

*Н. САМЕЛЬ, М. ЛЫХМУС, Резт АЛИСТЕ,
А. МЯННИК, Ю. ЛИЛЛЕ*

АНАЛИЗ ПРОСТАГЛАНДИНОВ ПРИ ПОМОЩИ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ, ТОНКОСЛОЙНОЙ И ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Приведенные в данной работе методики анализа простагландинов (ПГ) групп *A, B, D, E, F, G* и *H* при помощи газожидкостной, тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ГЖХ, ТСХ и ВЭЖХ) применялись при разработке способов препаративного биосинтеза ПГ, и некоторые из них внедрены для контроля технологии и качества продуктов на Опытном заводе органического синтеза и биопрепаратов Института химии АН ЭССР.

Результаты и обсуждение

Необходимое условие анализа ПГ с помощью ГЖХ — защита карбоксильной и гидроксильных групп, во многих случаях и кетогруппы, с целью уменьшения адсорбции и деградации пробы в колонке. В данной работе ПГ анализировались в виде триметилсилиловых (ТМС) и метоксим-триметилсилиловых (МО-ТМС) производных на стационарных фазах OV-1 и OV-17. Относительные объемы удерживания приведены в табл. 1.

Превращение ПГ в ТМС-производные осуществлялось смесью *N,O*-бис-(триметилсилил)-трифторацетамида (БСТФА) в пиперидине [1] или смесью триметилсилилимидазола (ТСИМ) в пиперидине [2]. Более надежным оказался первый способ силилирования. При этом реакции идут количественно, и из каждого ПГ образуется одно производное. В качестве недостатка можно отметить, что (ТМС)₄ ПГ $F_{2\alpha}$ и (ТМС)₄-9-енол-ПГ E_2 , образующиеся соответственно из ПГ $F_{2\alpha}$ и E_2 , не разделяются (рис. 1а).

Полное разделение ПГ E_2 , D_2 и $F_{2\alpha}$ на OV-17 достигается хроматографированием их в виде ТМС-производных, полученных по второму способу. Поскольку ПГ D_2 при обработке силилирующими смесями ТСИМ-пиперидин, БСТФА-пиперидин и БСТФА превращается в производное с одинаковым объемом удерживания, авторы по аналогии с ПГ E_2 предполагают, что из ПГ D_2 образуется (ТМС)₄ производное 11-енол-ПГ D_2 ((ТМС)₄-11-енол-ПГ D_2). Кроме того известно, что енолизация карбонильной группы облегчается в случае сопряжения образующегося енольного производного с двойной связью [3].

Так как в условиях силилирования с ТСИМ в присутствии пиперидина ПГ A_2 и E_2 превращаются в (ТМС)₂ ПГ B_2 , этот способ не позволяет обнаружить ПГ A_2 и B_2 в пробе E_2 (рис. 1б). Кроме того,

Таблица 1

Относительные объемы удерживания различных ТМС- и МО-ТМС-производных ПГ на OV-1 и OV-17 при температуре 250 °С

ПГ	Реагенты блокирования	Производное ПГ	V _{отн.} к сквалану		V _{отн.} к C _{20:4} -ТМС	
			OV-17	OV-1	OV-17	OV-1
F _{2β}	БСТФА в пиперидине	(ТМС) ₄ ПГ F _{2β}	1,35	1,18	1,97	2,49
F _{2α}		(ТМС) ₄ ПГ F _{2α}	1,55	1,35	2,26	2,85
E ₂		(ТМС) ₄ -9-енол-ПГ E ₂	1,50	1,28	2,18	2,69
D ₂		(ТМС) ₄ -11-енол-ПГ D ₂	1,93	1,49	2,71	3,11
B ₂		(ТМС) ₂ ПГ B ₂	3,45	1,43	5,45	2,91
A ₂	ТСИМ в пиперидине	(ТМС) ₃ (ПИП)ПГ A ₂	5,32	2,88	8,27	7,03
D ₂		(ТМС) ₄ -11-енол-ПГ D ₂	1,93	1,49	2,71	3,11
E ₂		(ТМС) ₂ ПГ B ₂	3,45	1,43	5,45	2,91
A ₂		(ТМС) ₂ ПГ B ₂	3,45	1,43	5,45	2,91
B ₂		(ТМС) ₂ ПГ B ₂	3,45	1,43	5,45	2,91
A ₂	МОАГХ в пиридине, БСТФА	МО(ТМС) ₂ ПГ A ₂	1,58	1,07	2,19	2,22
D ₂		МО(ТМС) ₃ ПГ D ₂	1,80	1,14	2,49	2,35
E ₂		МО(ТМС) ₃ ПГ E ₂	2,14	1,21	3,10	2,53
B ₂		МО(ТМС) ₃ ПГ E ₂	2,41	1,41	3,50	2,95
B ₂		МО(ТМС) ₂ ПГ B ₂	2,17	1,52	3,17	3,07
			2,45	1,62	3,76	3,58
			3,04	1,52	4,67	3,07

Таблица 2

Соотношение син- и антиизомеров МО-ТМС-производных ПГ

ПГ	Среднее соотношение изомеров
A ₂	42 : 58
D ₂	10 : 90
E ₂	22 : 78

чтобы избежать образования (ТМС)₂ ПГ A₂ и (ТМС)₃ пиперидилпроизводного ПГ A₂ ((ТМС)₃(ПИП) ПГ A₂) как побочных продуктов из ПГ A₂ и E₂, необходим большой избыток реагентов. При использовании пламенно-ионизационного детектора концентрация ПГ в реакционной смеси может оказаться недостаточной и требуется концентрирование пробы, что в свою очередь, уменьшает точность количественного определения.

При обработке пробы ПГ метоксисилингидрохлоридом (МОАГХ) в пиридине с последующим силилированием карбоксильной и гидроксильных групп получают МО-ТМС-производные ПГ [4]. Из ПГ B₂ образуется один изомер, из ПГ A₂, D₂ и E₂ — син- и антиметоксимы, соотношение которых различно для разных ПГ (табл. 2). Для полного разделения всех пиков при анализе сложных смесей в виде МО-ТМС-производных необходимо пользоваться более эффективными капиллярными колонками [5]. В некоторых случаях, например, для количественного определения α- и β-изомеров ПГ F₂, образующихся при химическом восстановлении ПГ E₂, целесообразно метилировать пробу перед силилированием. Полученные таким образом ТМС-производные метиловых эфиров ПГ полностью разделяются даже на малоэффективных колонках [6].

Для уменьшения деградации пробы в испарителе желательно применять нестандартный стеклянный испаритель, который перед употреблением силилируют 5%-ным раствором гексаметилдисилазана в бензоле. В ходе работы хроматографа с каждой пробой вводят достаточное количество силилирующего реагента (БСТФА). При анализе продуктов биосинтеза перед силилированием пробу целесообразно очистить при помощи колоночной хроматографии на силикагеле. Это

Таблица 3

Значения R_f ПГ II серии на пластинках «Силуфол»

ПГ	R_f						Проявитель	Окраска пятна
	I *	II *	III *	IV *	V *	VI *		
$F_{2\beta}$	0,12	0,25	0,15	0,05	0,15	—	А	серо-синяя
6-кето $F_{1\alpha}$	0,12	—	—	—	—	—	А	светло-желтая
$F_{2\alpha}$	0,15	0,33	0,25	0,05	0,18	—	А	серо-синяя
E_2	0,25	0,48	0,42	0,20	0,27	—	А	ржаво-коричневая
D_2	0,39	0,63	0,55	0,25	0,28	—	А	вишнево-коричневая
A_2	0,60	0,76	0,84	0,69	0,68	—	А	темно-желтая
B_2	0,60	0,76	0,85	0,75	0,75	—	А	оранжевая
G_2	0,66	—	—	—	—	0,32	Б	ярко-красная
H_2	0,55	—	—	—	—	0,16	Б	ярко-красная

* Номера элюирующих смесей.

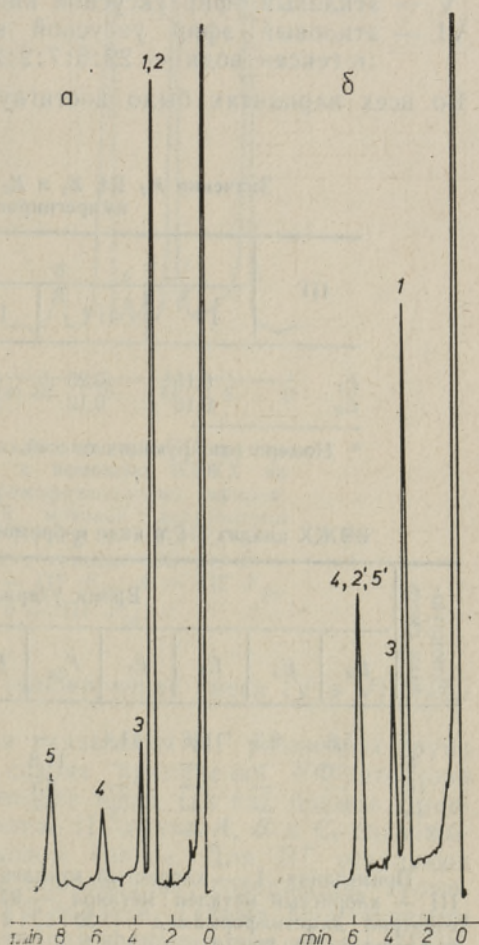
позволяет удлинить период эффективной работы колонки в десятки раз [6].

При разделении ПГ серии II с помощью ТСХ на пластинках «Силуфол» (ЧССР) использовались следующие элюирующие смеси (табл. 3):

- I — бензол:диоксан:уксусная кислота — 20:10:1 [7];
- II — бензол:диоксан:уксусная кислота — 20:20:1 [8];
- III — хлористый метилен:ацетонитрил:уксусная кислота — 80:20:15;
- IV — хлористый метилен:ацетонитрил:уксусная кислота — 80:20:10;
- V — хлороформ:метанол:уксусная кислота:вода — 90:9:3:1 (органический слой);
- VI — этиловый эфир уксусной кислоты:n-гексан:уксусная кислота — 200:200:1 [9].

Обнаружение индивидуальных ПГ проводилось опрыскиванием пластинок следующими проявителями:

Рис. 1. Хроматограммы разделения с помощью ГЖХ на OV-17 смеси ПГ A_2 , B_2 , D_2 , E_2 и $F_{2\alpha}$ в виде ТМС-производных, полученных смесями: а — БСТФА-пиперидин (1:1), б — ТСИМ-пиперидин (1:1). 1 — $(\text{TMS})_4$ ПГ $F_{2\alpha}$, 2 — $(\text{TMS})_4$ -9-енол-ПГ E_2 , 3 — $(\text{TMS})_4$ -11-енол-ПГ D_2 , 4, 2', 5- $(\text{TMS})_2$ ПГ B_2 , 5 — $(\text{TMS})_3$ (ПИП) ПГ A_2 .



А — анисовый альдегид:этанол:серная кислота — 1:9:1 (в объемном соотношении) [10];

Б — вода:аммоний роданистый:серная кислота:соль Мора — 12,5 мл:0,65 г:0,125 мл:0,875 г [9].

Значения R_f , приведенные в табл. 3, показывают, что элюирующие смеси I и II эффективны при разделении ПГ D_2 , E_2 и $F_{2\alpha}$, но непригодны для разделения пар ПГ A_2 и B_2 или $F_{2\beta}$ и 6-кето- $F_{1\alpha}$. Элюирующие смеси IV и V дают положительный эффект при разделении самых неполярных ПГ (A_2 и B_2) за счет уменьшения селективности к более полярным. Этого недостатка можно избежать повторным элюированием той же пластинки смесью I. В результате получается удовлетворительное разделение всех приведенных ПГ.

Разделение ПГ по ненасыщенности (ПГ E_1 и E_2) осуществлялось на пластинках «Силуфол», импрегнированных нитратом серебра. Пластинки проявлялись проявителем А. Значения R_f (табл. 4) определялись для следующих элюирующих систем:

- I — этиловый эфир уксусной кислоты;
- II — бензол:диоксан:уксусная кислота — 10:5:1;
- III — бензол:диоксан:уксусная кислота — 10:5:5;
- IV — этиловый эфир уксусной кислоты:метанол — 9:1;
- V — этиловый эфир уксусной кислоты:метанол — 9:2;
- VI — этиловый эфир уксусной кислоты:метанол:уксусная кислота:*n*-гексан:вода — 22:6:7:2:20 (органический слой).

Во всех вариантах было достигнуто хорошее разделение, но следует

Таблица 4

Значения R_f ПГ E_1 и E_2 на пластинках «Силуфол», импрегнированных $AgNO_3$

ПГ	R_f					
	I *	II *	III *	IV *	V *	VI *
E_1	0,15	0,25	0,34	0,38	0,50	0,64
E_2	0,10	0,12	0,20	0,29	0,43	0,35

* Номера элюирующих смесей.

Таблица 5

ВЭЖХ анализ ПГ в виде *n*-бромифениловых эфиров на «Партисиле»

Элюирующая смесь	Время удерживания ПГ, мин.											
	D_2	E_3	E_2	E_1	$F_{3\alpha}$	$F_{2\alpha}$	$F_{3\beta}$	$F_{1\alpha}$	$F_{2\beta}$	$F_{1\beta}$	B_2	A_2
I	5,8	8,3	9,8	11,4	—	21,3	—	—	—	—	—	—
II	—	—	—	—	11,8	14,0	16,5	18,0	19,8	24,5	—	—
III	—	—	—	—	8,7	9,9	11,7	13,5	15,0	18,9	—	—
IV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9,5	10,3
V	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	20,0	22,0

Примечания: I — хлористый метилен:ацетонитрил — 20:80; II — ацетонитрил; III — хлористый метилен:метанол — 95:5; IV — *n*-гексан-хлористый метилен:ацетонитрил:диметилформамид — 30:65:4:1; V — *n*-гексан-хлористый метилен:ацетонитрил — 70:20:10.

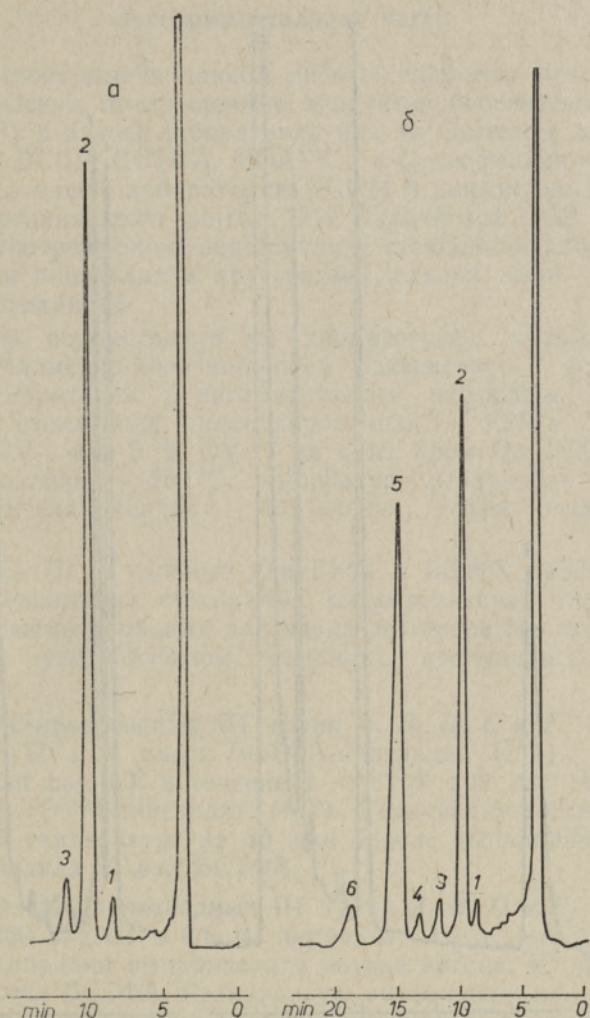


Рис. 2. Хроматограммы анализа смесей ПГ группы *E* (а) и группы *F* (б) с помощью ВЭЖХ на «Партисиле» в виде *n*-бромофенацильных эфиров: а — элюент хлористый метилен : ацетонитрил (20:80). 1 — ПГ E_3 , 2 — ПГ E_2 , 3 — ПГ E_1 ; б — элюент хлористый метилен : метанол (95:5). 1 — ПГ $F_{3\alpha}$, 2 — ПГ $F_{2\alpha}$, 3 — ПГ $F_{3\beta}$, 4 — ПГ $F_{1\alpha}$, 5 — ПГ $F_{2\beta}$, 6 — ПГ $F_{1\beta}$.

отметить, что в некоторых случаях (элюирующие смеси IV и V) получались пятна с хвостами.

Самые большие возможности для разделения ПГ различных групп и серий представляет ВЭЖХ. В случае применения УФ-детектора отдельной проблемой является подготовка проб, так как прямое детектирование возможно только при анализе ПГ групп *A*, *B* и *C*, содержащих двойную связь в цикlopentanовом кольце. Для ПГ остальных групп необходимо превращение их в производные, содержащие хромофорные группы, поглощающиеся в УФ-области. Такими производными являются *n*-нитрофенацильные [11] и *n*-бромофенацильные эфиры ПГ [12].

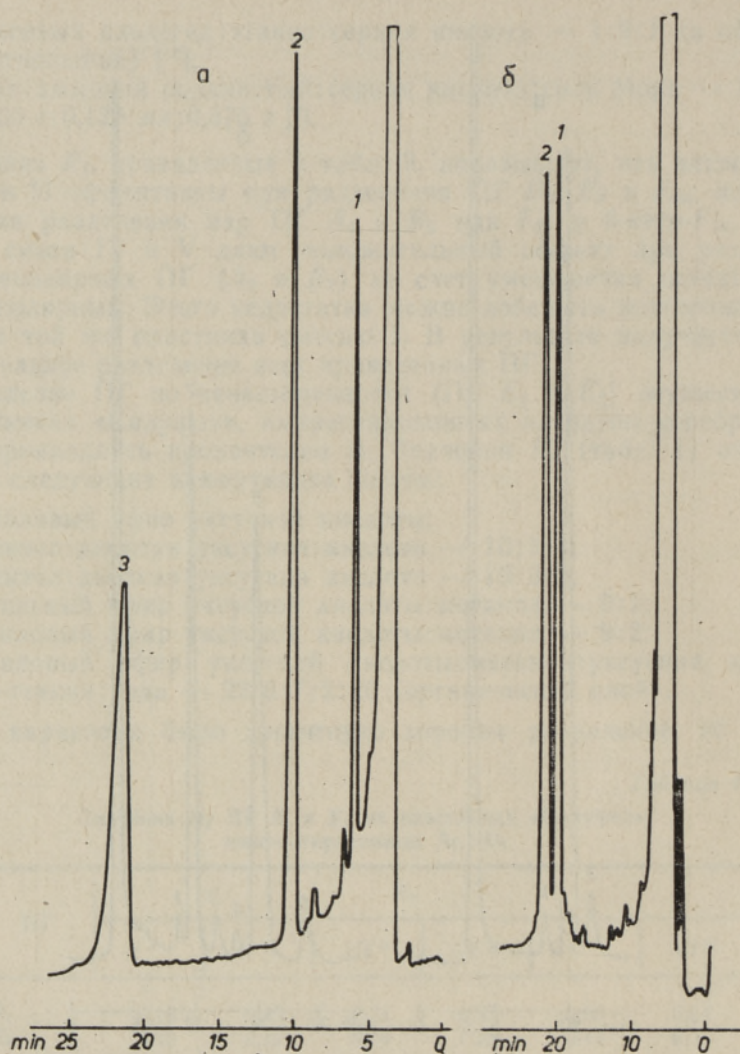


Рис. 3. Хроматограммы разделения смесей ПГ D_2 , E_2 , $F_{2\alpha}$ (а) и ПГ A_2 , B_2 (б) с помощью ВЭЖХ на «Партисиле» в виде *n*-бромифенацильных эфиров. а — элюент хлористый метилен : ацетонитрил (20 : 80). 1 — ПГ D_2 , 2 — ПГ E_2 , 3 — ПГ $F_{2\alpha}$; б — элюент *n*-гексан : хлористый метилен : ацетонитрил (70 : 20 : 10): 1 — ПГ B_2 , 2 — ПГ A_2 .

В данной работе ПГ анализировались в виде *n*-бромифенацильных эфиров. Были определены оптимальные условия для разделения некоторых представляющих практический интерес смесей ПГ на «Партисиле». Элюирующие смеси и времена удерживания различных ПГ даны в табл. 5.

Из приведенных результатов следует, что путем ВЭЖХ на силикагеле можно разделить индивидуальные ПГ группы *E* и *F*, отличающиеся степенью ненасыщенности (рис. 2). В изократном режиме элюирования легко разделяются также ПГ D_2 , E_2 и $F_{2\alpha}$ (рис. 3а). Самой трудноразделяемой, как и в случае ТСХ, оказалась пара ПГ A_2 и B_2 (рис. 3б).

Экспериментальная часть

Все ПГ, использованные в данной работе, получены методом биосинтеза или химическим превращением продуктов биосинтеза (ПГ A_2 , B_2 и ПГ группы F) в нашей лаборатории или на Опытном заводе Института химии АН ЭССР. БСТФА, МОАГХ и *n*-бромфенацилбромид были синтезированы в нашей лаборатории, ТСИМ и диизопропилэтиламин — в Институте органического синтеза АН Латвийской ССР. Все растворители перед употреблением перегоняли в стеклянной аппаратуре, при этом пиридин и пиперидин в присутствии едкого кали. Ацетонитрил очищали ректификацией.

ГЖХ анализ осуществляли на хроматографе «Хром-4» (ЧССР), снабженном пламенно-ионизационным детектором, нестандартным стеклянным испарителем и автоматическим цифровым интегратором И-02. Колонка стеклянная, силанизированная — 1,25 м × 3 мм; насадка — 5% OV-1 или 5 % OV-17 на «Газ Хром Q» (100—120 меш); температура колонки — 250°C; температура испарителя — 270°; скорость газа-носителя (гелий) — 40 мл/мин; объем вводимой пробы 1—2 мкл.

Превращение ПГ в удобные для ГЖХ и ВЭЖХ производные проводилось в специальных стеклянных микрореакторах (0,8 мл), снабженных резиновыми пробками для ввода реагентов без контакта с воздухом. Перед употреблением реакторы продувались очищенным аргоном.

Получение ТМС-производных ПГ групп A , B , D , E и F . 1) К 200 мкг ПГ добавляли 50 мкл смеси БСТФА-пиперидин (1:1). Реакционную смесь нагревали при 60° в течение 1 ч. 2) К 200 мкг ПГ добавляли 200 мкл смеси ТСИМ-пиперидин (1:1). Реакционную смесь оставляли при комнатной температуре на 30 мин. После выпаривания реагентов к остатку добавляли 50 мкл БСТФА.

Получение МО-ТМС-производных ПГ групп A , B , D и E . 5 мг МОАГХ добавляли к 300 мкг ПГ в 0,5 мл пиридина. После нагревания при 60° в течение 2 ч пиридин выпаривали в потоке аргона. К сухому остатку добавляли 50 мкл БСТФА. Реакционную смесь нагревали в течение 1 ч при 60°. Глубину протекания реакции определяли с помощью ТСХ на пластинках «Силуфол».

ТСХ анализ проводили на пластинках «Силуфол» размерами 5×15 см. Перед использованием пластинки промывали элюирующей смесью. Для импрегнирования силикагеля нитратом серебра пластинки погружали на 10 с в 5%-ный раствор нитрата серебра в ацетонитриле. Затем пластинки активировали при 110° в течение 1 ч и охлаждали в эксикаторе до комнатной температуры. Пробы, содержащие 10 мкг ПГ в 1 мкл хлороформа, наносили микрошприцем и элюировали до высоты подъема растворителя — 10 см. Пластинки сушили в потоке воздуха, опрыскивали проявителем и нагревали (при использовании проявителя А) при температуре 90° до проявления четких пятен с характерной окраской.

ВЭЖХ ПГ проводили на жидкостном хроматографе VKS-1A, сконструированном в СКБ АН ЭССР. Детектор — УД-3 (254 нм); колонка — 25 см × 4 мм; насадка «Партисил» (5 мкм). Анализы проводились при комнатной температуре со скоростью элюирования 85 мл/ч. Объем вводимой пробы — 5—25 мкл.

Получение *n*-бромфенациловых эфиров ПГ. К раствору 1 мг ПГ и

2,4—4,0 мг *p*-бромобензилбромида в 0,5 мл ацетонитрила добавляли 2 мкл диизопропилэтиламина, и оставляли раствор на 2 ч при комнатной температуре. Количественное протекание этерификации проверяли при помощи ТСХ.

Заклучение

Все хроматографические методы, использованные в настоящей работе, могут быть применены для контроля соответствующих технологических процессов производства ПГ. ТСХ, отличающаяся хорошей селективностью и характерными окрасками пятен ПГ разных групп, — самый оперативный метод идентификации индивидуальных ПГ, например, во фракциях при очистке ПГ при помощи колоночной хроматографии. Для количественного определения ПГ одной серии, например, в продуктах биосинтеза или химических превращений ПГ, целесообразно применять ГЖХ. Для определения чистоты конечных продуктов препаративного получения ПГ самый эффективный метод — ВЭЖХ, позволяющая полностью разделить и самые сложные смеси ПГ различных групп и серий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rosello, J., Tusell, J., Gelpi, E. Profiles of prostaglandins A, B, E and F (series I and II) obtained by gas chromatography with multiple-ion detection. — J. Chromatogr., 1977, v. 130, p. 65—76.
2. Nicosia, S., Galli, G. A rapid gas-chromatographic-mass-spectrometric method for prostaglandin analysis at picomole levels. — *Analyt. Biochem.*, 1974, v. 61, p. 192—199.
3. Пальм В. А. Введение в теоретическую органическую химию. М., 1974, с. 278.
4. Vane, F., Horning, M. G. Separation and characterization of the prostaglandins by gas chromatography and mass spectrometry. — *Analyt. Lett.*, 1969, v. 2, p. 357—371.
5. Fitzpatrick, F. A. Separation of prostaglandins and thromboxanes by gas-chromatography with glass capillary columns. — *Analyt. Chem.*, 1978, v. 50, p. 47—52.
6. Самель Н. Э., Мянник А. О., Лилле Ю. Э. Количественное определение простагландина $F_{2\alpha}$ в продуктах биосинтеза методом газовой хроматографии. — В кн.: Тез. докл. III всесоюз. конференции по аналит. химии, ч. II. Минск, 1979, с. 328—329.
7. Green, K., Samuelsson, B. Thin-layer chromatography of the prostaglandins. — *J. Lipid. Res.*, 1964, v. 5, p. 117—120.
8. Andersen, N. H. Preparative thin-layer and column chromatography of prostaglandins. — *J. Lipid. Res.*, 1969, v. 10, p. 316—319.
9. Gorman, R. R., Sun, F. F., Miller, O. V., Johnson, R. A. PGH_2 and H_2 convenient biochemical synthesis and isolation. Further biological and spectroscopic characterization. — *Prostaglandins*, 1977, v. 13, p. 1043—1053.
10. Kiefer, H. C., Johnson, C. R., Arora, K. L. Colorimetric identification of prostaglandins in subnanomole amounts. — *Analyt. Biochem.*, 1975, v. 68, p. 336—340.
11. Morozowich, W., Douglas, S. L. Resolution of prostaglandins *p*-nitrophenacyl esters by liquid chromatography and conditions for rapid, quantitative *p*-nitrophenacylation. — *Prostaglandins*, 1975, v. 10, p. 19—40.
12. Fitzpatrick, F. A. High performance liquid chromatographic determination of prostaglandins $F_{2\alpha}$, E_2 and D_2 from in vitro enzyme incubations. — *Analyt. Chem.*, 1976, v. 48, p. 499—502.

N. SAMEL, M. LÖHMUS, Reet ALISTE,
A. MANNIK, Ü. LILLE

PROSTAGLANDIINIDE ANALÜÜS GAASI-VEDELIK-, ÕHUKESE KIHII JA KÕRGSURVE-VEDELIKKROMATOGRAAFIA ABIL

Artiklis on käsitletud A-, B-, D-, E-, F-, G- ja H-grupi prostaglandiinide analüüsi: on esitatud andmed prostaglandiinide identifitseerimiseks nimetatud meetodite abil ja soovitud ühe või teise meetodi kasutamiseks prostaglandiinide tootmise tehnoloogiliste protsesside kontrolliks.

N. SAMEL, M. LÖHMUS, Reet ALISTE,
A. MANNIK, Ü. LILLE

SEPARATION OF PROSTAGLANDINS BY GAS-LIQUID, THIN-LAYER- AND HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Prostaglandins of the A, B, D, E, F, G and H groups were separated by gas-liquid, thin-layer and high performance liquid chromatography. The retention data are given and the possibilities of using chromatographic methods for prostaglandin manufacturing technology control are discussed.