



УДК 577.543.7

© 1990 г.

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
ЛЕЙКОТРИЕНА C_4 НА АМИНОПРОПИЛЬНОМ СОРБЕНТЕГалушко С. В., Велик М. Ю., Сорочинский А. Е.,
Корнилов А. М.*Институт биоорганической химии Академии наук УССР, Киев*

Изучено хроматографическое поведение на аминпропильном сорбенте метилового эфира лейкотриена C_4 , лейкотриена C_4 и побочных продуктов, присутствующих в реакционных смесях при их получении. Сорбция лейкотриена C_4 и его метилового эфира определяется гидрофобными и ионными взаимодействиями с сорбентом. Найдены оптимальные условия хроматографирования, позволяющие разделять соединения с высокой селективностью.

Завершающей стадией синтеза ЛТС $_4$ -Ме* является присоединение гидрофильного фрагмента глутатиона к гидрофобному ЛТА $_4$ -Ме. Реакционная смесь содержит большое количество побочных продуктов, вследствие чего для выделения ЛТС $_4$ -Ме используют высокоэффективную жидкостную хроматографию [1—3]. В реакционной смеси можно выделить две группы веществ, различающихся по своим характеристикам: гидрофобная группа (продукты взаимодействия ЛТА $_4$ -Ме с водой или метанолом [4]) и изомеры ЛТС $_4$ -Ме.

Развитие методов синтеза лейкотриенов привело к тому, что в настоящее время эти соединения могут быть получены с очень высокой степенью изомерной чистоты. Так, например, в наиболее простых схемах синтеза лейкотриенов при получении одного из ключевых соединений — метил-5S,6S-эпокси-7-оксигептаноата — используется хиральное эпексидирование по Шарплессу, что обеспечивает выход требуемого изомера на уровне 95% оптической чистоты [5, 6]. Каталитическая изомеризация на стадии синтеза метил-8-формил-5S,6S-эпокси-7E,9E-декадиеноата [7] с хроматографическим контролем проведения реакции [8] позволяет получить требуемый 7E-изомер практически количественно. Заключительная стадия получения ЛТА $_4$ -Ме по реакции Виттига также обеспечивает изомерную чистоту конечного продукта [9]. Характеристики получаемых синтетических лейкотриенов вполне удовлетворяют современным требованиям для изучения их биологических и других свойств. Таким образом, главная задача при хроматографировании реакционных смесей — отделение ЛТС $_4$ -Ме и ЛТС $_4$ от группы гидрофобных продуктов взаимодействия ЛТА $_4$ -Ме с метанолом и водой. Для выделения ЛТС $_4$ -Ме из реакционной смеси и определения его содержания, как правило, используют обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), позволяющую отделить его от этих побочных продуктов [1—3]. Ранее нами подробно изучено поведение исходных, побочных продуктов, ЛТА $_4$ -Ме, ЛТС $_4$ -Ме и ЛТС $_4$, в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ [8, 10]. Удерживание, эффективность и селективность разделения этих соединений зависят от многих факторов. Для успешного хроматографирования требуется особая точность при соблюдении условий и контроле параметров хроматографического процесса, а также достаточно высокоэффективные колонны.

* Использованные сокращения: ЛТС $_4$ и ЛТС $_4$ -Ме — лейкотриен C_4 и его метиловый эфир, ЛТА $_4$ -Ме — метиловый эфир лейкотриена A_4 , ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография, ПФ — подвижная фаза.

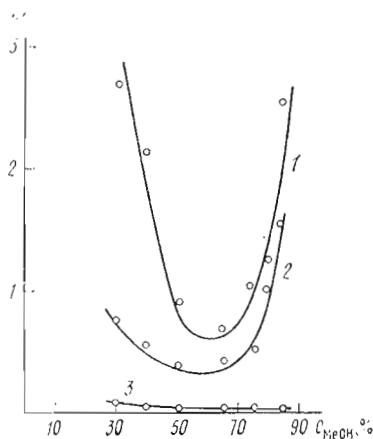


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость удерживания соединений LTC_4 (1), $\text{LTC}_4\text{-Me}$ (2) и гидрофобных продуктов (3) при ВЭЖХ от концентрации метанола в подвижной фазе

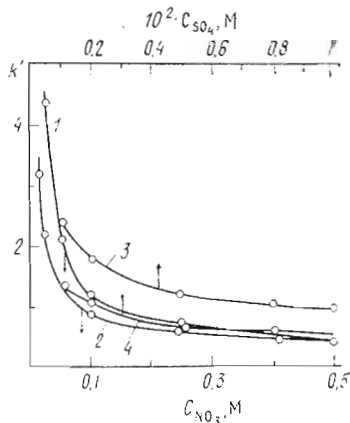


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость удерживания LTC_4 (1, 3) и $\text{LTC}_4\text{-Me}$ (2, 4) от концентрации солей

На аминопропиловом сорбенте возможны как ионные, так и гидрофобные взаимодействия хроматографируемых веществ с поверхностью сорбента, что позволяет в некоторых случаях коренным образом изменить селективность и тем самым улучшить и упростить разделение различных соединений.

Цель настоящей работы — изучение поведения $\text{LTC}_4\text{-Me}$, LTC_4 и продуктов, сопутствующих им в реакционных смесях, в условиях хроматографирования на аминопропиловом сорбенте, и поиск оптимальных условий разделения этих соединений.

Зависимости удерживания LTC_4 и $\text{LTC}_4\text{-Me}$ от концентрации метанола в подвижной фазе (ПФ) имеют параболическую форму (рис. 1). Как известно, параболические зависимости удерживания от концентрации органического растворителя в ПФ характерны при наличии двух типов взаимодействия изучаемого вещества с поверхностью [11]. По всей видимости, удерживание LTC_4 и $\text{LTC}_4\text{-Me}$ на аминопропиловом сорбенте также характеризуется несколькими видами взаимодействий: гидрофобными (между липофильными фрагментами лейкотриенов и алкильной частью сорбента) и специфическими (ионными, образованием H-связей) — между протонированными в этих условиях аминогруппами сорбента и полярными группами LTC_4 и $\text{LTC}_4\text{-Me}$. Характер зависимости может свидетельствовать о том, что при низких содержаниях метанола в элюенте значительный вклад вносят гидрофобные взаимодействия. Повышение концентрации метанола в ПФ, с одной стороны, уменьшает вклад гидрофобных взаимодействий, а с другой — увеличивает вклад специфических. Повышение вклада специфических взаимодействий между пептидными фрагментами соединений и протонированными аминогруппами сорбента приводит к возрастанию удерживания при высоких концентрациях метанола.

В описанных условиях гидроксипроизводные эйкозатетраеновой кислоты элюируются практически в свободном объеме колонки, поэтому зависимость на рис. 1 отражает влияние концентрации метанола в ПФ на селективность по отношению к этим соединениям. Более предпочтительно использование элюентов с содержанием метанола выше 50%, поскольку при низких концентрациях наблюдается значительное уширение пиков.

Для определения роли ионообменных процессов при хроматографировании $\text{LTC}_4\text{-Me}$ и LTC_4 на аминопропиловом сорбенте и выбора оптимальных условий разделения нами изучено влияние концентрации и типа противоиона на удерживание этих соединений. Изучали влияние измене-

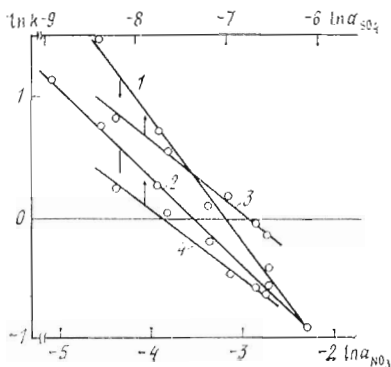


Рис. 3. Зависимость логарифма коэффициента емкости для ЛТС₄ (1, 3) и ЛТС₄-Ме (2, 4) от логарифма активности иона в элюенте

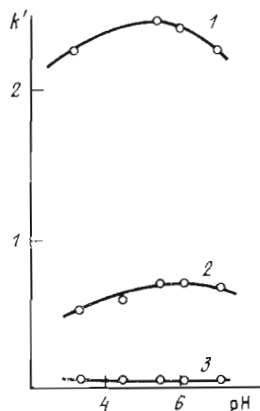


Рис. 4. Зависимость удерживания ЛТС₄ (1), ЛТС₄-Ме (2) и гидрофобных продуктов (3) от pH

ния концентрации нитрат- (в 50% метаноле) и сульфат-ионов (в 65% метаноле) (рис. 2). Во всех случаях гидроксипроизводные практически не удерживаются и зависимость разделения этих соединений с ЛТС₄-Ме и ЛТС₄ подобна зависимости коэффициентов емкости ЛТС₄ и ЛТС₄-Ме от концентрации противоиона. Зависимость $\ln k'$ от концентрации ионов в элюенте удовлетворительно аппроксимируется функциями:

$$\ln k'_1 = 6,94 \cdot 10^{-2} (\ln C)^2 - 2,42 \cdot 10^{-1} \ln C - 1,02,$$

$$\ln k'_2 = 1,10 \cdot 10^{-1} (\ln C)^2 - 2,93 \cdot 10^{-1} \ln C - 1,04,$$

для нитрат-иона и функциями:

$$\ln k'_1 = 11 \cdot 10^{-3} (\ln C)^2 - 2,83 \cdot 10^{-1} \ln C - 2,14,$$

$$\ln k'_2 = -8,85 \cdot 10^{-3} (\ln C)^2 - 5,27 \cdot 10^{-1} \ln C - 2,31$$

для сульфат-иона, где k'_1 и k'_2 — коэффициенты емкости ЛТС₄-Ме и ЛТС₄ соответственно, C — молярная концентрация соли в элюенте.

Среднестатистическое отклонение не превышало 3%.

Для учета эффекта ионной силы можно рассчитать коэффициенты активности ионов (γ_i) в элюенте по уравнению Дебая—Хюккеля:

$$\lg \gamma_i = -Az_i^2 I^{1/2},$$

где I — ионная сила; A — постоянная, рассчитанная нами по известной формуле [12] и равная 0,899 для 65% метанола и 0,753 для 50% водно-метанольных растворов; z_i — заряд иона.

Как видно из рис. 3, логарифм коэффициента емкости — линейная функция логарифма активности противоиона в подвижной фазе. Таким образом, удерживание ЛТС₄-Ме и ЛТС₄ достаточно хорошо описывается в этих условиях как ионообменный процесс. Параметры уравнений $\ln k' = D \cdot a + B$ (a — натуральный логарифм активности противоиона) и коэффициенты корреляции (r) приведены в таблице.

Как следует из теории ионообменной хроматографии, абсолютное значение D является отношением зарядов элюируемого и элюирующего ионов [13]. Усредненные по двум значениям заряды составляют 0,93 и 1,1 для ЛТС₄-Ме и ЛТС₄ соответственно, т. е. можно сделать вывод, что в ионное взаимодействие с протонированной аминогруппой сорбента вступает главным образом одна карбоксильная группа — по всей видимости, глутаминового остатка глутатиона. Некоторое возрастание значения $|D|$ при переходе от ЛТС₄-Ме к ЛТС₄ свидетельствует о том, что имеет место также и небольшой вклад карбоксильной группы углеводородного фрагмента ЛТС₄.

Как нами показано ранее [10], повышение концентрации ионов водо-

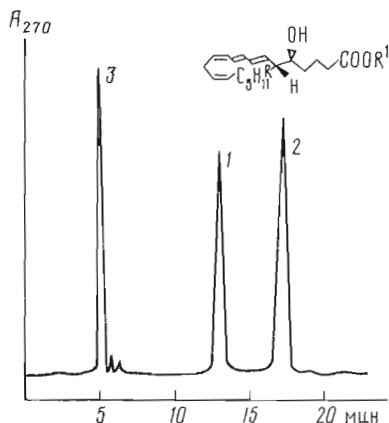


Рис. 5. Хроматограмма реакционной смеси, полученной при гидролизе ЛТС₄-Ме. Колонка 3 × 150 мм, Separon-NH₂; элюент — 85% MeOH, водный раствор 10⁻² М (NH₄)₂SO₄, 10⁻³ М Н₃РО₄ (рН 2,3): 1 — ЛТС₄-Ме (R = Glu-Cys-Gly; R¹ = Me), 2 — ЛТС₄ (R = Glu-Cys-Gly; R¹ = H), 3 — гидрофобные продукты (R = OH, OMe; R₁ = H)

рода в подвижной фазе может значительно усилить взаимодействие ЛТС₄-Ме и ЛТС₄ с гидрофобным сорбентом в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. Зависимости влияния рН элюента на удерживание этих соединений на аминопропильном сорбенте (рис. 4) отражают изменение процессов протонизации как в подвижной, так и в неподвижной фазах. При повышении рН от 2 до 5—6 увеличивается степень диссоциации карбоксильных групп лейкотриенов, что и приводит к увеличению удерживания. Уменьшение удерживания при рН > 6, по всей видимости, обусловлено частичным депротонированием аминогрупп сорбента. Общее изменение удерживания небольшое, что является существенным преимуществом этого метода по сравнению с обычным вариантом обращенно-фазовой ВЭЖХ.

В условиях хроматографии на аминопропильном сорбенте реализуется очень высокая селективность разделения гидроксипроизводных эйкозатетраеновой кислоты и ЛТС₄-Ме и ЛТС₄ (рис. 1, 5). Разделение на аминопропильном сорбенте этих соединений (по сравнению с ранее изученными методами обращенно-фазовой ВЭЖХ) отличается большей селективностью и подвержено меньшему влиянию кислотности подвижной фазы.

Экспериментальная часть

Для ВЭЖХ использовали модульный прибор (LKB, Швеция), состоящий из насоса 2150, скоростного спектрального детектора 2140, инжектора 2154 с петлей 100 мкл, вычислительного интегратора 2220. Применялась стеклянная колонка 150 × 3 мм, заполненная Separon SIX NH₂ (СССР). Скорость потока ПФ 0,2 мл/мин. Детектирование при 270 нм. Применялись элюенты:

а) для изучения влияния метанола смесь MeOH с водным раствором 10⁻² М (NH₄)₂SO₄, 10⁻³ М Н₃РО₄ (рН 2,3),

б) для изучения влияния рН 40% MeOH, водный раствор 10⁻² М (NH₄)₂SO₄, 10⁻³ М Н₃РО₄, нейтрализованный аммиаком,

Параметры уравнения $\ln k' = Da + B$

Соединение	D	B	ρ
Противоион — SO ₄ ²⁻			
ЛТС ₄ -Ме	-0,559 ± 4,58 · 10 ⁻²	-4,274 ± 3,31 · 10 ⁻¹	0,990
ЛТС ₄	-0,584 ± 2,26 · 10 ⁻²	-3,902 ± 1,63 · 10 ⁻¹	0,998
Противоион — NO ₃ ⁻			
ЛТС ₄ -Ме	-0,737 ± 2,36 · 10 ⁻²	-2,58 ± 8,9 · 10 ⁻²	0,998
ЛТС ₄	-1,010 ± 5,00 · 10 ⁻²	-3,184 ± 1,80 · 10 ⁻²	0,998

в) для изучения влияния ионной силы 50% MeOH, водный раствор 10^{-3} М HNO_3 , $1,5 \cdot 10^{-2}$ — $5 \cdot 10^{-1}$ М KNO_3 (рН 3,4); 65% MeOH, водный раствор 10^{-3} М H_3PO_4 , 10^{-3} — 10^{-2} М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (рН 3,7).

Перед определением колонку промывали элюентом с концентрацией соли, превышающей рабочую в 10 раз (6 объемов), а затем рабочим элюентом (6 объемов). Время удерживания определялось как среднее трех измерений, отклонение не превышало 2% (отн.). Свободный объем определялся по выходу дейтерированной воды. Эксперименты проводились при комнатной температуре без дополнительного термостатирования. ЛТС₄-Ме и ЛТС₄ были получены по методу [3, 14]. Вода бидистиллированная, метанол марки х.ч.

Коэффициент емкости определяли по формуле

$$k' = \frac{t - t_0}{t_0},$$

где t — время удерживания вещества, t_0 — время выхода дейтерированной воды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Corey E. J., Goto G. // Tetrahedron Lett. 1980. V. 21. № 36. P. 3463.
2. Atrache F. A., Pai J.-K., Sok D.-E., Sih C. J. // Tetrahedron Lett. 1981. V. 22. № 36. P. 3443—3446.
3. Corey E. J., Clark D. A., Marfat G. A., Goto G. // Tetrahedron Lett. 1980. V. 21. № 33. P. 3143—3146.
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. Rossiter B. E., Katsuki T., Sliarpless K. B. // J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. № 2. P. 464—465.
6. Мифтахов М. С., Толстиков А. Г., Толстиков Г. А. // Журн. орган. химии. 1984. Т. 20. № 4. С. 678—683.
7. Ernest I., Main A. J., Menasse R. // Tetrahedron Lett. 1982. V. 23. № 1. P. 167.
8. Галушко С. В., Белик М. Ю., Сорочинский А. Е., Корнилов А. М., Кузарь В. П. // Журн. аналит. химии. 1989. Т. 44. № 5. С. 938—941.
9. Corey E. J., Clark D. A., Marfat G. A., Mioskowski C. // J. Amer. Chem. Soc. 1980. V. 102. № 4. P. 1436—1439.
10. Галушко С. В., Белик М. Ю., Сорочинский А. Е., Корнилов А. М., Кузарь В. П. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 7. С. 952—959.
11. Grego V., Hearn M. T. // Chromatographia. 1981. V. 14. P. 589.
12. Даниэльс Ф., Олберти Р. Физическая химия. М.: Мир, 1978. С. 191.
13. Фритцу Дж., Гоерде Д., Поланд К. Ионная хроматография. М.: Мир, 1984. С. 126.
14. Rokach J., Young R. N., Kakushima M., Lau C. K., Seguin R., Frenette R., Guindon Y. // Tetrahedron Lett. 1981. V. 22. № 11. P. 979.

Поступила в редакцию
17.I.1989

После доработки
24.IV.1989

HPLC OF LEUKOTRIENE C₄ ON THE AMINOPROPYL SORBENT

GALUSHKO S. V., BELIK M. Yu., SOROCCHINSKY A. E., KORNILOV A. M.

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

Chromatographic behaviour of leukotriene C₄, its methyl ester and hydrophobic side products of their synthesis on an aminopropyl sorbent has been investigated, the retention time values being determined by both hydrophobic and ionic interaction of the substances with the sorbent. Optimal conditions of the separation are determined.