

УДК 547.46 : 543.544

И. МАРТИН, Резт ВИЙДЕМАА, Н. САМЕЛЬ, Ю. ЛИЛЛЕ

## РАЗДЕЛЕНИЕ ПОЛИМЕРНОГО ПРОСТАГЛАНДИНА ПГВ<sub>x</sub> И ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ОЛИГОМЕРОВ

Олигомерное соединение ПГВ<sub>x</sub>, полученное из метилового эфира 15-дегидро-ПГВ<sub>1</sub> по присоединению Михаеля щелочным катализатором, защищает стареющие митохондрии от гипотонической и термической деградации *in vitro* [1-3] и является сильным ионофором Ca<sup>2+</sup> [4]. Кроме того, *in vivo* показано, что ПГВ<sub>x</sub> защищает миокард и головной мозг при гипоксимальных инсультах [5, 6]. Наивысшей активностью обладают олигомеры со средней молекулярной массой 2200—2500 (6—7 мономерных единиц) [7]. Однако разделение олигомеров с помощью гель-хроматографии на сефадексе LH-20 органическими элюентами нельзя считать удовлетворительным, поскольку получить кривую элюирования с дискретными максимумами не удалось [1]. В связи с этим при препаративном синтезе ПГВ<sub>x</sub> становятся важными проблемы разделения продуктов полимеризации и определения их молекулярных масс.

### Синтез ПГВ<sub>x</sub>

Щелочную деградацию биосинтетического ПГЕ<sub>1</sub> (7,05 ммоль) проводили по методике [8], образовавшиеся ПГВ<sub>1</sub> (6,97 ммоль) этерифицировали диазометаном. Для окисления гидроксильной группы в ω-цепи ПГВ<sub>1</sub> использовали пиридин хлорохромовокислый [9]. После хроматографирования продуктов окисления на силикагеле Л 40/100 мкм фирмы «Lachema» (ЧССР) (бензол и ацетон 100:5) получили 5,93 ммоль метилового эфира 15-дегидро-ПГВ<sub>1</sub>, который был охарактеризован с помощью УФ- и С<sup>13</sup> ЯМР-спектроскопии. Синтез ПГВ<sub>x</sub> и выделение его из реакционной смеси проводили по методике [1], но в целях увеличения доли ди-, три- и тетрамеров в конечном продукте время полимеризации сокращали до 15 мин.

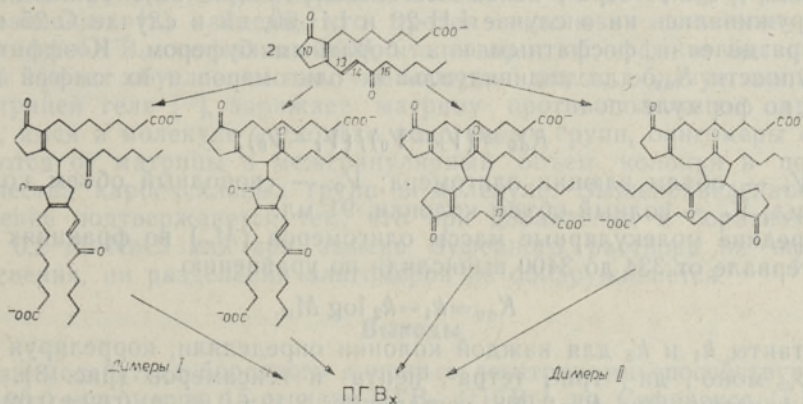


Рис. 1. Образование димеров 15-дегидро-ПГВ<sub>1</sub>, интермедиатов ПГВ<sub>x</sub>.

При полимеризации 15-дегидро-ПГВ<sub>1</sub> щелочным катализатором образуется два типа димеров в равных соотношениях [10] (рис. 1), так как вероятность образования карбанионов у С-10 и С-16 одинакова. Кроме того, в результате присоединения карбаниона к двойной связи у С-13 и у С-14 образуется по два изомера у димеров обоих типов [11].

### Разделение олигомеров

Для разделения продуктов полимеризации использовали пять геленосителей: Сефадексы LH-20, LH-60, G-25, G-50, G-75 фирмы «Pharmacia» (Швеция) и установку гель-хроматографии ЛКВ (Швеция), включающей насос «Varioprepex», коллектор фракций «Redi Rac» и УФ-детектор «Uvicord III» при 254 нм с двухканальным самописцем. Колонки (96×1,1 см) с LH-20 и LH-60 элюировали метанолом со скоростью 10 мл/ч, а с G-25, G-50 и G-75 50 мМ боратным и фосфатным буферными растворами при pH 9. Фракции отбирали через каждые 1,5 мл элюирования. Разделяемые смеси олигомеров (2 мг/мл) в метаноле или 50 мМ буферном растворе при pH 9, объемы которых не превышали 1% объема колонки, наносили в колонку автоматической пипеткой. Для приготовления элюентов использовали свежеперегнанный метанол, бидистиллят воды и реактивы.

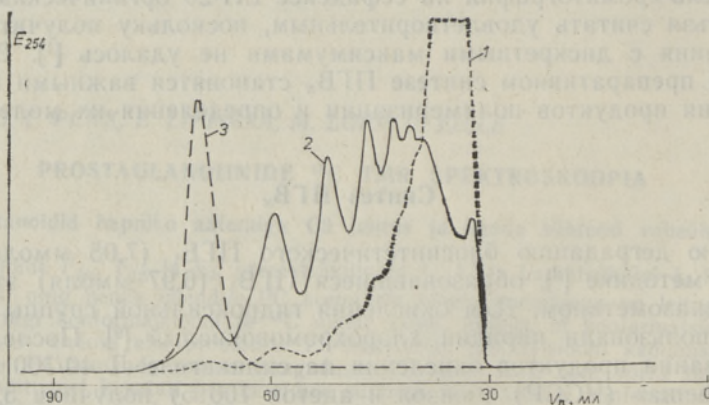


Рис. 2. Элюирование олигомеров на колонке с Сефадексом G-50: 1 — ПГВ<sub>x</sub> (время полимеризации 4 ч), 2 — ПГВ<sub>x</sub> (время полимеризации 15 мин), 3 — 15-дегидро-ПГВ<sub>1</sub>.

Наилучшее разделение олигомеров 15-дегидро-ПГВ<sub>1</sub> достигалось на Сефадексе G-50 боратным буфером. В этом случае удалось выделить пики ди-, три-, тетра-, пента- и гексамеров (рис. 2). Такие пики не обнаруживались ни в случае LH-20 и LH-60, ни в случае G-25 и G-75 при разделении фосфатным или боратным буфером. Коэффициенты доступности  $K_{av}$  для индивидуальных олигомеров и их смесей вычисляли по формуле

$$K_{av} = (V_r - V_0) / (V_t - V_0); \quad (1)$$

где  $V_r$  — объем элюции олигомера;  $V_0$  — свободный объем колонки, 31,2 мл;  $V_t$  — полный объем колонки, 91 мл.

Средние молекулярные массы олигомеров ( $M_w$ ) во фракциях по  $V_r$  в интервале от 334 до 3400 вычисляли по уравнению

$$K_{av} = k_1 - k_2 \log M_w. \quad (2)$$

Константы  $k_1$  и  $k_2$  для каждой колонки определяли, коррелируя  $K_{av}$  и  $\log M_w$  моно-, ди-, три-, тетра-, пента- и гексамеров (рис. 3). Величины констант при  $R=0,998$  составляют  $2,19 \pm 0,06$  и  $0,62 \pm 0,02$  соответственно.

Для определения коэффициента молярной экстинкции при 243 нм ( $\epsilon_{243}$ ) фракции олигомеров подкисляли до рН 3, экстрагировали этилацетатом и выпаривали. Затем фракции взвешивали и растворяли в этаноле. Зависимость  $\epsilon_{243}$  от молекулярной массы (рис. 4) носит нелинейный характер, что может быть обусловлено частичной экранизацией хромофорных группировок в молекуле олигомера. Эту возможность учитывали при определении концентрации олигомеров спектрофотометрическим методом.

После хроматографирования 25 мг продукта полимеризации установили, что выходы гекса- и гептамера из 15-дегидро-ПГВ<sub>1</sub> составляли 4 и 6% соответственно.

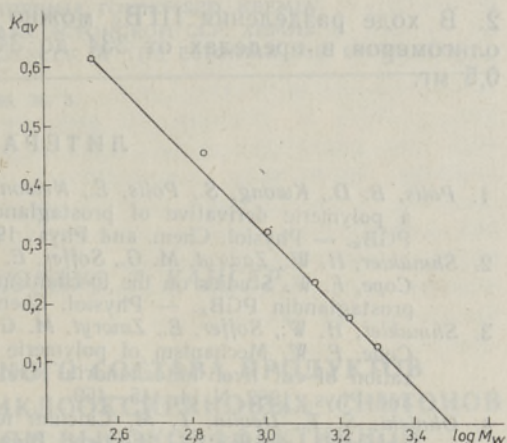


Рис. 3. Зависимость коэффициента доступности от молекулярной массы олигомеров на Сефадексе G-50.

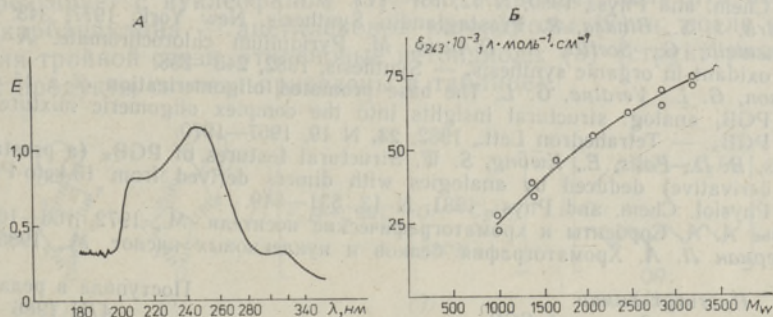


Рис. 4. УФ-абсорбционный спектр ПГВ<sub>x</sub> (А) и зависимость коэффициента молярной экстинкции при 243 нм от молекулярной массы олигомеров 15-дегидро-ПГВ<sub>1</sub> в этаноле (Б).

### Обсуждение

Разделение олигомеров ПГВ<sub>x</sub>, достигнутое на G-50, оказалось несколько неожиданным, так как этот гель предусмотрен для фракционирования декстранов с молекулярными весами от 500 до 10 000 [12]. Однако по уравнению (2) найдено, что предел эксклюзии для олигомеров 15-дегидро-ПГВ<sub>1</sub> составляет 3400, что говорит об эффекте вытеснения. Такой эффект обусловлен тем, что боратный анион, образуя комплексы с матрицей геля [13], заряжает матрицу противоположным зарядом. Итак, имея в молекуле несколько ионогенных групп, олигомеры отталкиваются от матрицы в межгранулярный объем колонки в порядке количества карбоксильных групп в молекуле. Вышеприведенное рассуждение подтверждается тем, что при добавлении к боратному буферу 0,2 М NaCl или при замене буферного раствора ни эффекта вытеснения, ни разделения олигомеров не обнаруживается.

### Выводы

1. Взаимодействие боратного аниона с декстранами способствует разделению олигомеров 15-дегидро-ПГВ<sub>1</sub> (ПГВ<sub>x</sub>) на Сефадексе G-50 боратным буфером при рН 9.

2. В ходе разделения ПГВ<sub>x</sub> можно определить молекулярные массы олигомеров в пределах от 334 до 3400 при их количестве менее чем 0,5 мг.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Polis, B. D., Kwong, S., Polis, E., Nelson, G., Shmukler, H. W.* Studies on PGB<sub>x</sub>, a polymeric derivative of prostaglandin B<sub>1</sub>. 1. Synthesis and purification of PGB<sub>x</sub>. — *Physiol. Chem. and Phys.*, 1979, N 11, 109—123.
2. *Shmukler, H. W., Zawryt, M. G., Soffer, E. F., Polis, E., Feely, W. M., Kwong, S. W., Cope, F. W.* Studies on the mechanism of mitochondrial protection by polymeric prostaglandin PGB<sub>x</sub>. — *Physiol. Chem. and Phys.*, 1982, N 14, 471—486.
3. *Shmukler, H. W., Soffer, E., Zawryt, M. G., Polis, E., Feely, W. M., Kwong, S. W., Cope, F. W.* Mechanism of polymeric prostaglandin PGB<sub>x</sub> for *in vitro* stabilization of rat liver mitochondrial oxidative phosphorylation. — *Physiol. Chem. and Phys.*, 1982, N 14, 445—469.
4. *Ohnishi, S. T., Devlin, T. M.* Calcium ionophore activity of a prostaglandin B<sub>1</sub> derivative (PGB<sub>x</sub>). — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, 89, 240—245.
5. *Polis, E., Cope, F. W.* Polymeric prostaglandin PGB<sub>x</sub> and other prostaglandin polymers prolong survival of the heart of the hypoxic mouse. — *Aviation, Space and Environ. Med.*, 1983, 54, 420—424.
6. *Kolata, R. J., Polis, B. D.* Facilitation of recovery from ischemic brain damage in rabbits by polymeric prostaglandin PGB<sub>x</sub>, a mitochondrial protective agent. — *Physiol. Chem. and Phys.*, 1980, N 12, 545—555.
7. *Polis, B. D., Kwong, S., Polis, E., Nelson, G. L.* PGB<sub>x</sub>: an oligomeric derivative of prostaglandin B<sub>1</sub>: physical, chemical and spectral properties. — *Physiol. Chem. and Phys.*, 1980, N 12, 167—177.
8. *Bindra, J. S., Bindra, R.* Prostaglandin Synthesis. New York, 1977, 343.
9. *Piancatelli, G., Scettri, A., D'Auria, M.* Pyridinium chlorochromate. A versatile oxidant in organic synthesis. — *Synthesis*, 1982, 245—258.
10. *Nelson, G. L., Verdine, G. L.* The base promoted oligomerization of a 15-dehydro-PGB<sub>1</sub> analog: structural insights into the complex oligomeric mixture termed PGB<sub>x</sub>. — *Tetrahedron Lett.*, 1982, 23, N 19, 1967—1970.
11. *Polis, B. D., Polis, E., Kwong, S. W.* Structural features of PGB<sub>x</sub> (a prostaglandin derivative) deduced by analogies with dimers derived from 15-keto-PGB<sub>1</sub>. — *Physiol. Chem. and Phys.*, 1981, N 13, 531—549.
12. *Лурье А. А.* Сорбенты и хроматографические носители. М., 1972, 160—162.
13. *Остерман Л. А.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М., 1985, 117.

Институт химии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
4/II 1986

I. MARTIN, Reet VIIIDEMAA, N. SAMEL, Ü. LILLE

#### POLUMEERSE PROSTAGLANDIINI PGB<sub>x</sub> LAHUTAMINE JA MOLEKULMASSI MÄÄRAMINE

On sünteesitud füsioloogiliselt aktiivne, polümeerne prostaglandiin PGB<sub>x</sub> üle 15-dehüdro-PGB<sub>1</sub>, lähtudes biosünteetilisest PGB<sub>1</sub>-st. PGB<sub>x</sub> aktiivsed fraktsioonid eraldati polümeeri segust geelkromatograafia abil Sephadex G-50 kolonnis 50 mM boraatpuhvriga pH 9 juures. Leiti, et füsioloogiliselt aktiivseid oligomeere (heksa- ja heptameere) tekib vastavalt 4 ja 6%, lähtudes 15-dehüdro-PGB<sub>1</sub>-st. Oligomeeride molekulmassid vahemikus 334 kuni 3400 määrati väljumismahtude järgi eelnevalt kalibreeritud kolonni abil.

I. MARTIN, Reet VIIIDEMAA, N. SAMEL, Ü. LILLE

#### SEPARATION AND MOLECULAR WEIGHT DETERMINATION OF POLYMERIC PROSTAGLANDIN PGB<sub>x</sub>

Synthesis of biologically active prostaglandin PGB<sub>x</sub>, an oligomeric derivative of 15-dehydro-PGB<sub>1</sub>, was performed. Separation of active components from the polymerization mixture by gel chromatography on Sephadex G-50 with 50 mM borate buffer, pH 9, was successful. The yield of biologically active hexa- and heptamers was 4 and 6 per cent, respectively. The molecular weights of oligomers within the range of 334—3400 were determined by their elution volumes from the precalsibrated column.