению с его метиловым эфиром (V) (табл. 2). Селективность разделения этих соединений, как и пары (IV)–(V), вследствие этого увеличивается при увеличении концентрации метанола в ПФ (табл. 2). Учитывая выводы, сделанные относительно ориентации сорбированного эфира (IV), можно предположить, что в эфире ЛТС<sub>4</sub> (V) ориентация фрагмента С1–С6 в «приподнятом» относительно сорбента положении будет дополнительно стабилизирована внутримолекулярной водородной связью между карбонильным кислородом атома С1 и гидроксигруппой атома С5. Метильная группа в этом случае должна быть ориентирована в элюент и в контакте с поверхностью не должна участвовать. При гидролизе метилового эфира ЛТС<sub>4</sub> образующаяся карбоксильная группа соединения (VI) при значениях  $pH \geq 6$  ионизирована и, вполне вероятно, вступает в сильное ион-ионное взаимодействие с протонированной в этих условиях аминогруппой глутаминового остатка. При этом ориентация фрагмента С1–С4 изменится, и в контакт с поверхностью сорбента уже способны вступить атомы С2 и С3, что увеличивает площадь гидрофобного контакта ЛТС<sub>4</sub> (VI) по сравнению с его метиловым эфиром (V).

Возможность существования описанных конформаций подтверждается при помощи атомных моделей Стюарта – Бриглеба. Гораздо бóльшая площадь взаимодействия с октадецильным сорбентом ЛТС<sub>4</sub> и его эфира по сравнению с ЛТА<sub>4</sub> и дигидроксизйкозатетраеновой кислотой (VII) позволяет сделать еще один вывод. В водной среде сродство к гидрофобной поверхности у метилового эфира ЛТС<sub>4</sub> выше, чем у метилового эфира ЛТА<sub>4</sub> и кислоты (VII) (табл. 2). Расчеты  $\Delta(\Delta G_{int})$  в области концентраций метанола, где значения коэффициентов емкости экспериментальным путем получить затруднительно, сделаны с использованием допущения о постоянстве различий ван-дер-ваальсовых взаимодействий веществ с растворителем при изменении содержания метанола в подвижной фазе. В действительности при уменьшении концентрации метанола в элюенте ван-дер-ваальсовы взаимодействия ПФ с веществом несколько уменьшаются (электростатические практически постоянны) [20], следовательно, связывание более крупной молекулы ЛТС<sub>4</sub> с гидрофобной поверхностью увеличивается и  $\Delta(\Delta G_{int})_{H_2O}$  должно быть даже несколько больше рассчитанной величины. Таким образом, присоединение гидрофильного фрагмента не всегда приводит к уменьшению взаимодействия образующегося соединения с гидрофобной поверхностью. Решающее значение имеют ориентация относительно поверхности и состав растворителя.

### Экспериментальная часть

Хроматографию осуществляли в градиентной системе для ВЭЖХ (ЛКВ, Швеция), состоящей из двух насосов модели 2150, контроллера 2152, скоростного спектрального детектора 2140, термостага колонок 2155, кондиционера растворителей 2156, инжектора 2154 с петлей объемом 1000 мкл, вычислительного интегратора 2220, коллектора фракций Supergac 2211. Колонки: аналитическая 4×250 мм, заполненная сорбентом Lichrosorb RP18 (5 мкм); полупрепаративная 7,8×300 мм, заполненная сорбентом Ultrapak TSK ODS-120T (10 мкм); предколонка 4×30 мм, заполненная сорбентом Lichrosorb RP18 (7 мкм). Скорость потока ПФ 0,5 мл/мин в аналитическом режиме 1,5 мл/мин – в полупрепаративном.

Для изучения влияния pH на удерживание соединений (V) и (VI) при-

меняли ПФ ( $10^{-2}$  М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  —  $10^{-2}$  М  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , нейтрализованная аммиаком), содержащую 75% MeOH — для (V) и 65% MeOH — для (VI). При определении зависимостей удерживания соединений от концентрации метанола в элюенте водный компонент представляет собой  $10^{-2}$  М фосфатный буфер, pH 7,1 (соединения I—VII, X);  $10^{-2}$  М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $10^{-2}$  М фосфатный буфер, pH 3,4 (VIII, IX).

Для достижения стабильности времени удерживания ( $t_R$ ) колонку уравновешивали, прокачивая шесть колоночных объемов элюента.  $t_R$  определяли как среднее трех измерений. Отклонение не превышало 2% (отн.).

Эксперименты проводили при комнатной температуре без дополнительного термостатирования. Проба — 10 мкл на аналитическую, до 1000 мкл на полупрепаративную колонки. Длина волны детектирования 225 нм для соединений (I), (VIII) и (IX), 320 нм для (III), 270 нм для остальных соединений. Соединения (I), (II), (IV), (V), (VI) получали по методикам [16, 23], (VII) — гидролизом метилового эфира ЛТА<sub>4</sub> [4], глутатионы — производства Reanal (ВНР), трифенилфосфиноксид — Sigma (США). Вода бидистиллированная, метанол марки х.ч.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Green R. H., Lembeth P. F. // *Tetrahedron*. 1983. V. 39. № 10. P. 1687.
2. Евстигнеева Р. П., Мягкова Г. И. // *Успехи химии*. 1986. Т. 55. № 5. С. 843.
3. Scheinmann F., Ackroyd J. *Leukotriene Syntheses: A New Class of Biologically Active Compounds Including SRS* — A.N.Y.: Raven Press, 1983. P. 10.
4. Samuelsson B., Hammarström S., Hamberg M., Serhan C. N. // *Adv. in Prostaglandin Thromboxane and Leukotriene Research*. V. 14. N. Y.: Raven Press, 1985. P. 48.
5. Rokach J., Girard Y., Atkinson J. G., Larue M., Young R. N., Masson P., Holme G. // *Tetrahedron Lett.* 1980. V. 21. № 16. P. 1485.
6. Corey E. J., Barton A. E., Clark D. A. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1980. V. 102. № 12. P. 4278.
7. Baker R., Jamieson W. B., McKay S. W., Morgan S. E., Rackham D. M., Ross W. J., Shroadsall P. R. // *Tetrahedron Lett.* 1980. V. 21. № 42. P. 4123.
8. Белослудцев Ю. Ю., Мягкова Г. И., Евстигнеева Р. П., Боброва Н. И., Пивницкий К. К. // *Биоорганическая химия*. 1987. Т. 13. № 8. С. 4125.
9. Abe M., Kawazoe Y., Shigamatsu N. // *Analyt. Biochem.* 1985. V. 144. № 2. P. 417.
10. Osborne D. J., Peters B. J., Meade C. J. // *Prostaglandins*. 1983. V. 26. № 5. P. 817.
11. Jakchik B. A., Harper T. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. № 7. P. 5346.
12. Powel W. S. // *Analyt. Biochem.* 1985. V. 148. № 1. P. 59.
13. Henke D. C., Kauzan S., Eling T. E. // *Analyt. Biochem.* 1984. V. 140. № 1. P. 87.
14. Бейрс Р. Определение pH. Теория и практика. Л.: Химия, 1972. С. 397.
15. Horvath C., Melander W., Molnar J. // *Analyt. Chem.* 1977. V. 49. № 1. P. 142.
16. Corey E. J., Clark D. A., Goto G., Marfat A., Mioskowski C. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1980. V. 102. № 4. P. 1436.
17. Corey E. J., Clark D. A., Marfat A., Goto G. // *Tetrahedron Lett.* 1980. V. 21. № 33. P. 3143.
18. Rokach J., Zamboni R., Lau C. K. // *Tetrahedron Lett.* 1981. V. 22. № 29. P. 2759.
19. Ernest I., Main A. J., Menasse R. // *Tetrahedron Lett.* 1982. V. 23. № 2. P. 167.
20. Horvath C., Melander W., Molnar J. // *J. Chromatogr.* 1976. № 1. V. 125. P. 123.
21. Sinanoglu O. // *Molecular Interactions*/Ed. N. Y.: J. Wiley & Sons. 1982. V. 3. P. 284.
22. Абрамзон А. А. Поверхностно-активные вещества. Л.: Химия, 1981. С. 304.
23. Rokach J., Young R. N., Kakushima M., Lau C. K., Seguin R., Frenette R., Guindon J. // *Tetrahedron Lett.* 1981. V. 22. № 11. P. 979.

Поступила в редакцию

13.VII.1988

После доработки

15.XI.1988

#### REVERSED-PHASE HPLC IN THE LEUKOTRIENES A<sub>4</sub> AND C<sub>4</sub> SYNTHESIS

GALUSHKO S. V., BELIK M. Yu., SOROCHINSKY A. E.,  
KORNILOV A. M., KUKHAR V. P.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the  
Ukrainian SSR, Kiev*

The chromatographic (RP HPLC) behaviour of leukotriene C<sub>4</sub>, its methyl ester, leukotriene A<sub>4</sub> methyl ester and some chemicals involved in their synthesis have been investigated. Optimal conditions of separation were determined for the gradient and isocratic HPLC. Parameters of the interaction of the substances with hydrophobic surface are discussed in terms of solvophobic theory.