

EESTI NSV TEADUSTE AKADEEMIA TOIMETISED, 25. KÕIDE
KEEMIA * GEOLOOGIA 1976, Nr. 2ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ЭСТОНСКОЙ ССР. ТОМ 25
ХИМИЯ * ГЕОЛОГИЯ. 1976, № 2

УДК 547.26'118

Я. ЯРВ, А. ААВИКСААР

ОЧИСТКА ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ТИОЭФИРОВ
МЕТОДОМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИJ. JÄRV, A. AAVIKSAAR. VEDELIK-KROMATOGRAAFILINE MEETOD FOSFORORGAANILISTE
TIOESTRITE PUHASTAMISEKSJ. JÄRV, A. AAVIKSAAR. LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE PURIFICATION OF
ORGANOPHOSPHORUS THIOESTERS

Предложен хроматографический метод очистки фосфорорганических

тиоэфиров типа $\begin{array}{c} A \quad O \\ \diagdown \quad // \\ P \\ \diagup \quad \diagdown \\ B \quad SX \end{array}$ (1), которые известны как необратимые

ингибиторы сериновых эстераз и с успехом применяются при исследовании топографии активных центров этих ферментов [1-3]. В литературе [4-9], однако, встречаются случаи неправильной интерпретации экспериментальных данных по антиферментному действию фосфорорганических соединений вследствие того, что использованные препараты содержали примеси, по своей ингибиторной активности сильно превышающие основные компоненты. Это обстоятельство заставляет обратить особое внимание на чистоту применяемых фосфорорганических ингибиторов.

В ряде работ [5, 8, 9] показано, что вакуумная перегонка не является эффективным средством для очистки ингибиторных препаратов от активных примесей, которые могут образоваться как побочные продукты в ходе синтеза, а также в результате разложения вещества в процессе перегонки. Предлагаемый в настоящей работе жидкостно-хроматографический метод более селективен и допускает свободный выбор достаточно низких температур проведения очистки во избежание разложения вещества.

Для описания методики представлены данные по очистке О,О-диэтил-S-(β-этилмеркаптоэтил)тиофосфата. Соединение было получено реакцией 0,05 моля О,О-диэтилхлорфосфата с соответствующим меркаптидом натрия (0,065 моля) в бензоле [10]. После завершения синтеза реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, промывали водой, сушили над безводным сульфатом натрия и затем удаляли растворитель в вакууме. Полученный остаток очищали хроматографически на колонке размерами 2,5 × 105 см. В качестве носителя использовался силикагель марки L40/100 μ (Сетарол). Элюирование проводилось смесями ацетона и гексана (1:4) или ацетона и циклогексана (1:3; по объему). Использованные растворители были предварительно очищены перегонкой. Скорость элюирования 0,8—1,0 мл/мин.

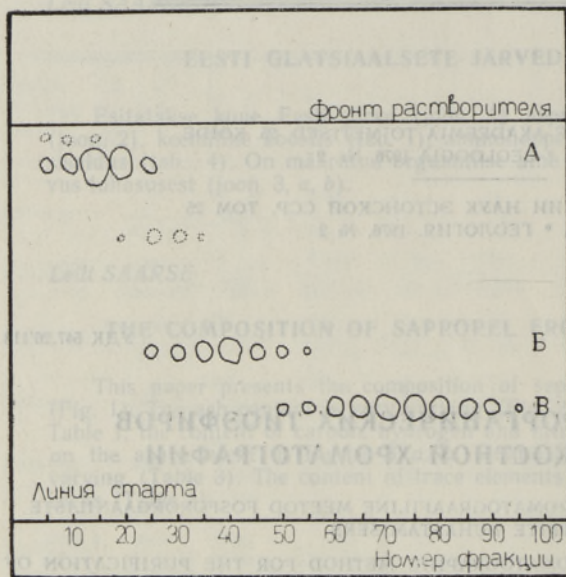


Рис. 1. Тонкослойная хроматография фракций, полученных при разделении продуктов синтеза на колонке силикагеля. При препаративном разделении и при анализе в качестве элюента использовалась смесь ацетона и циклогексана (1:3; по объему).

матогамме показано пунктирной линией. При увеличении продолжительности нагревания во время синтеза число и концентрация минорных компонентов увеличивались. Наличие многих компонентов в продукте синтеза, однако, не мешало выделению в чистом виде компонента *B*, который является интересующим нас тиоэфиром — $(C_2H_5O)_2P(O)SC_2H_4SC_2H_5$ (хроматограмму разделения см. на рис. 2).

Фракции, содержащие только компонент *B*, объединяли, и растворитель удаляли в вакууме. Остаток растворяли в абсолютном диэтиловом эфире и обрабатывали активированным углем два раза. После удаления

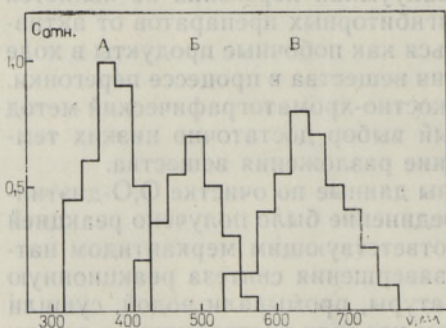


Рис. 2. Хроматограмма препаративного разделения продуктов синтеза фосфотиоэфира $(C_2H_5O)_2P(O)SC_2H_4SC_2H_5$ на колонке силикагеля. Относительные концентрации веществ, $S_{отн.}$, оценивались по диаметру пятен на тонкослойной хроматограмме.

Для анализа содержания получаемых фракций применялась тонкослойная хроматография на пластинках «Силуфол УВ 254» (размеры 15×15 см). В качестве растворителя использовалась смесь ацетона и циклогексана (1:3; по объему). Пятна на хроматограммах обнаруживали при облучении последних ультрафиолетовым светом или после проявления их парами иода. Оба метода дали одинаковое количество зон.

Результаты анализа фракций, полученных при разделении продуктов синтеза на колонке с силикагелем, приведены на рис. 1, откуда видно, что из колонки элюируются три основных (*A*, *B*, и *V*) и два минорных компонента, расположение которых на хроматограмме показано пунктирной линией. При увеличении продолжительности нагревания во время синтеза число и концентрация минорных компонентов увеличивались. Наличие многих компонентов в продукте синтеза, однако, не мешало выделению в чистом виде компонента *B*, который является интересующим нас тиоэфиром — $(C_2H_5O)_2P(O)SC_2H_4SC_2H_5$ (хроматограмму разделения см. на рис. 2).

Фракции, содержащие только компонент *B*, объединяли, и растворитель удаляли в вакууме. Остаток растворяли в абсолютном диэтиловом эфире и обрабатывали активированным углем два раза. После удаления избытка эфира вещество выдерживали в течение нескольких дней в вакууме над пропитанной апиезоном фильтровальной бумагой. Компонент *B* идентифицирован на основании следующих данных: 1) в инфракрасном спектре обнаружены полосы поглощения групп $P=O$ при 1258 см^{-1} , $P-O-C$ при 1023 см^{-1} и $P-O-C_2H_5$ при 1164 см^{-1} [11, 12]; 2) константа скорости щелочного гидролиза при 25°C ($k_{OH} = (1,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}\text{ M}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$) согласуется с приведенным в литературе [13] значением ($1,4 \cdot 10^{-2}\text{ M}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$), и при гидролизе выделяется меркаптан $C_2H_5SC_2H_4SH$ в стехиометрическом количестве (спектрофотометрическое титрование [14]); 3) результаты элементарного анализа согласуются с

бруттоформулой $C_8H_{19}O_3S_2P$. Найдено, %: С 37,35, 37,22; Н 7,32, 7,38; N 0,01, 0,00; O 18,58, 18,56; P 12,2. Вычислено, %: С 37,19; Н 7,43; O 18,58; P 11,99.

Кроме указанных на рис. 1 компонентов, в ходе синтеза образовалось соединение, R_f для которого при тонкослойной хроматографии была равна нулю. В использованных условиях препаративного разделения это вещество не элюировалось из колонки. Его строение, как и строение компонента *B* и минорных компонентов, не было установлено. Компонент *A* на рис. 1 был идентифицирован как исходный меркаптан (по содержанию свободных —SH-групп и по величинам R_f , согласующимся с R_f для $C_2H_5SC_2H_4SH$ при разных соотношениях полярного и неполярного растворителей в элюенте).

Важно отметить, что при нагревании хроматографически чистого вещества $(C_2H_5O)_2P(O)SC_2H_4SC_2H_5$ на тонкослойной хроматограмме появляются различные пятна, количество и расположение которых зависят от температуры и времени нагревания. При длительном хранении тиоэфиров эти процессы разложения, приводящие к уменьшению концентрации P—S-связей в препаратах, могут иметь значение уже при комнатной и даже более низких температурах. Описанная в настоящем сообщении хроматографическая методика очистки фосфорорганических тиоэфиров, отличающаяся удобством и простотой аппаратуры, может с успехом применяться для рутинной очистки частично разложившихся при хранении ингибиторных препаратов перед их употреблением в ферментативных реакциях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кабачник М. И., Абдувахабов А. А., Агабекова И. И., Бресткин А. П., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Годына Е. И., Михайлов С. С., Михельсон М. Я., Розенгарт В. И., Розенгарт Е. В., Ситкевич Р. В., Успехи химии, **34**, 1050 (1970).
2. Аавиксаар А. А., Автореф. канд. дис., Тарту, 1968.
3. Федосеев В. Н., Аавиксаар А. А., Абдувахабов А. А., Реакц. способности орг. соедин., **10**, 3(37), 849 (1973).
4. Maglothlin J. A., Wilson I. B., Biochemistry, **13**, 3520 (1974).
5. Aldridge W. N., Davison A. N., Biochem. J., **51**, 62 (1952).
6. Gardner K., Heath D. F., Anal. Chem., **25**, 1849 (1953).
7. О'Брайн Р., Токсичные эфиры кислот фосфора, М., 1963, с. 72—90.
8. Macpherson J. B., Johnson G. A., J. Agric. Food Chem., **4**, 42 (1956).
9. Gazzard M. F., Sainsbury G. L., Swanston D. W., Sellers D., Watts P., Biochem. Pharmacol., **23**, 751 (1974).
10. Bracha P., O'Brien D., Biochemistry, **7**, 1545 (1968).
11. Беллами Л., Инфракрасные спектры сложных молекул, М., 1963, гл. 18.
12. Thomas L. C., Interpretation of the Infrared Spectra of Organophosphorus Compounds, Heyden, 1974.
13. Larsson L., Svensk. Kem. Tidskr., **70**, 405, (1958).
14. Лангель Ю., Ярв Я., Аавиксаар А., Ученые записки Тартуского государственного университета. Тр. по химии, **9** (332), 172 (1974).

Институт кибернетики
Академии наук Эстонской ССР
Тартуский государственный университет

Поступила в редакцию
8/V 1975