

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



ŠPELA KERT

**SINTEZA IN IZOLACIJA REDUCIRANIH DERIVATOV
PROGESTERONA**

**SYNTHESIS AND ISOLATION REDUCED PRODUCTS OF
PROGESTERONE**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani pod mentorstvom docenta dr. Jožka Cesarja.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju docentu dr. Jožku Cesarju za strokovne nasvete ter pomoč pri izdelavi magistrske naloge.

Zahvala je namenjena tudi domačim in prijateljem, ki so mi ves čas študija stali ob strani in me podpirali. Predvsem je zahvala namenjena Urški Požgan, ki me je ves čas bodrila.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom docenta dr. Jožka Cesarja.

Špela Kert

Predsednica diplomske komisije:

izr. prof. dr. Marija Bogataj

Član diplomske komisije:

asist. dr. Ilija Ilić

Ljubljana, oktober 2013

KAZALO

POVZETEK	1
ABSTRACT	3
SEZNAM OKRAJŠAV	5
1. UVOD	6
1.1. Progesteron.....	6
1.1.1. Biosinteza in pretvorbe progesterona	6
1.1.2. Vloga in učinki progesterona	6
1.2. Kromatografija	10
1.2.1. Razdelitev metod glede na mobilno fazo in stacionarno fazo.....	11
1.3. Kolonska kromatografija	12
1.4. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti	12
1.5. Preparativna kromatografija in prehod iz analitske na preparativno tekočinsko kromatografijo	14
1.6. Jedrska magnetna resonanca	18
1.7. Masna spektrometrija.....	19
2. NAMEN DELA.....	20
3. MATERIALI IN METODE.....	21
3.1. Reagenti in topila.....	21
3.2. Aparature.....	22
3.2.1. Aparatura za izvedbo sinteze	22
3.2.2. Aparatura za HPLC	23
3.2.3. Aparatura za »flash« kromatografijo	23
4. EKSPERIMENTALNI DEL	25
4.1. Sintezni postopki za redukcijo progesterona.....	26
4.1.1. Redukcija z aluminijevim izopropoksidom ($\text{Al}(\text{iPrO})_3$) – Sinteza 1	26
4.1.2. Redukcija z natrijevim borhidridom (NaBH_4) – Sinteza 2	27
4.2. Kromatografski pogoji za preverjanje sestave vzorcev s HPLC	27
4.3. Ločba reduciranih derivatov progesterona s »flash« kromatografijo	30
4.4. Ločba reduciranih derivatov progesterona s preparativno HPLC	32
4.5. Izolacija in karakterizacija posameznih reduciranih derivatov progesterona	33
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	34
5.1. Redukcija progesterona.....	34

5.2.	Preverjanje sestave reakcijske zmesi s HPLC.....	36
5.3.	Ločevanje derivatov s »flash« kromatografijo.....	40
5.4.	Ločba derivatov s preparativno HPLC	43
5.5.	Identifikacija izoliranih derivatov z NMR spektroskopijo in masno spektrometrijo.....	45
6.	SKLEP	52
7.	LITERATURA.....	53

POVZETEK

Progesteron (pregn-4-en-3,20-dion; P4) je naravni človeški steroidni hormon, ki spada v skupino progestogenov. Njegova glavna funkcija je omogočanje zanositve in ohranjanje nosečnosti, zato ga imenujemo tudi »hormon nosečnosti«. Največ progesterona najdemo pri ženskah v rodnem obdobju, pri katerih se njegova koncentracija tekom menstrualnega cikla spreminja, zlasti pa se poviša tekom nosečnosti. V manjši meri je prisoten v času otroštva in starosti ter pri moških. Sam progesteron služi tudi kot prekurzor drugih steroidnih hormonov, ki iz njega nastajajo, zato je za človeški organizem esencialen.

V tkivih se progesteron metabolizira pod vplivom različnih encimov do številnih metabolitov, za katere novejša raziskave kažejo, da imajo tudi sami pomemben vpliv na biokemijske procese v celicah. Na tkivih dojke so ugotovili, da metabolit, ki nastaja pod vplivom encima 5α -reduktaze, pospešuje nastanek in rast rakavih celic, medtem ko metaboliti, ki nastajajo pod vplivom hidroksteroidnih oksidoreduktaz, njihovo rast zavirajo.

Za študij metabolizma progesterona in bioloških učinkov njegovih metabolitov je pomembna razpoložljivost derivativ, s katerimi dokazujemo metabolno razgradnjo progesterona. Gre za strukturno kompleksne spojine, ki pogosto pri komercialnih ponudnikih niso na voljo, ali pa je njihova kakovost nezadovoljiva.

V okviru magistrskega dela smo pripravili štiri reducirane derivate progesterona, ki nastanejo po redukciji obeh karbonilnih skupin matičnega hormona. Strukturno so si medsebojno zelo podobni, saj se razlikujejo le po orientaciji nastalih hidroksilnih skupin ($3\alpha,20\alpha$; $3\alpha,20\beta$; $3\beta,20\alpha$ in $3\beta,20\beta$). Samo redukcijo smo izvedli po predhodno opisanem postopku z uporabo aluminijevega izopropoksida ($\text{Al}(\text{iPrO})_3$). Uporaba NaBH_4 kot reducenta se je izkazala za manj primerno, saj sta nastala samo dva izmed štirih možnih derivatov. Posamezne derivate smo medsebojno ločili s pomočjo kolonske tako imenovane »flash« kromatografije, kjer smo reakcijsko zmes ločevali na reverznofaznih kolonah. Sestavo frakcij smo preverjali s HPLC ter tiste, ki so vsebovale čiste spojine, združili ter jih liofilizirali. Na ta način smo uspeli izolirati tri čiste derivate, zaradi medsebojnega prekrivanja vrhov z ostalimi pa metoda ni bila uspešna za tistega, ki ga je nastalo najmanj in je predstavljal drugi vrh na kromatogramu. Tega smo v nadaljevanju izolirali z uporabo preparativne HPLC. Strukturno pripravljenih derivatov smo potrdili z NMR spektroskopijo in masno spektrometrijo. Pridobili smo zadostne količine (nekaj mg do nekaj 100 mg) vseh

štirih reduciranih derivatov v kemijsko čisti obliki, ki nam bodo omogočile raziskave njihovih koncentracij v tkivih in študij njihovih učinkov *'in vivo'*.

ABSTRACT

Progesterone (pregn-4-ene-2,30-dione; P4) is a naturally occurring human steroid hormone that belongs to the class of hormones called pregestogens. It is also called the »hormone of pregnancy« since its main function is to support pregnancy. In women, progesterone levels change during different phases of menstrual cycle and if the pregnancy occurs the amount of progesterone increases. On the other hand, progesterone levels are relatively low during childhood and in postmenopausal women. In adult men its level is also relatively low. Progesterone plays a crucial role as precursor for the synthesis of other steroid hormones. Progesterone is widely metabolized under actions of numerous enzymes in many human tissues and cell lines. Recent studies revealed important role of progesterone metabolites showing that they have important role in many biochemical processes within cells. In addition, »*in vitro*« studies on a number of breast cell lines indicate that metabolites from 5 α -reductase promote cancer metastasis, whereas metabolites from hydroxysteroid oxidoreductases reduce cell proliferation and cancer metastasis.

Biological studies of progesterone metabolites greatly depend on their availability as pure chemical compounds. These chemical derivatives are usually quite complex and are not always commercially available or their quality is insufficient.

The aim of our work was to prepare four progesterone derivatives (metabolites) by chemical reduction of both carbonyl groups of progesterone. All four derivatives are structurally similar. Only differences between them are in the orientations of hydroxyl groups at position 3 and 20 (3 α ,20 α ; 3 α ,20 β ; 3 β ,20 α and 3 β ,20 β). Chemical reduction of progesterone was performed according to previously described procedure with aluminium isopropoxide (Al(iPrO)₃). Use of the different reducing agent (NaBH₄) was not adequate since only two out of four derivatives were formed. Separation and isolation of the derivatives was performed with the reverse-phase »flash« chromatography. Fractions after separation were analysed by HPLC method and those containing pure chosen derivative were combined and lyophilized. Three of four derivatives were prepared according to the described procedure. The fourth derivative was isolated using the preparative HPLC chromatography due to the insufficient separation with flash chromatography. Chemical structures of all four derivatives were confirmed with the NMR spectroscopy and MS spectrometry.

Sufficient quantities of all four progesterone derivatives in chemically pure forms were obtained. These will enable further studies of their biological role in different tissues and will contribute to better understanding of progesterone role in human health and disease.

SEZNAM OKRAJŠAV

CV	volumen kolone
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
MF	mobilna faza
MS	masna spektrometrija
NMR	jedrska magnetna resonanca
P4	progesteron
RT	retencijski čas
THF	tetrahidrofuran
USP	farmakopeja Združenih držav Amerike (<i>United States Pharmacopeia</i>)
20 α -HSO	20 α -hidroksisteroid oksidoreduktaza
20 α -HP	20 α -hidroksiprogesteron
3 α -DHP	3 α -hidroksi-pregn-4-en-20-on
3 α -HSO	3 α -hidroksisteroid oksidoreduktaza
3 α HP	3 α -hidroksiprogesteron
3 β -HSO	3 β -hidroksisteroid oksidoreduktaza
5 α P	5 α -dihidroprogesteron
3 α ,20 α -P4	3 α ,20 α -dihidroksiprogesteron
3 α ,20 β -P4	3 α ,20 β -dihidroksiprogesteron
3 β ,20 α -P4	3 β ,20 α -dihidroksiprogesteron
3 β ,20 β -P4	3 β ,20 β -dihidroksiprogesteron

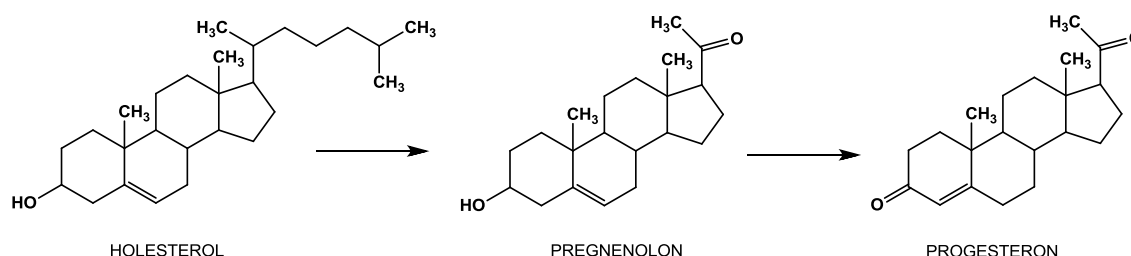
1. UVOD

1.1. Progesteron

Progesteron (P4) je naravni človeški steroidni hormon, ki spada v skupino tako imenovanih progestogenov (1). Progestogeni so eden izmed petih glavnih razredov steroidnih hormonov, kamor spadajo še estrogeni, androgeni, mineralokortikosteroidi in glikokortikosteroidi. Poimenovani so po svoji glavni funkciji, to je ohranjanju nosečnosti, čeprav so prisotni tudi sicer skozi celotno življenjsko obdobje. Njihova koncentracija se tekom različnih faz menstrualnega ciklusa spreminja. Najpomembnejši predstavnik je P4 (2).

1.1.1. Biosinteza in pretvorbe progesterona

Pri sesalcih P4 nastane iz pregnenolona, tako kot tudi vsi ostali steroidni hormoni. Osnovni gradnik za pregnenolon je holesterol, kateremu se s pomočjo oksidacije odcepi stranska veriga na položaju C-22. Reakcijo oksidacije katalizira encim citokrom P450_{sc}. Pretvorba pregnenolona v P4 poteka v dveh korakih in sicer v prvem koraku se oksidira hidroksilna skupina na mestu 3 do keto skupine. Reakcijo v tem primeru katalizira 3- β hidroksisteroid dehidrogenaza. V drugem koraku se dvojna vez premakne iz C5 na C4 s pomočjo $\delta(5)$, $\delta(4)$ izomeraze (slika 1) (2).



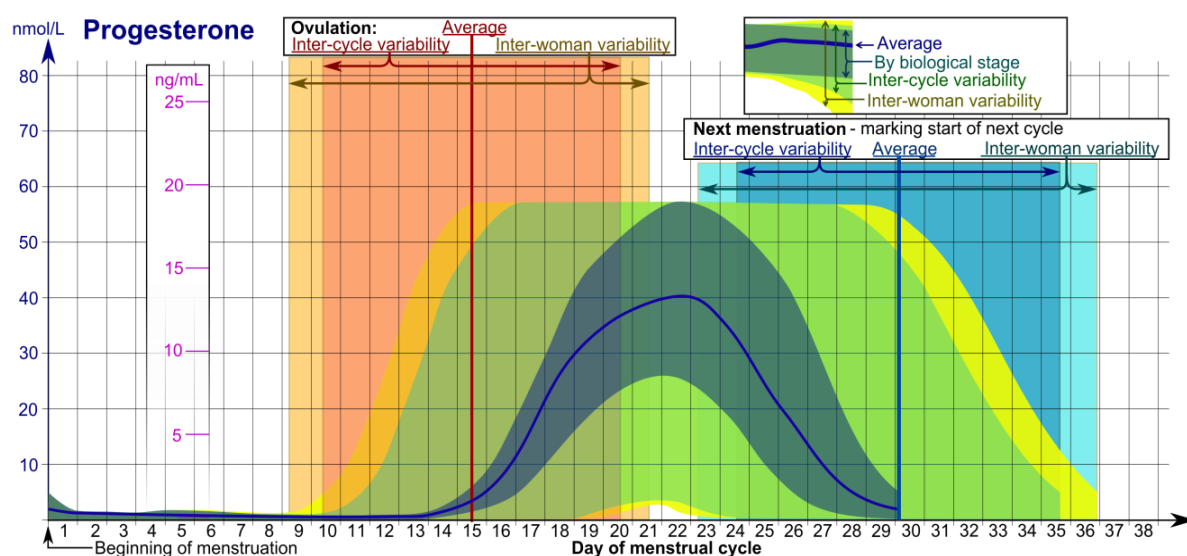
Slika 1: Nastanek P4 iz pregnenolona, ki nastane iz holesterola (povzeto po 2)

Iz navedenih biosinteznih poti lahko sklepamo, da je P4 pri sesalcih esencialen (ali ključen) gradnik oziroma prekursor za druge hormone, ki so potrebni za delovanje našega organizma. Pomanjkanje P4 lahko pripelje do številnih posledic (3).

1.1.2. Vloga in učinki progesterona

Največje nihanje P4 zasledimo v ženskem organizmu, saj se raven P4 poveča v času ovulacije (slika 2). V primeru zanositve se raven P4 v telesu še dodatno poveča in

omogoča donositev otroka. Po rojstvu otroka in v času dojenja se količina P4 znižuje na raven pred zanositvijo. V primeru, ko ženska ne zanosi, se količina P4 vrne v prvotno stanje. Pri tem opazimo periodično gibanje različnih vrednosti P4 v mesečnem obdobju. Nižje vrednosti P4 pa zasledimo v času otroštva in pri starejši populaciji. Med drugim P4 najdemo v moškem organizmu (1).



Slika 2: Spreminjane koncentracije P4 v času menstrualnega ciklusa. Črta prikazuje povprečno vrednost gibanja P4 tekom menstrualnega ciklusa (1).

P4 včasih imenujemo tudi »hormon nosečnosti«, ker igra pomembno vlogo pri sami zanositvi in pri razvoju ploda. Maternico pripravi na ugnezditev oplojenega jajčeca, hkrati vpliva na epitelne celice v nožnici in na količino izločanja sluzi v materničnem vratu. V primeru, ko do zanositve ne pride, se raven P4 zniža, sproži se menstrualni cikel in do razvoja rumenega telesca ne pride (1). Rumeno telesce pod vplivom hipofize izloča P4 ter spolne organe pripravlja na nosečnost (4).

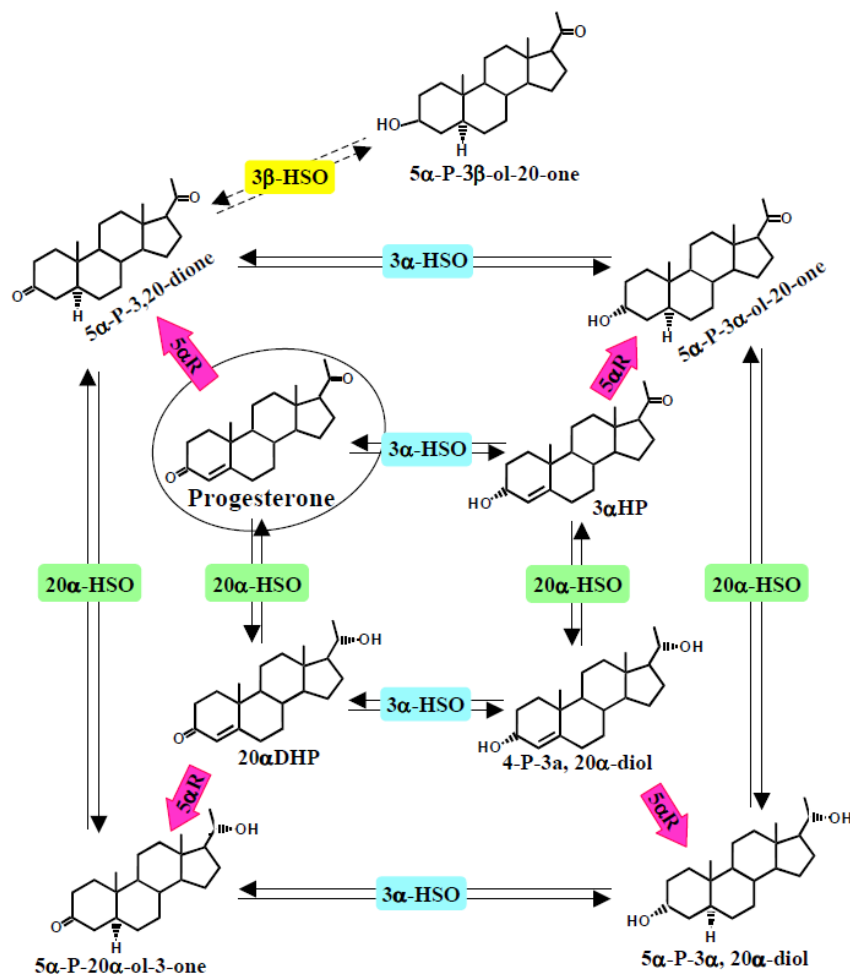
Raziskave vloge in učinkov P4 v organizmu so pokazale, da lahko P4 zmanjša možganske edeme, vnetja, nekroze tkiv in celično smrt po travmatski poškodbi možganov. Potencialna terapevtska uporaba P4 je omejena z njegovo slabo topnostjo v vodi. Z namenom povečanja vodotopnosti P4 so pripravili številne analoge P4 in jih nato »in vitro« ovrednotili na živalih. Raziskave so pokazale, da so analogi prav tako učinkoviti pri zmanjšanju možganskega edema kot P4 (5).

Znanstveniki so v 70-tih letih prejšnjega stoletja odkrili, da je lahko P4 v posameznih tkivih substrat za enega ali več metabolnih encimov, od katerih vsak deluje na točno

določeno mesto v molekuli. Njihovo mnenje je bilo, da ti encimi skrbijo le za vzdrževanje ustrezne koncentracije P4 v tkivih oziroma za vzpostavljanje tako imenovanega mikrookolja. V človeških tkivih dojk so tako odkrili naslednje metabolne encime P4: 5 α -reduktazo, 3 α -hidroksisteroid oksidoreduktazo (3 α -HSO), 3 β -hidroksisteroid oksidoreduktazo (3 β -HSO), 20 α -hidroksisteroid oksidoreduktazo (20 α -HSO) in 6 α -hidroksilazo (6).

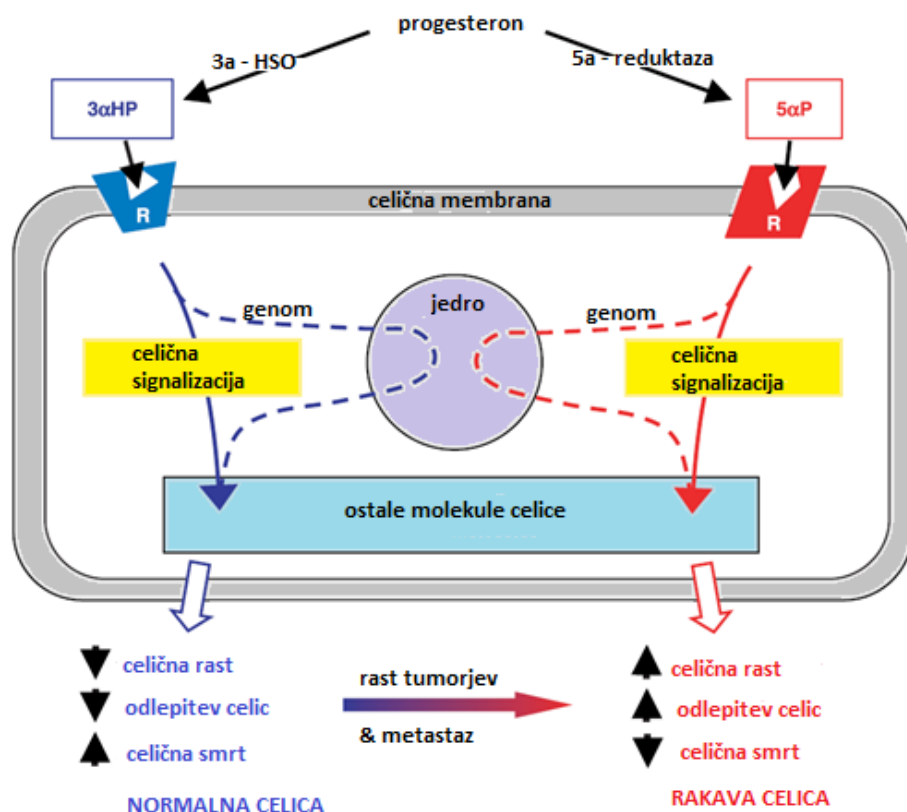
Pri določenih študijah P4 so ugotovili, da je le-ta zelo dejaven v tkivih/celicah dojk, kjer direktno ali indirektno stimulira ali inhibira rast rakavih oziroma normalnih celic. Da bi proučili vpliv metabolizma na razvoj rakavih celic so se odločili, da primerjajo vpliv normalnih in rakavih celic na pretvorbo P4 v njegove metabolite. Pri obojih se P4 metabolizira z 5 α -reduktazo, 3 α -hidroksisteroidno oksidoreduktazo (3 α -HSO) in 20 α -hidroksisteroid oksidoreduktazo (20 α -HSO). Ugotovili so, da se največje razlike izražajo pri dveh metabolitih, pri rakavih nastaja več 5 α -pregnane-3,20dion (5 α P), pri normalnih pa nastaja več 3 α -hidroksi-4-pregnen-20-on (3 α HP) (7).

V nadaljevanju so »*in vitro*« študije s celičnimi linijami (MCF-7, MCF-10A in ZR-75-10) pokazale, da 3 α HP inhibira, medtem ko 5 α P signifikantno stimulira rast rakavih celic. Ugotovili so, da encimska pretvorba s 3 α -HSP omogoča ponovno pretvorbo nazaj v P4, medtem ko pretvorba metabolita, ki nastane pod vplivom 5 α -reduktaze, nazaj v P4 ni več možna (slika 3) (7).



Slika 3: Shematski prikaz pretvorb P4 s 5 α -reduktazo, 3 α -HSO, 3 β -HSO in 20 α -HSO (7).

Med samimi pretvorbami sodelujeta še encima 20 α -hidroksisteroid oksidoreduktaza (20 α -HSO) in 3 β -hidroksisteroid oksidoreduktaza (3 β -HSO). Dosedanje ugotovitve kažejo, da metabolizem P4 močno vpliva na nastanek in rast rakavih celic. Metaboliti, ki nastajajo pod vplivom 5 α -reduktaze, pospešujejo nastanek rakavih celic. Medtem ko je bilo ponovno potrjeno, da 3 α -HSO in 20 α -HSO zavirata nastanek rakavih celic (8). Slika 4 prikazuje da se 3 α HP, ki se tvori s pomočjo 3 α -HSO, skrbi za normalno odmrtnje celic, medtem ko 5 α P, za katerega je odgovorna 5 α -reduktaza, pospešuje nastanek rakavih celic.



Slika 4: Shematski prikaz vpliva metabolizma P4 na nastanek rakavih celic dojke (6).

Rezultati določenih študij kažejo na možnost, da bi s hormonsko terapijo metabolitov P4, ki hkrati služijo kot regenerotorji estrogena, lahko zavirali rast raka na dojkah. Tako bi lahko uvedli nov način zdravljenja raka na dojkah, ki je v današnjem času v porastu (9, 10).

Študije so pokazale pomembno vlogo P4 tudi v moškem telesu, saj le-ta deluje na celice prostate. Prav tako pa so ugotovili protimikrobno delovanje, saj P4 deluje tako na gram pozitivne kot tudi na gram negativne bakterije ter glive (11).

1.2. Kromatografija

Kromatografija je izraz za vrsto laboratorijskih tehnik za ločevanje zmesi, ki temeljijo na različnih afinitetah posameznih komponent do stacionarne in mobilne faze. Preiskovano zmes raztopimo v topilu, nato pa s pomočjo mobilne faze potuje preko stacionarne faze. Različne komponente zmesi preko stacionarne faze potujejo z različno hitrostjo, kar povzroči, da se zmes loči na posamezne komponente (12).

Stacionarna faza je lahko trdna ali nemobilna tekočina, nanesena na nosilec, mimo nje pa potuje mobilna faza v obliki plina, tekočine ali superkritičnega fluida. Do kromatografske ločitve (separacije) pride, ker se komponente vzorca, raztopljenega v mobilni fazi različno dolgo zadržujejo na stacionarni fazi. Hitrost elucije iz stacionarne faze je odvisna od afinitete komponente do stacionarne faze (v primeru polarne komponente se bo le-ta dlje časa zadržala na polarni koloni kot pa v nepolarni mobilni fazi, zato bo iz sistema prišla kasneje kot nepolarna komponenta). (13). Med kromatografske tehnike spadajo kolonska kromatografija, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) in tenkoplastna kromatografija (14).

1.2.1. Razdelitev metod glede na mobilno fazo in stacionarno fazo

V grobem sisteme kromatografske ločbe delimo glede na sestavo stacionarne faze na normalno-fazne (stacionarna faza je polarna) in reverzno-fazne (stacionarna faza je nepolarna).

Normalno-fazne mobilne faze so sestavljene iz mešanice organskih topil, brez dodatka vode. Tako jih sestavljajo predvsem organska topila, ki so nepolarna. Pri normalno-fazni kromatografiji gre za ločevanje komponent glede na afiniteto do stacionarne faze, ki je v tem primeru polarna. Jakost interakcij ni odvisna samo od funkcionalnih skupin prisotnih v strukturi reakcijske zmesi ampak tudi od steričnih dejavnikov. Večji delež bolj polarnih topil v mobilni fazi bo skrajšal čas zadrževanja komponent na stacionarni fazi, medtem ko bo večja količina nepolarnih topil podaljšala čas zadrževanja komponent na stacionarni fazi. Tako se bodo iz stacionarne faze najprej eluirale manj polarne komponente, kasneje pa bolj polarne komponente. S pomočjo normalno-fazne kromatografije lahko ločujemo tako nevtralne kot ionizirane komponente.

Nasprotno je pri reverzno-fazni kromatografiji, kjer imamo nepolarno stacionarno fazo in polarno mobilno fazo. Na takih stacionarnih fazah se dlje časa zadržujejo nepolarne molekule, medtem ko se bolj polarne molekule hitreje eluirajo iz kolone. Reverzno-fazna kromatografija deluje pretežno na principu hidrofobnih interakcij. Zadrževanje komponent lahko zmanjšamo z dodatkom manj polarnih topil, kot sta metanol (MeOH) in acetonitril (MeCN), v mobilno fazo.

Kadar imamo opravka z analiti, ki so šibke kisline ali šibke baze, je zelo pomemben dejavnik, ki vpliva na ločbo tudi pH mobilne faze. pH vpliva na to ali se bo spojina nahajala v ionizirani obliki ali v neionizirani obliki, ki se med seboj različno obnašata.

Želeno je, da je analit zgolj v eni obliki, sicer med njima prihaja do stehiometričnega ravnotežja, kar poslabša kakovost ločbe (15, 16, 17).

1.3. Kolonska kromatografija

Pri kolonski kromatografiji uporabljamo kolono, katero napolnimo s trdnim nosilcem (silikagel, aluminijev oksid in drugi). Mobilno fazo dodajamo na vrhu kolone in le-ta teče navzdol skozi kolono bodisi zaradi težnosti bodisi zaradi dodatnega zunanega tlaka. Kolonsko kromatografijo uporabljamo predvsem kot separacijsko tehniko za izolacijo želenih spojin iz zmesi. Zmes za ločevanje s kolonsko kromatografijo damo na vrh kolone, ki jo mobilna faza spirala iz vrha kolone in le-ta teče navzdol po koloni. Glede na to, da imajo različne komponente v zmesi različne interakcije s stacionarno fazo in mobilno fazo, se le te spirajo iz kolone postopoma. Komponente, z večjo afiniteto do mobilne faze, bodo hitreje potovale skozi kolono kot v primeru, ko imajo komponente v zmesi večjo afiniteto do stacionarne faze.

Kolonsko kromatografijo delimo na dve različni kromatografiji:

- v primeru, ko topilo steče skozi kolono s pomočjo težnosti ali kapljanja, se imenuje težnostna kromatografija,
- v primeru, ko topilo potisnemo skozi kolono, jo imenujemo »*flash*« kromatografija; uporabljen pritisk pospeši prehod komponent iz kolone (zaradi razlikovanja med posameznimi kromatografijami bomo v nadaljevanju uporabljali izraz »*flash*« kromatografija, saj smo le to kromatografijo uporabljali tekom ločevanja posameznih komponent).

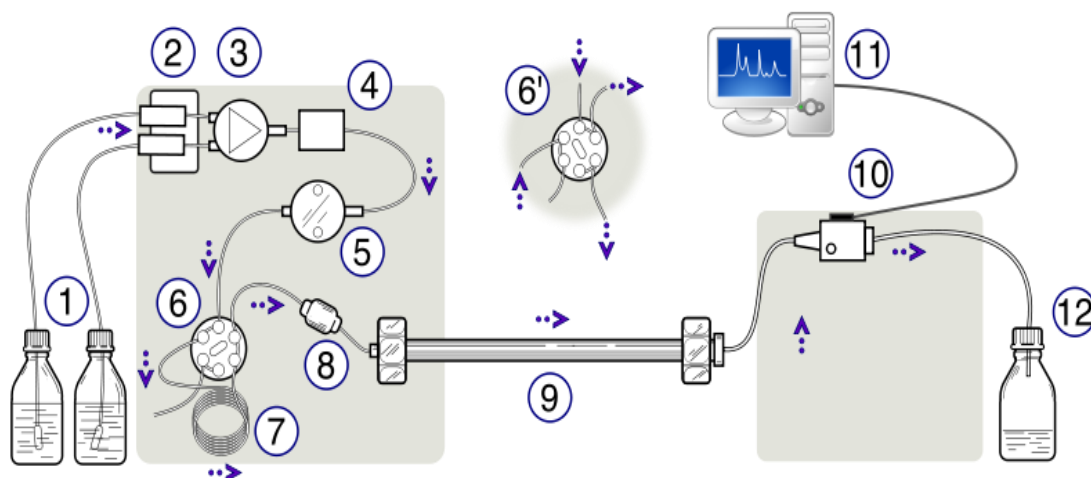
Po prehodu mobilne faze skozi kolonsko kromatografijo lovimo posamezne frakcije, ki prehajajo iz kolone in le-te na koncu ovrednotimo, katera frakcija vsebuje želen vzorec. V primeru, različno obarvanih frakcij med seboj, bi le-te lahko vizualno ločili med seboj, vendar je to v kemiji zelo redko (15).

1.4. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je kromatografska tehnika za ločevanje zmesi spojin, za namen identifikacije spojin, določevanje vsebnosti in sorodnih snovi v zmesi in separacijo posameznih komponent (16).

HPLC se razlikuje od tradicionalne kolonske kromatografije po tem, da uporabljamo bistveno manjše delce v stacionarni fazi, s čimer izboljšamo ločljivost oziroma

učinkovitost ločbe (Slika 5). V obeh primerih se komponente ločujejo na osnovi porazdelitve delcev med stacionarno in mobilno fazo.



Slika 5: Shematski prikaz poteka delovanja HPLC sistema; 1 = rezervoar za topila, 2 = razplinjevalec za topilo, 3 = ventil za gradient (predvsem uporabno pri gradientni metodi), 4 = mešalec gradienta, 5 = črpalka, 6 = preklopni ventil za injektor, 7 = injektor, 8 = pred-kolona, 9 = analitska (preparativna) kolona, 10 = detektor, 11 = mikroprocesor (računalnik), 12 = zbiralnik odpadnih tekočin (16)

Tekom izvajanja HPLC ločbe spremljamo določene pogoje na HPLC sistemu, kot so pretok mobilne faze, pritisk in temperatura kolone. Iz samega kromatograma lahko na podlagi položajev (retencijski čas), oblike in širine vrhov določimo (izračunamo) parametre in s tem dokažemo ustreznost HPLC sistema. Vsi ti parametri so opisani v farmakopejah in drugi strokovni literaturi za HPLC kromatografijo (14, 19).

Najpomembnejši parametri so:

Resolucija:

$$R = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(w_1 + w_2)} = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(w_{1/2_1} + w_{1/2_2})}$$

Enačba: Izračun resolucije med dvema vrhoma

R.....resolucija

t_{R1} in t_{R2}predstavljata retencijska časa komponent 1 in 2

w_1 in w_2širini kromatografskih vrhov komponent 1 in 2

$w_{1/2,1}$ $w_{1/2,2}$ širina kromatografskih vrhov na polovični višini komponent 1 in 2

Kapacitivni faktor:

$$k' = \frac{t'_R}{t_m} = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

Enačba: Izračun kapacitivnega faktorja

k'.....kapacitivni faktor

t'_R.....retencijski čas analita R

t_m.....retencijski čas mobilne faze

Faktor simetrije:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

Enačba: Izračun faktorja simetrije

A_s.....faktor simetrije vrha

w_{0,05}..... širina vrha na njegovi 5% višini

d.....del širine vrha od začetka do retencijskega časa (maksimuma vrha) merjen na višini 1/20 (0,05%) (14, 19)

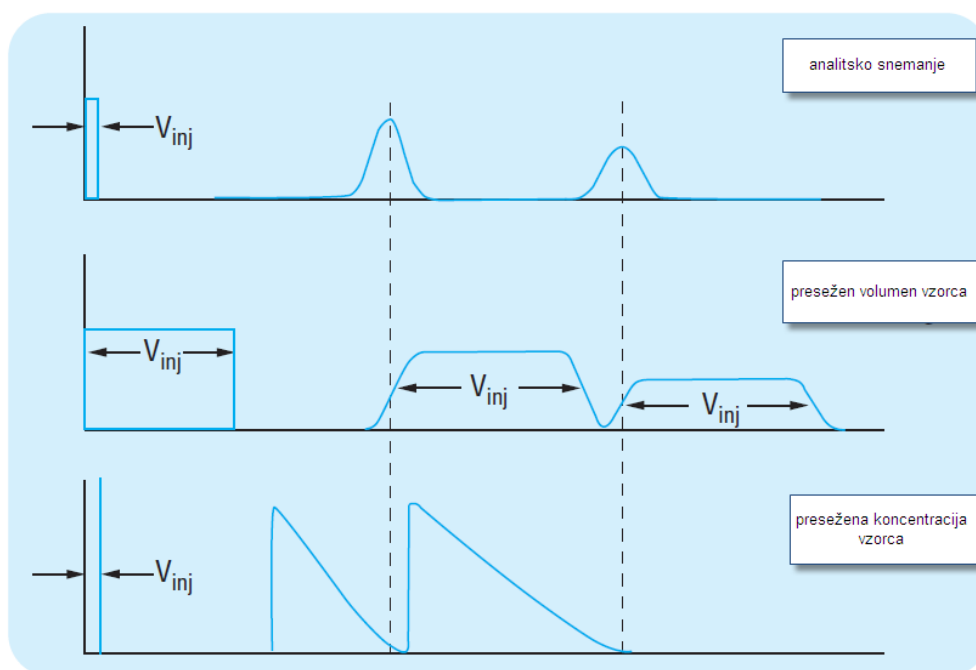
1.5. Preparativna kromatografija in prehod iz analitske na preparativno tekočinsko kromatografijo

Preparativno tekočinsko kromatografijo uporabljamo za preparativno čiščenje in separacijo organskih spojin. Uporabljamo jo za izolacijo maksimalnega števila komponent v minimalnem času, ki se nahajajo v reakcijski zmesi, ali v primeru, ko želimo izboljšati ločbo molekul z zelo podobnimi strukturami. S samo preparativno kromatografijo je možno izolirati tudi komponente v manjših količinah v vzorcu, ki ga ločujemo (18, 20, 21). Medtem, ko je cilj analitske HPLC metode kakovostna in količinska določitev spojine, je pri preparativni metodi v ospredju izolacija in čiščenje reakcijskih zmesi. Pri preparativni tehniki gre za proizvodnjo visoko čistih spojin, ki so kasneje uporabljajo v nadaljnje namene, medtem ko gre pri analitski HPLC metodi vzorec v odpad (22).

Pri povečanju (»*skale-up*«) analitskega sistema pomeni, da uporabimo kolone z večjim premerom, kar potegne za seboj povečanje pretoka in volumna ali koncentracijo vzorca. Pri tem vrh ostane oster in simetričen. Slaba stran takšnega povečanja je uporaba velikih kolon in velikih količin topil za ločbo manjših količin spojin, zato je pri »*scale-up*«-u analitskega sistema nujno povečanje količine vzorca. Zaradi tega takšna metoda ni

ekonomsko upravičena. V drugi vrsti gre za povečanje, ko pretirano obremenimo kolono s povečanjem količine vzorca pod enakimi pogoji, ki smo jih uporabili na analitski koloni. (Slika 6) (22).

Pri preparativni metodi želimo izolirati čim večjo količino vzorca, ki jo naneseemo na stacionarno fazo. Pred prehodom na preparativno kolono je potrebno preveriti povečanje količine vzorca na analitski koloni. V tem primeru so resolucija, širina in oblika vrha pomembni parametri, ki se morajo pokazati za zanesljive in točne. S povečanjem količine injiciranega vzorca na kolono bi se smela teoretično spreminjati tudi velikost in površina vrha ne pa oblika vrha in kapacitivni faktor. V primeru, ko se začneta spreminjati tako oblika vrha kot kapacitivni faktor pride do nesimetrije vrha. Predvsem v primeru, ko detektor zaradi prevelikega odziva na kromatogramu ne more izrisati lepega kromatografskega vrha. Tak način izrisa imenujemo »zabit« vrh. Ločba poteka na dva načina ali s preseženo koncentracijo vzorca ali pa s preseženim volumnom vzorca (22).



Slika 6: Prikaz ločbe vrhov s pomočjo analitske kolone (prvi kromatogram), za ločbo s povečanjem volumna (drugi kromatogram) in ločba s povečanjem koncentracije (tretji kromatogram) (22).

Kadar želimo uporabiti preparativno ločbo s povečanjem koncentracije moramo biti pozorni na to, da je vzorec dobro topen v mobilni fazi. V primeru slabo topnega vzorca

lahko uporabimo samo metodo s povečanjem volumna injiciranja (22). Največkrat se uporabi kombinacijo obeh tehnik. V obeh primerih je pomembna resolucija med posameznimi komponentami. Ključne faze razvoja preparativne ločbe so torej:

1. optimizacija analitske metode; predvsem doseganje ustrezne resolucije,
2. preobremenitev analitske kolone; ali s povečanjem koncentracije ali s povečanjem volumna vzorca, z namenom iskanja ustreznih parametrov, ki jih prenesemo na preparativno kolono
3. povečanje količine vzorca na preparativni koloni.

Za ohranitev enake ločbe pri prehodu iz manjše na večjo kolono uporabimo sledeče enačbe:

Analitska kolona

Preparativna kolona

$$\frac{f}{r^2} = \frac{F}{R^2}$$

Pretok: 1,0 mL/min

Pretok: 12,5 mL/min

$$\frac{v}{\pi * r^2 * l} = \frac{V}{\pi * R^2 * L}$$

Volumen: 25 μ L/injiciranje

Volumen: 310 μ L/injiciranje

f....pretok na analitski koloni (1,0 mL/min)

F....pretok na preparativni kolono (?)

r.....premer analitske kolone (3,0 mm)

R.....premer preparativne kolone (10,6 mm)

v....maksimalni volumen injiciranja na analitsko kolono (25 μ L)

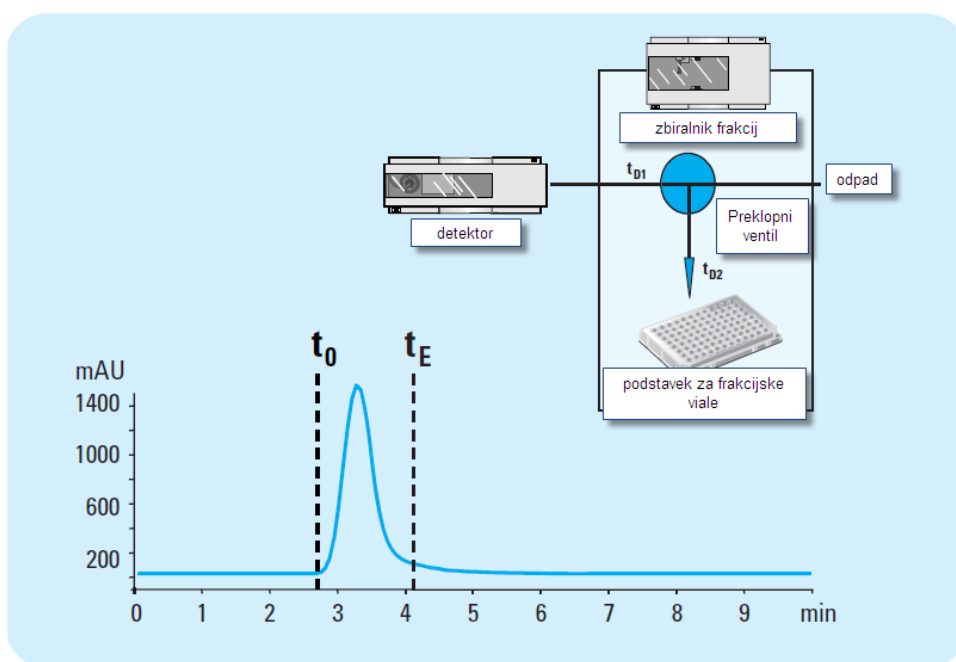
V....maksimalni volumen injiciranja na preparativno kolono (?)

l....dolžina analitske kolone (150 mm)

L....dolžina preparativne kolone (150 mm)

Po izračunu in prvem injiciranju je potrebno optimizirati pogoje za doseganje optimalnega razmerja med izkoristkom, čistostjo in hitrostjo ločbe. Zavedati se moramo, da je izbira kolone ključnega pomena, saj je kolona tista, ki nam omogoča ločbo. Z izbiro napačne

kolone in mobilne faze lahko izgubimo vzorec, ki je omejen s topnostjo v mobilni fazi ali s topnostjo pri injiciranju večje količine vzorca. Medtem ko pri analitskem določevanju na HPLC sistemu vzorec izgubimo in gre v odpad, je bistvo preparativne kromatografije, da posamezne vrhe lovimo ločeno po tem, ko zapustijo detektor. Frakcije lahko zbiramo glede na retencijski čas ali glede na signal na detektorju (22).



Slika 7: Prikaz lovljenja posameznega vrha; začetek in konec posameznega vrha (22).

Nekateri sistemi pri preparativni kromatografiji omogočajo kombinacijo avtomatskega vzorčevalnika in zbiralnika frakcij kot je prikazano na sliki 7. V tem primeru ločba posameznih zmesi poteka povsem avtomatizirano, poskrbeti je potrebno le za zadostno količino mobilne faze in vzorca. Pri tem uporabimo frakcijsko zakasnitev, saj vzorec, ko ga detektiramo potrebuje določen čas, ko potuje po cevkah, da pride do zbiralnika frakcij. Isto funkcijo zakasnitve lahko uporabimo tudi po končanem vrhu. Pri tem poskušamo ujeti celoten vrh in se izognemo temu, da bi prehitro zaključili z zbiranjem vrha in s tem izgubili prevelike količine iskanega vzorca (22).

Avtomatizirani sistemi nam omogočajo, da lovimo posamezne frakcije v določeno frakcijsko vialo s točno določeno pozicijo. Pri tem si sistem zapomni katero pozicijo je polnil nazadnje in nadaljuje z naslednjim vrhom v naslednji frakcijski viali (22).

1.6. Jedrska magnetna resonanca

Jedrska magnetna resonanca (NMR) je fizikalni pojav, ki opisuje interakcijo magnetno aktivnih atomskih jeder z elektromagnetnim poljem, katerega frekvenca je enaka lastni frekvenci jeder. Pri NMR merimo magnetne lastnosti snovi posredno preko izsevanega sevanja. Prištevamo jo med spektroskopske tehnike, s katerimi določimo fizikalne, kemijske in elektronske lastnosti snovi (23).

Vzorec vstavimo (Slika 8) v močno statično magnetno polje skupaj s tuljavo, ki obdaja vzorec in obseva vzorec z radijskimi valovi. Pri določeni frekvenci atomska jedra v vzorcu absorbirajo valovanje in ob tem preidejo iz osnovnega v vzbujeno stanje. V vzbujenem stanju jedra ostanejo nekaj časa nato pa se povrnejo v osnovno stanje in pri tem izsevajo elektromagnetno valovanje, kar zaznamo s tuljavo. Pri izsevanju elektromagnetnega valovanja merimo, kolikšen del prejete energije so jedra izsevala nazaj in po kolikšnem času (23).

Za NMR potrebujemo jedra, ki imajo od nič različen magnetni moment. Takšna jedra morajo imeti liho število protonov ali nevtronov; na primer: ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{19}F (23).



Slika 8: 400 MHz jedrsko magnetno-resonančni spektrofotometer (24)

Atomsko jedro si lahko predstavljamo kot vrteče se telo, ki se obnaša kot drobcen magnet, kjer imamo zunanje magnetno polje, v katerega vstavimo vzorec, in le ta povzroča navor na magnetni moment jedra, s katerim ga želi obrniti v smer zunanjega polja. Jedro se pod vplivom zunanjega magnetnega polja ne obrne, vendar začne okrog te smeri procesirati

značilno z frekvenco, imenovano Larmorjeva frekvenca (23) (je frekvenca, s katero jedrski spini procesirajo v zunanjem magnetnem polju (24)).

V primeru jedra vodika ^1H , ki ima spin $\frac{1}{2}$ je lahko magnetni moment obrnjen v smer magnetnega polja ali v nasprotno smer. Obe orientaciji se razlikujeta po energiji. Kadar vzorca ne obsevamo z elektromagnetnim valovanjem je v smer magnetnega polja obrnjen malenkostno več kot polovica jeder (23).

Po tem, ko vzbujevalni signal preneha, se jedra vrnejo v osnovno stanje in pri tem izsevajo elektromagnetno valovanje. Temu procesu pravimo relaksacija. Izsevno valovanje jedra ima isto frekvenco kot vzbujevalni signal. Pri relaksaciji ločimo dva različna pojavi in sicer spinsko-mrežna relaksacija ali longitudinalna relaksacija (opisuje vračanje magnetizacije po prenehanju vzbujevalnega signala v ravnovesno stanje, torej v smer magnetnega polja) in spinsko-spinski relaksacijski čas (opisuje, kako hitro jedra oddajajo energijo prejeto z magnetnim dipolom iz okolice). Spinsko-mrežna relaksacija opisuje vračanje magnetizacije v smer zunanjega polja medtem, ko spinsko-spinska relaksacija opisuje zmanjševanje pravokotne komponente magnetizacije in zato temu procesu pravimo tudi transverzalna relaksacija (23).

1.7. Masna spektrometrija

Masna spektrometrija (MS) je analizna metoda, s katero določamo molekulske maso in strukturne elemente spojine na podlagi pretvorbe v ionizirane delce. Le-te lahko medsebojno primerjamo (ločimo) glede na njihovo razmerje med maso in nabojem (M/Z). Metoda je zelo občutljiva, zahtevna, destruktivna, vendar zahteva majhno količino vzorca. Velikokrat jo zasledimo v kombinaciji z drugimi analitskimi metodami. Pri MS merimo maso molekulskega iona M^+ , ki nastane pri ionizaciji molekule pri obstreljevanju z elektroni ($M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$). Lahko pa tudi merimo maso ionskih fragmentov, ki nastanejo kot posledica razpada molekulskega iona. Intenzitete signalov so odvisne od stabilnosti kationskega fragmenta in je pomemben podatek pri ugotavljanju prisotnosti določenih strukturnih elementov preiskovane molekule.

Ioni z različno sestavo in enakim masnim številom imajo dejansko tudi različne mase. Na podlagi natančnih meritev mase iona lahko ugotovimo elementarno sestavo. Iz posameznih fragmentov, intenzitete vrhov dobimo informacijo o strukturi molekule (20).

2. NAMEN DELA

P4 je najstarejši in hkrati ključen hormon brez katerega sesalski organizem ne morejo delovati. Najnovejše raziskave kažejo, da imajo na celičnem nivoju, poleg samega P4, pomembno vlogo tudi njegovi derivati. Sam vpliv P4 in njegovih derivatov na človeški organizem je trenutno še premalo poznan, kljub številnim raziskavam, ki potekajo. Znano je, da imajo derivati P4 različne učinke v različnih tkivih. Za proučevanje teh učinkov na posameznih derivatih moramo le-te najprej pripraviti in izolirati v kemijsko čisti obliki.

V okviru magistrskega dela želimo pripraviti čiste derivate P4, ki jih bomo uporabili v raziskovalne namene. Služili nam bodo kot znani derivati za določanje njihove prisotnosti oziroma za določanje koncentracije v posameznih tkivih. Na tržišču so trenutno na voljo posamezni derivati P4, vendar se je izkazalo, da je njihova kakovost neustrezna (premajhna čistost). Zaradi tega se komercialno dostopni derivati za raziskovalne namene ne morejo uporabiti, saj ima lahko že nečistota, ki je prisotna v majhnem deležu, pomemben učinek v človeškem organizmu oziroma na model s pomočjo katerega izvajajo raziskave. Prav tako jih bomo lahko uporabili tudi za proučevanje njihovih bioloških učinkov na različne tipe celic.

V magistrskem delu bomo izvedli sintezo štirih derivatov P4 in sicer $3\alpha,20\alpha$ -dihidroksiprogesterona ($3\alpha,20\alpha$ -P4), $3\alpha,20\beta$ -dihidroksiprogestrone ($3\alpha,20\beta$ -P4), $3\beta,20\alpha$ -dihidroksiprogestrone ($3\beta,20\alpha$ -P4) in $3\beta,20\beta$ -dihidroksiprogesterone ($3\beta,20\beta$ -P4). Njihova sinteza, izolacija in karakterizacija je v literaturi (25) že opisana. Sintezo izbranih štirih derivatov, z zelo podobno strukturo, bomo optimizirali glede na prej omenjeno referenco. Dodatno bomo poskusili poenostaviti izolacijo teh derivatov, ki predstavljajo zmes štirih stereoizomerov, s pomočjo različnih tekočinskih kromatografij, ki predstavlja ključni izziv. Strukturo izoliranih produktov bomo potrdili s pomočjo jedrske magnetne resonance (NMR) in masne spektrometrije (MS).

V sklopu magistrskega dela želimo pripraviti zadostne količine (nekaj mg) vsakega izmed štirih naštetih izomerov z zadostno čistostjo za nadaljnje biološke študije.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Reagenti in topila

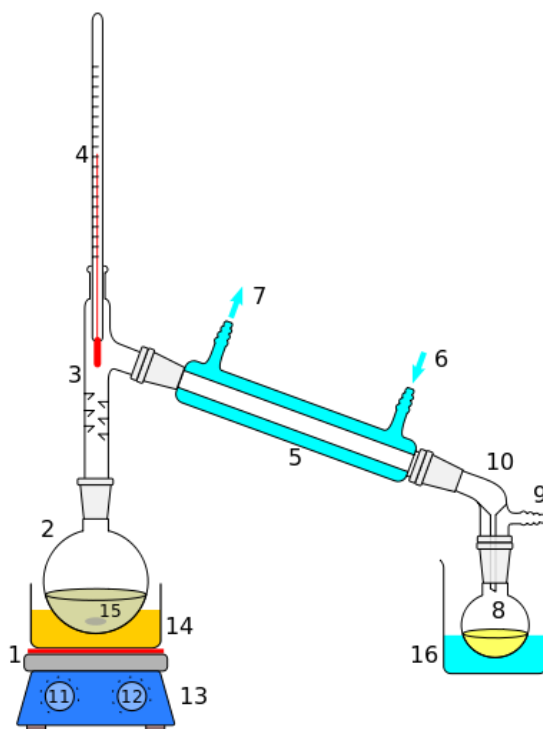
- aluminijev izopropoksid ($C_9H_{21}O_3Al$); Sigma-Aldrich (USA)
- citronska kislina ($C_6H_8O_7$); Fluka (Avstrija)
- progesteron ($C_{21}H_{30}O_2$); Sigma-Aldrich (USA)
- dietil eter ($C_6H_8O_7$); Merck (Nemčija)
- natrijev borohidrid ($NaBH_4$); Merck (Nemčija)
- natrijev hidrogen karbonat ($NaHCO_3$); Merck (Nemčija)
- natrijev hidroksid ($NaOH$); Merck (Nemčija)
- natrijev klorid ($NaCl$); Merck (Nemčija)
- natrijev sulfat (Na_2SO_4); Merck (Nemčija)
- acetonitril za HPLC (CH_3CN); J.T.Baker (USA)
- deionizirana voda pridobljena z aparatom Milli Q Integral 10 (Millipore, Bedford, ZDA)
- izopropanol za HPLC (C_3H_8O); Sigma-Aldrich (USA)
- koncentrirana klorovodikova kislina (HCl); Merck (Nemčija)
- metanol za HPLC (CH_4O); J.T.Baker (USA)
- tekoči dušik (N_2); Messer (Slovenija)
- tetrahidrofuran za HPLC (C_4H_8O); J.T.Baker (USA)

3.2. Aparature

- analitska tehtnica (Metler Toledo International inc., Greifensee, Švica)
- ultrazvočna kopel (Iskra PIO d.o.o, Slovenija)
- Isolera za »flash« kromatografijo (Biotage, Švedska)
- HPLC aparatura, Agilent 1100 s kvaterno črpalko, detektorjem z zaznavanjem večjega števila valovnih dolžin (Agilent, USA)
- NMR spektrometer Bruker AVANCE DPX400 (Bruker, Nemčija)
- Rotavapor (Buchi, Švica)
- vakuumski sušilnik (Buchi, Švica)
- liofilizator, Christ, Beta 1-8K (LMC-2) (Christ, Nemčija)
- masni spektrofotometer Q-TOF Premier (Micromass, Waters, Velika Britanija)

3.2.1. Aparatura za izvedbo sinteze

Za sestavo aparature za izvedbo sinteze, ki je prikazana na sliki 9, smo uporabili 50 mL bučko (2), ki smo jo postavili v oljno kopel (14), termometer (4), destilacijski nastavek (10), vodni hladilnik (5), bučko za lovljenje destilata (8) in klorkalcijevo cevko (3). Aparaturo smo prepihali z argonom, da smo izpodrinili zrak in reakcijo izvedli v inertni atmosferi.



Slika 9: Aparatura za izvedbo sinteze derivatov P4 (26)

3.2.2. Aparatura za HPLC



Slika 10: Slika HPLC sistema (18)

HPLC aparatura (slika 10) običajno sestavlja več modelov, vključujejo črpalko, vzorčevalnik, kolono, detektor, zbiralnik frakcij in računalnik (16).

3.2.3. Aparatura za »flash« kromatografijo

Aparatura za »flash« kromatografijo na sliki 11 je sestavljena preprosteje kot sam HPLC. Ima črpalko za črpanje mobilne faze, nastavek za kolono, ki jo pri tej kromatografiji imenujemo kartuša (slika 12) in podstavek za epruvete za lovljenje frakcij vzorca.

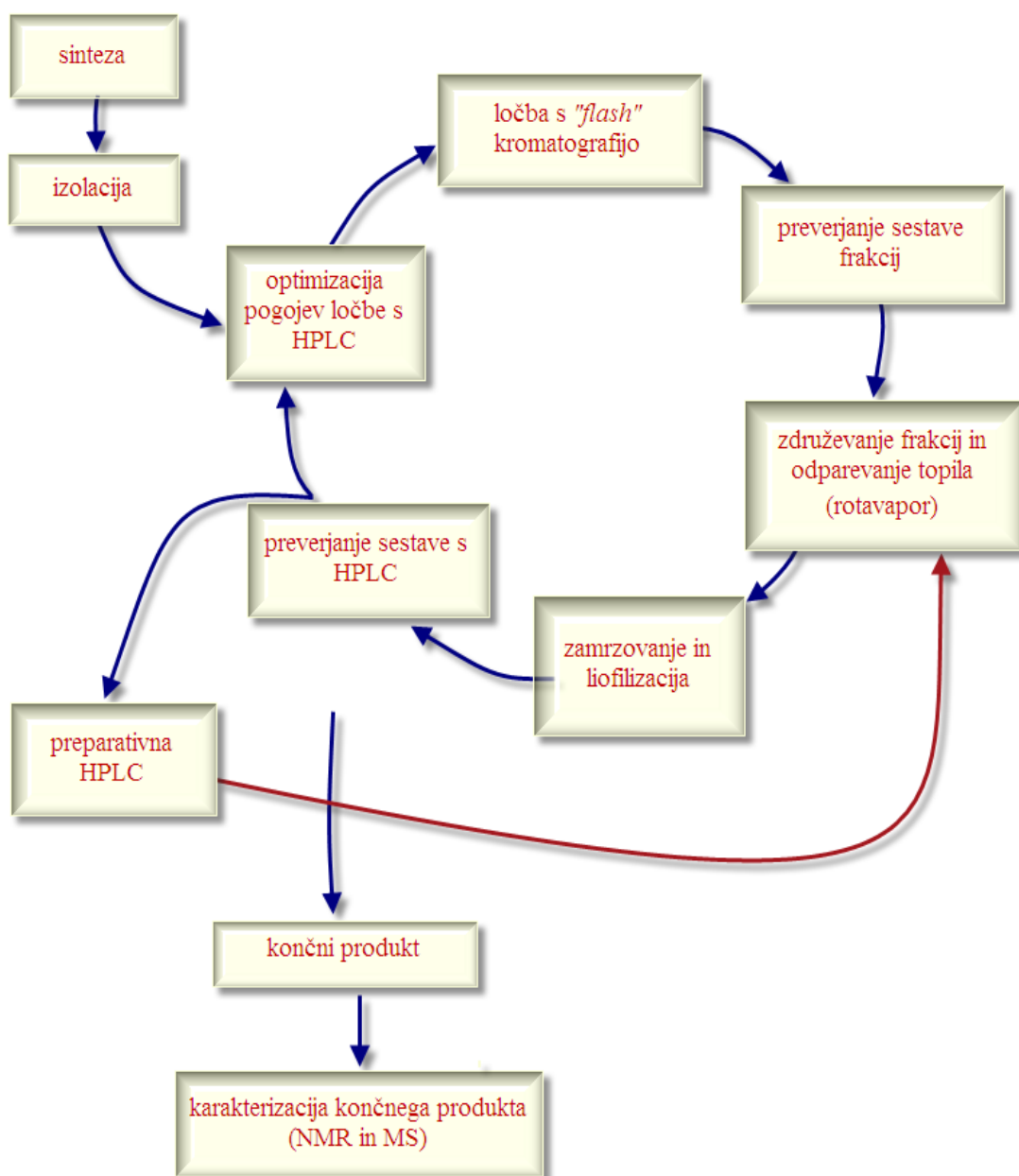


Slika 11: Aparat za izvedbo »flash« kromatografije, ki smo jo uporabili za ločevanje derivatov med seboj (27)



Slika 12: Slika prikazuje kartušo in nosilec na katerega se prenese vzorec reakcijske zmesi, ki se potem s pomočjo mobilne faze ločuje na kartuši (28).

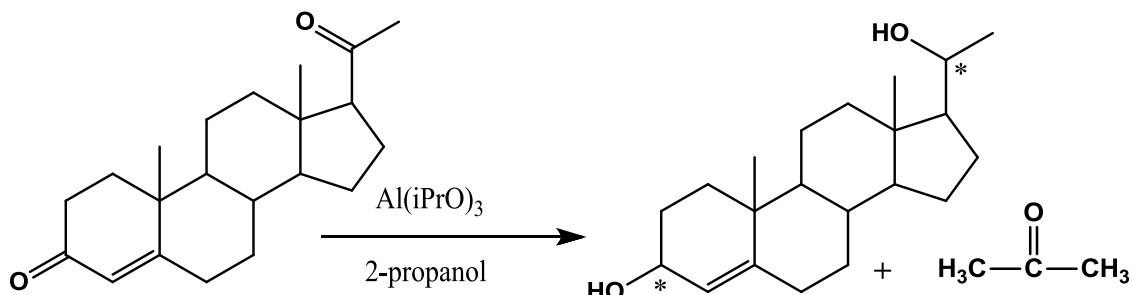
4. EKSPERIMENTALNI DEL



Slika 13: Shematski prikaz eksperimentalnega dela

4.1. Sintezni postopki za redukcijo progesterona

4.1.1. Redukcija z aluminijevim izopropoksidom ($\text{Al}(\text{iPrO})_3$) – sinteza 1



Slika 14: Redukcija P4 z aluminijevim izopropoksidom v brezvodnem izopropanolu.

V 50 mL bučko smo zatehtali 1,0 g P4 in sestavili aparaturo (oljno kopel, destilacijsko kolono, destilacijski nastavek, termometer, vodni hladilnik, bučko za lovljenje destilata in klorkalcijevo cevko). Iz aparature smo z argonom izpodrinili zrak, da smo reakcijo izvedli v inertni atmosferi. V bučko smo dodali 2,6 g aluminijevega propoksida (sveže odprtega) in 30 mL brezvodnega 2-propanola.

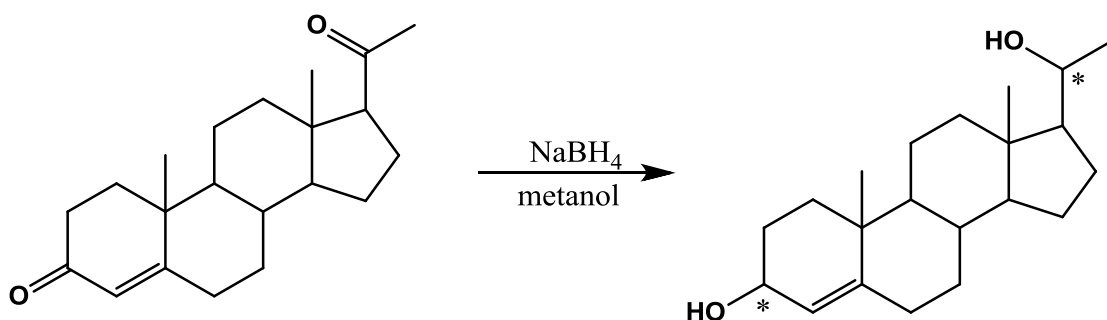
Reakcijsko zmes smo segreli na 105 °C, da je le-ta pričela destilirati. Ko se je temperatura na vrhu kolone dvignila na okoli 80 °C smo temperaturo segrevanja na oljni kopeli zmanjšali na 98 °C. Destilacijo smo izvajali zato, da smo tekom reakcije odstranjevali aceton, ki je stranski produkt sinteze. S tem smo dosegli, da je ves P4 prešel v derivate P4.

Prisotnost acetona v destilatu smo preverjali tako, da smo eno kapljico destilata dodali v raztopino 2,4-dinitrofenilhidrazina. V primeru, ko je bil v destilatu prisoten aceton, smo dobili intenzivno rumeno obarvanje (v primerjavi s samim iPrOH kot kontrolo).

Ko v destilatu nismo imeli več prisotnega acetona (po 8 urah), smo prenehali s segrevanjem in reakcijsko zmes ohladili. Zaostanku v bučki smo dodali 100 ml etra in zmes v lij ločnik in dodali 50 mL 10 % natrijevega hidroksida. Organsko fazo smo ekstrahirali s 50 mL 10 % natrijevega hidroksida. Organski fazi smo dodali 50 mL deionizirane vode, da smo zmes sprali in dvakrat ponovili postopek.

Organsko fazo smo potem osušili z natrijevim sulfatom, da smo odstranili morebitno prisotno vodo. Natrijev sulfat smo odfiltrirali in odpareli topilo na rotavaporju.

4.1.2. Redukcija z natrijevim borhidridom (NaBH₄) – sinteza 2



Slika 15: Sinteza reduciranih derivatov P4 iz P4 s pomočjo reagenta natrijevega borhidrida v brezvodnem MeOH.

V 50 mL bučko smo zatehtali 1,0 g P4, dodali 20 mL metanola in iz aparature z argonom izpodrinili zrak, da smo reakcijo izvedli v inertni atmosferi. V bučko smo pri 0 °C dodali natrijev borhidrid in reakcijsko zmes mešali 10 minut pri 0 °C ter nadaljnje 3 ure pri sobni temperaturi.

Iz reakcijske zmesi smo odpareli topilo in suhemu preostanku dodali 100 mL etilacetata, raztopino prenesli v lij ločnik in jo ekstrahirali z 2 x po 50 mL nasičene vodne raztopine natrijevega klorida. Organsko fazo smo posušili z natrijevim sulfatom, da smo odstranili morebitno prisotno vodo, prefiltrirali in odpareli topilo. Raztopini smo odstranili topilo na rotavaporju in trden zaostanek posušili v vakuumskem sušilniku.

4.2. Kromatografski pogoji za preverjanje sestave vzorcev s HPLC

HPLC: Metoda 1

Prvotno smo se lotili preverjanje sestave vzorca z uporabo pogojev navedenih v članku (25). Spremenili smo edino pretok in ga povečali iz 1,0 mL/min na 1,2 mL/min in pod temi pogoji posneli zmes sinteze 2. Pretok na HPLC sistemu smo povečali z namenom hitrejše elucije vrhov iz sistema in pri tem uporabili sledeče kromatografske pogoje:

Kolona	Agilent Eclipse Plus C18; 150x4,6 mm; 5µm
Pretok	1,2 mL/min
Temperatura	25 °C
Volumen injiciranja	10 µL
Čas	20 min
Valovna dolžina	206 nm in 240 nm
Mobilna faza	voda/MeOH= 30/70

Tabela 1: Kromatografski pogoji ločbe na HPLC z MF vode in MeOH v razmerju 30/70

HPLC: Metoda 2

Pri metodi 2 smo spremenili sestavo mobilne faze (povečali smo delež MeOH), da smo pospešili ločbo posameznih derivatov, ki so se nahajali vzorcu. Uporabili smo naslednje kromatografske pogoje:

Kolona	Agilent Eclipse Plus C18; 150x4,6 mm; 5µm
Pretok	1,2 mL/min
Temperatura	25 °C
Volumen injiciranja	10 µL
Čas	20 min
Valovna dolžina	206 nm in 240 nm
Mobilna faza	voda/MeOH= 25/75

Tabela 2: Kromatografski pogoji ločbe na HPLC z MF vode in MeOH v razmerju 25/75

HPLC: Metoda 3

Odločili smo se, da MeOH poskusimo zamenjati in preverimo ločbo z MeCN. Za ločbo smo uporabili naslednje kromatografske pogoje:

Kolona	Agilent Eclipse Plus C18; 150x4,6 mm; 5 μ m		
Pretok	1,2 mL/min		
Temperatura	25 °C		
Volumen injiciranja	10 μ L		
Čas	15 min		
Valovna dolžina	206 nm in 240 nm		
Mobilna faza (MF)	t [min]	voda [%]	MeCN [%]
	0	45	55
	5	45	55
	10	10	90
	14	10	90
	15	45	55

Tabela 3: Kromatografski pogoji ločbe na HPLC z MF vode in MeCN v razmerju z uporabo gradientne ločbe.

HPLC: Metoda 4

Za hitro preverjanje sestave vzorca smo med eksperimentalnim delom uporabljali sledeče kromatografske pogoje:

Kolona	Agilent Eclipse Plus C16; 150x4,6 mm; 5 μ m
Pretok	1,2 mL/min
Temperatura	25 °C
Volumen injiciranja	10 μ L
Čas	10 min
Valovna dolžina	206 nm in 240 nm
Mobilna faza	voda/MeCN = 45/55

Tabela 4: Kromatografski pogoji hitre ločbe na HPLC z MF vode in MeCN.

Ta metoda se je izkazala za hitro in zanesljivo. Z njo smo lahko v kratkem času analizirali večje število vzorcev.

HPLC: Metoda 5

Preverili smo vpliv spremembe organske faze, kjer smo namesto MeCN uporabili 40 % izopropanol (iPrOH) in vzorec posneli pod naslednjimi kromatografskimi pogoji:

Kolona	Agilent Eclipse Plus C18; 150x4,6 mm; 5 μ m
Pretok	1,0 mL/min
Temperatura	25 °C
Volumen injiciranja	10 μ L
Čas	10 min
Valovna dolžina	206 in 240 nm
Mobilna faza	voda/ iPrOH = 60/40

Tabela 5: Kromatografski pogoji ločbe na HPLC z MF vode in iPrOH.

HPLC: Metoda 6

Preverili smo tudi kromatografijo z uporabo 40 % tetrahidrofurana (THF). Uporabili smo sledeče kromatografske pogoje:

Kolona	Agilent Eclipse Plus C18; 150x4,6 mm; 5 μ m
Pretok	1,0 mL/min
Temperatura	25 °C
Volumen injiciranja	10 μ L
Čas	10 min
Valovna dolžina	206 nm in 240 nm
Mobilna faza	voda/ THF = 60/40

Tabela 6: Kromatografski pogoji ločbe na HPLC z MF vode in THF.

4.3. Ločba reduciranih derivatov progesterona s »flash« kromatografijo

»Flash«: Metoda 1

Tekočinska »flash« kromatografija omogoča avtomatično lovljenje posameznih frakcij tako, da zbira posamezne frakcije glede na odziv na detektorju. Trden zaostanek po sintezi smo raztopili v čim manjši količini v 80 % MeOH. Pri prvi ločbi smo uporabili naslednje pogoje kromatografske ločbe:

Kolona: Snap 50 g; KP-C18
Valovna dolžina: 206 nm za ločbo frakcij in 220 nm
Topilo A: Voda
Topilo B: Metanol

Pretok: 40 mL/min

Gradient:

Volumen kolone v mL (CV)	voda [%]	MeOH [%]
3	40	60
3,7	38	62
10,5	28	72
14	21	79
16,8	20	80
18,9	16	84
20,4	0	100
23,8	0	100

Tabela 7: Prikaz gradientne kromatografske ločbe na Isoleri z MF vode in MeOH

»Flash«: Metoda 2

Med preverjanjem vrhov nastalih derivatov na HPLC smo ugotovili, da daje MeCN v našem primeru boljšo ločbo kot MeOH. Tako smo se odločili, da pri ločevanju s »flash« kromatografijo dodamo MeCN v MF in s tem izboljšamo ločbo posameznih derivatov P4 s »flash« kromatografijo. Uporabili smo naslednje kromatografske pogoje ločbe:

Kolona: Snap 100 g; KP–C18

Valovna dolžina: 206 nm za določevanje reduciranih derivatov progesterona

Topilo A: MeCN/voda = 50/50

Topilo B: Metanol

Pretok: 40 mL/min

Gradient:

CV	MeCN/voda = 50/50 [%]	MeOH [%]
0	100	0
6	100	0
14,9	41	59
15,7	26	74
17	11	89
17,9	0	100
26,9	0	100

Tabela 8: Prikaz gradientne kromatografske ločbe na Isoleri z MF 50 % MeCN in MeOH

»Flash«: Metoda 3

Z uporabo THF kot topila na »flash« kromatografiji smo želeli še dodatno izboljšati ločbo derivatov, saj smo predhodno na HPLC sistemu preverili ločbo posameznih vrhov. Glede na to, da so se vrhi na HPLC sistemu bolje ločili med seboj smo sklepali, da bomo enak učinek dosegli tudi s pomočjo »flash« kromatografije. V ta namen smo namesto MeOH uporabili THF. Uporabili smo naslednje pogoje kromatografske ločbe:

Kolona: Snap 100 g; KP–C18

Valovna dolžina: 206 nm za določevanje reduciranih derivatov progesterona

Topilo A: Tetrahidrofuran

Topilo B: Voda

Pretok: 50 mL/min

Gradient:

gradient	THF [%]	voda [%]
0	60	40
5,4	60	40
9,5	40	60
11	40	60
11,9	50	50
12,9	60	40
23,9	60	40

Tabela 9: Prikaz gradientne kromatografske ločbe na Isoleri z MF THF in vode

4.4. Ločba reduciranih derivatov progesterona s preparativno HPLC

Metoda na analitski koloni pred preходом na preparativno kolono

Pred preходом na preparativno kolono smo izvedli poskuse povečanja injiciranja na analitski koloni, ki smo jo uporabili za preverjanje sestave vzorcev. Uporabili smo metodo povečanja koncentracije nanosa vzorca na kolono. Pri simulaciji povečanja injiciranja raztopine z večjo koncentracijo na kolono smo uporabili naslednje kromatografske pogoje:

Kolona	Agilent Eclipse Plus C18; 150x4,6 mm; 5µm
Pretok	0,52 mL/min
Temperatura	35 °C
Volumen injiciranja	25 µL
Čas	60 min
Valovna dolžina	206 nm
Mobilna faza	voda/ MeCN = 40/60

Tabela 10: Kromatografski pogoji na analitski koloni pred prehodom na preparativno kolono.

Metoda na preparativni koloni

Pri ločevanju na preparativni koloni smo uporabili naslednje kromatografske pogoje:

Kolona	BIA Eurospher C18; 250x16,0 mm; 5µm
Pretok	6,80 mL/min
Temperatura	40 °C
Volumen injiciranja	300 µL
Čas	50 min
Valovna dolžina	206 nm
Mobilna faza	voda/ MeCN = 40/60

Tabela 11: Kromatografski pogoji na preparativni koloni.

4.5. Izolacija in karakterizacija posameznih reduciranih derivatov progesterona

Med ločevanjem derivatov smo po preverjanju sestave vzorcev med seboj združevali posamezne frakcije, ki so vsebovale ustrezne vrhove, ki smo jih določili s pomočjo analitske HPLC metode. Izoliranim produktom smo odpareli topilo na rotavaporju do te meje, da smo odstranili vsa organska topila. Zaostanek v bučki smo zmrznili s pomočjo tekočega dušika in prenesli bučko na liofilizator. Z liofilizacijo smo odstranili še vodo. Suh produkt smo prenesli v stekleničke in shranili v hladilniku.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. Redukcija progesterona

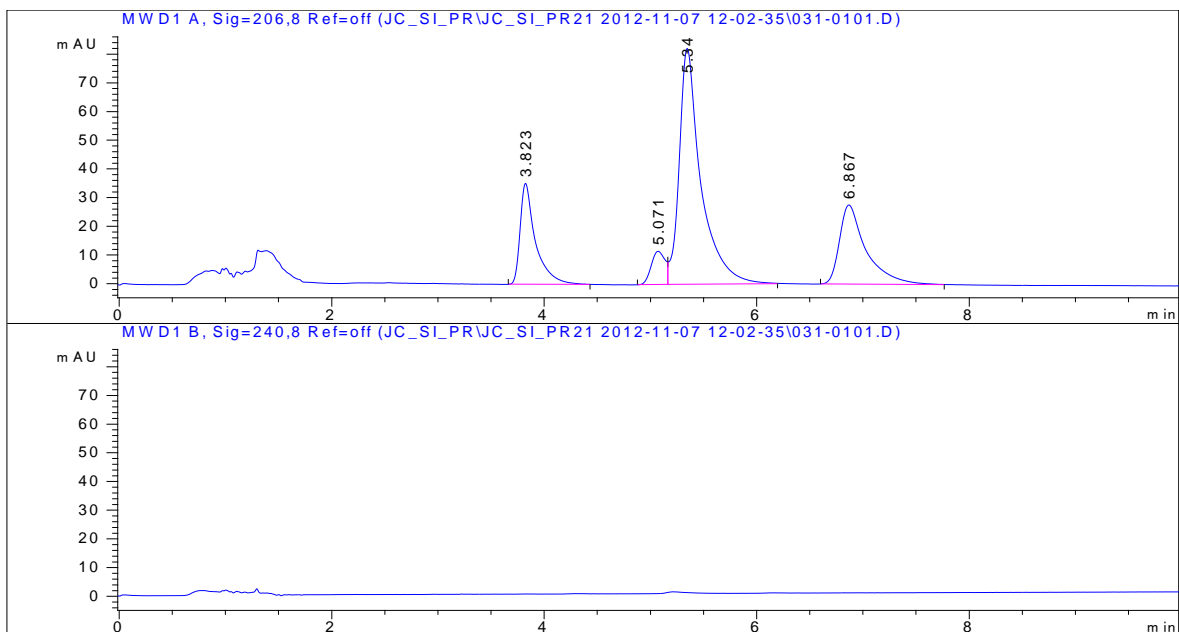
Sintezo in kromatografsko ločbo smo izvajali vzporedno, ker smo si le na tak način pomagali, da smo med seboj združevali posamezne frakcije, ki so vsebovale ustrezne vrhove. V primeru, da smo imeli v zmesi prisotnih več vrhov, smo le-te ločili med seboj ali pa smo posamezne frakcije med seboj še enkrat ločili ali zavrgli.

Sinteza 1

Sintezo 1 (Slika 14) smo izvedli večkrat, saj smo le na ta način pridobili vse štiri iskane derivate P4. Med samo sintezo 1 je nastajal aceton iz iPrOH kot stranski produkt sinteze. Aceton smo tekom sinteze odstranjevali iz reakcijske zmesi, saj smo le na tak način zagotovili, da je sinteza potekla do konca in se je ves P4 pretvoril v derivate P4.

Med sintezo smo bili pozorni tudi na temperaturo poteka sinteze. Pri temperaturi 100 °C je bila temperatura previsoka in je zmes acetona ter topila prehitro oddestilirala. Zato smo znižali temperaturo oljne kopeli na 95 °C in pri tem opazili, da se je destilacija acetona in topila ustavila. Odločili smo se, da oljno kopel segrejemo na 98 °C in pri tej temperaturi izvedemo reakcijo.

Po sintezi smo s pomočjo HPLC sistema preverili nastanek zelenih derivatov in preostanek P4 v reakcijski zmesi. Pri tem smo ugotovili, da P4 ni več prisoten v reakcijski zmesi in da so nastali vsi štirje iskani produkti, kar je vidno na sliki 16 v zgornjem kromatogramu, ki je posnet pri 206 nm. V spodnjem kromatogramu na sliki 16, ki je posnet pri 240 nm naj bi bil viden P4, a le tega ni na kromatogramu, kar pomeni, da je ves P4 zreagiriral in se po reakciji pretvoril v derivate P4.

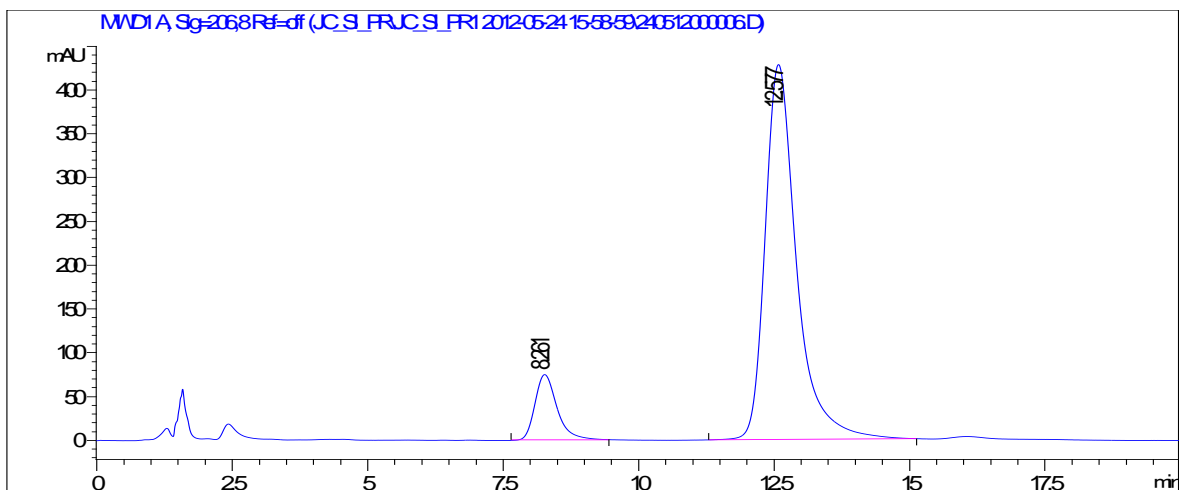


Slika 16: V zgornjem kromatogram, posnetem pri 206 nm, so opazni vsi štiri derivati P4. V spodnjem kromatogramu, posnetem pri 240 nm, ni prisotega kromatografskega vrha P4. Uporabili smo HPLC: Metodo 4.

Sintezo pridobivanja derivatov P4 smo poskušali optimizirati, zato smo izvedli reakcijo z drugim reaktantom in sicer natrijevim borhidridom v MeOH po postopku sinteze 2.

Sinteza 2

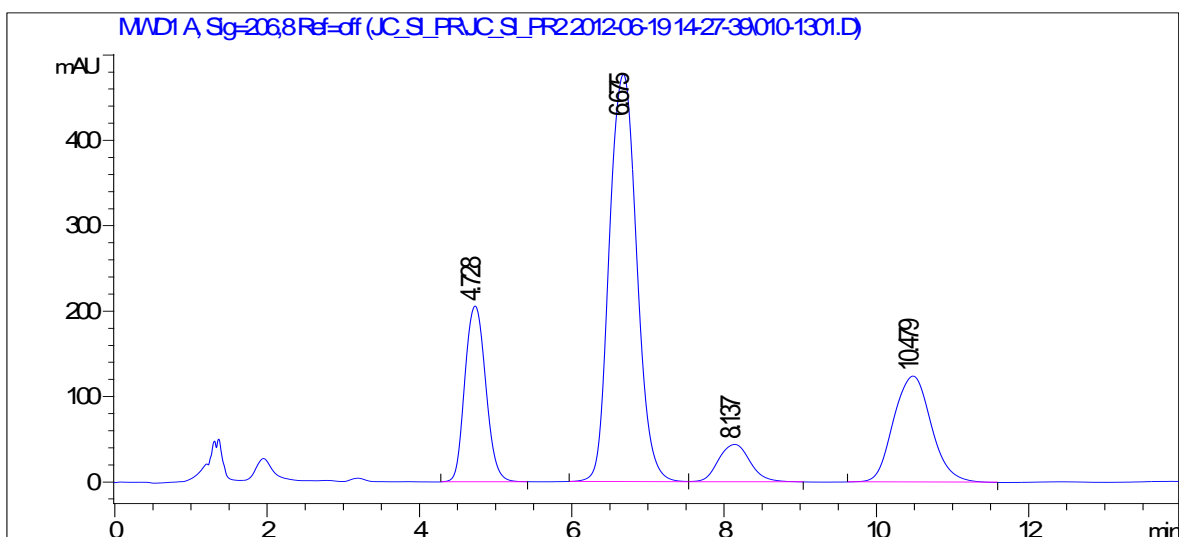
Sintezo 2 (slika 15) smo izvedli samo enkrat, saj smo pri preverjanju sestave reakcijske zmesi na HPLC ugotovili, da se na kromatogramu (slika 17) nahajata samo dva vrha namesto iskanih štirih vrhov (Slika 17).



Slika 17: Kromatogram produkta po redukciji P4 z natrijevim borhidridom. Uporabili smo HPLC: Metodo 1.

5.2. Preverjanje sestave reakcijske zmesi s HPLC

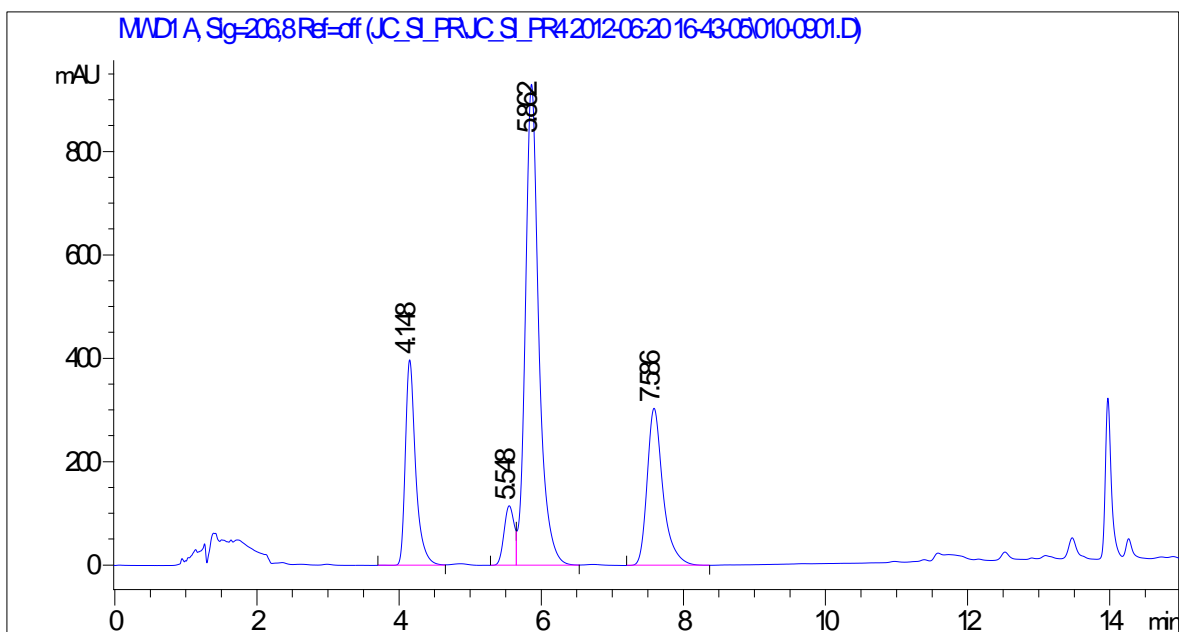
Z nekoliko spremenjenimi pogoji, ki so predpisani v članku (25), smo se lotili določanja sestave reakcijske zmesi s pomočjo HPLC sistema. Pretok smo povečali 1,0 mL/min na 1,2 mL/min z namenom hitrejšje elucije kromatografskih vrhov iz HPLC sistema. Med iskanjem ustreznih kromatografskih pogojev smo spremenili tudi sestavo mobilne faze in povečali delež MeOH iz 70 % na 75 % (HPLC: Metoda 2) in s tem pospešili elucijo kromatografskih vrhov v zmesi po sintezi 1.



Slika 18: Kromatogram reakcijske zmesi po sintezi 1. Pri tem smo uporabili HPLC: Metodo 1.

V zgornjem kromatogramu na sliki 18 so vidni vsi štirje kromatografski vrhovi, ki so med seboj povsem ločeni. Iz samega kromatograma ne moremo določiti kateri vrh je kateri derivat, vendar smo s sintezo 1 uspešno sintetizirali vse iskane derivate. Končno identifikacijo smo izvedli s pomočjo NMR in masne spektrometrije.

V nadaljevanju smo izvedli tudi spremembo sestave mobilne faze, kjer namesto MeOH uporabimo MeCN. V tem primeru smo za kromatografsko ločbo uporabili gradientno HPLC: Metodo 3, s pomočjo katere smo prav tako uspešno zaznali vse štiri iskane vrhe.



Slika 19: Kromatogram reakcijske zmesi po sintezi 1. Prismo uporabili HPLC: Metodo 3.

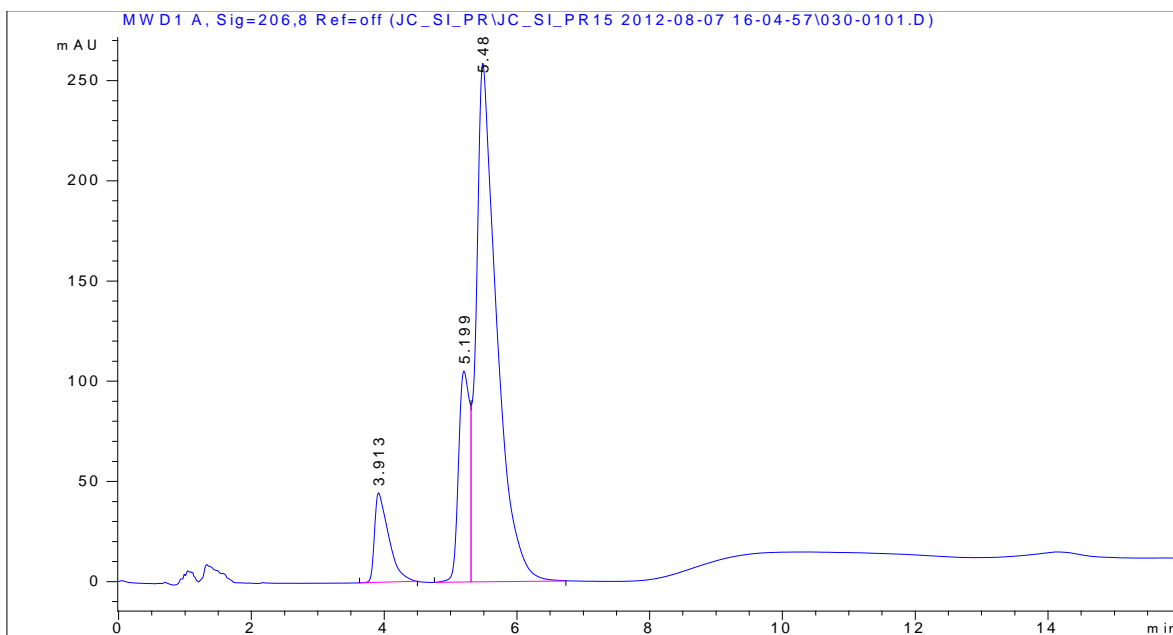
S spremembo sestave mobilne faze, ko smo namesto MeOH uporabili MeCN, sta se tretji in drugi vrh zamenjala (Slika 19). Pri tem je kromatografska ločba med vrhoma slabša, kot v primerjavi s primarno sestavo mobilne faze, kjer smo uporabili MeOH. Z vidika izolacije pa je menjava vrhov, kjer se manjši vrh eluira pred večjim, ugodnejša. S tem si povečamo možnost, da manjši vrh uspešno izoliramo v čisti obliki.

Za hitro identifikacijo smo uporabili isto HPLC metodo 3, vendar smo prilagodili čas snemanja, ki smo ga skrajšali na 10 minut, saj so vsi iskani kromatografski vrhovi eluirali iz kolone pred novo izbranim časom. Na tak način smo v krajšem času analizirali večje število frakcij, ki smo jih dobili s pomočjo »flash« kromatografije.

Glede na to, da sta se drugi in tretji kromatografski vrh pri kromatografiji zamenjala (sliki 18 in 19), smo se odločili, da vrhe poimenujemo glede na kromatogram, ki ga dobimo pri uporabi MeCN v mobilni fazi. Torej imamo prvi vrh pri 4,1 minute, drugi vrh pri 5,5

minute, tretji vrh pri 5,9 minute in četrti vrh pri 7,6 minute. Zgornjega poimenovanja smo se tekom magistrske naloge držali, da ne bi prišlo do pomote pri končni identifikaciji vrhov.

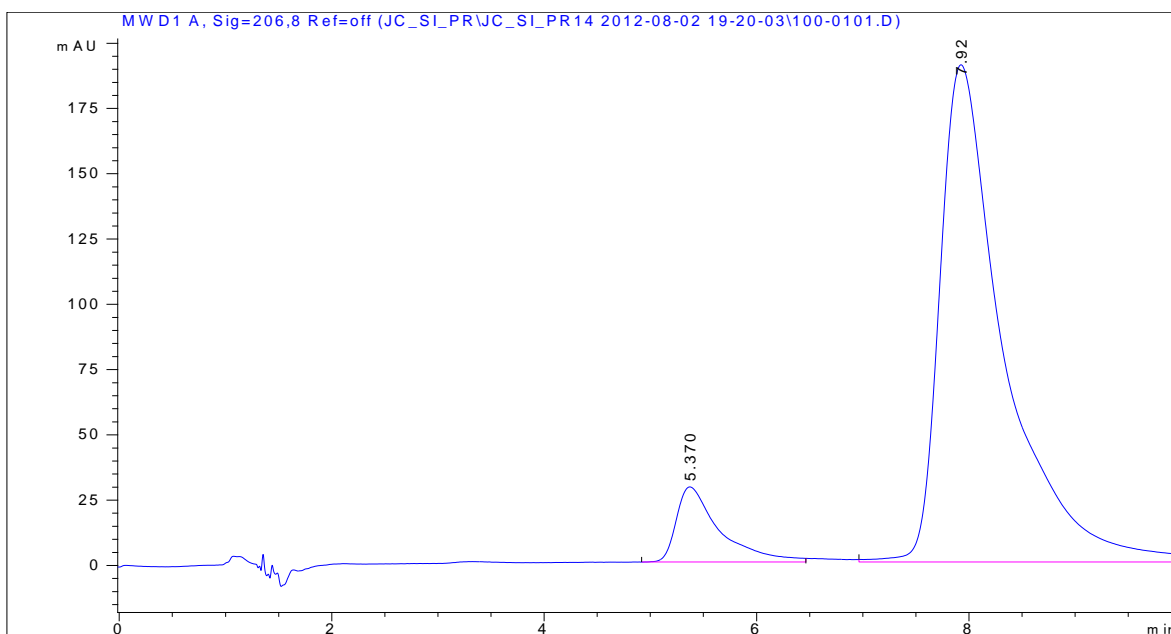
Tekom združevanja frakcij, ki smo jih izolirali s pomočjo »flash« kromatografije in določevanja vrhov s HPLC nam je uspelo združiti frakcije, ki so vsebovale čiste produkte in sicer za prvi, tretji in četrti kromatografski vrh. Čistega drugega kromatografske vrha nam s pomočjo »flash« kromatografije ni uspelo izolirati. Odločili smo se, da preidemo iz »flash« kromatografije na preparativno kromatografijo, saj nam s prvo ni uspelo pridobiti čistega derivata, ki se nahaja v drugem vrhu. V vseh frakcijah, kjer je bil prisoten drugi vrh, je bil zraven prisoten tudi tretji vrh in v nekaterih frakcijah tudi prvi vrh. Pri prehodu na preparativno kromatografijo smo med seboj združili vse frakcije, ki so vsebovale zmesi prvega, drugega in tretjega vrha v različnih razmerjih. Zato v nadaljevanju govorimo o treh vrhovih, ki so prisotni v zmesi. Za optimizacijo kromatografskih pogojev smo preverili ločbo tudi s pomočjo uvedbe iPrOH in THF v mobilno fazo. Za lažjo primerjavo kromatografske ločbe z iPrOH in THF prilagamo še kromatogram ločbe prvih treh vrhov s pomočjo mobilne faze, ki je vsebovala zmes MeCN in vode (Slika 20).



Slika 20: Kromatogram združenih frakcij po ločbi s »flash« kromatografijo, ki so vsebovale drugi vrh. Kromatogram je posnet po HPLC: Metodi 3.

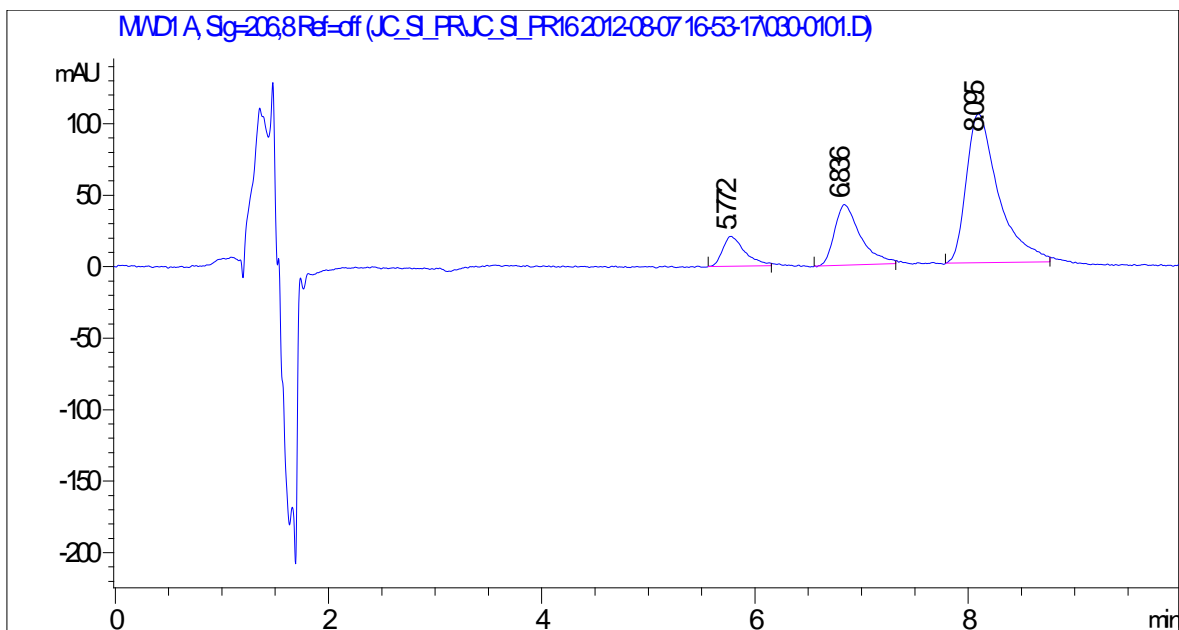
Pri optimizaciji kromatografskih pogojev smo spremenili mobilno fazo, kjer smo namesto MeCN uporabili 40 % izopropanol v vodi (HPLC: Metoda 5). Kot je razvidno iz slike 21

nismo z uporabo izopropanola v mobilni fazi izboljšali kromatografske ločbe. V kromatogramu sta opazna samo dva vrha, zato predvidevamo, da se je drug vrh eluiral pod tretjim vrhom. Opazili smo, da so kromatografski vrhovi pri tej ločbi široki in niso primerni za vrednotenje, zato izopropanola nismo več uporabili pri nadaljnjem delu.



Slika 21: Kromatogram združenih frakcij po ločbi s »flash« kromatografijo, kjer sta v reakcijski zmesi prisotna dva vrha od treh, ki jih je vseboval vzorec. Pri tem smo uporabili HPLC: Metoda 5.

V nadaljevanju smo optimizirali kromatografske pogoje še z uvedbo 40 % THF v vodi kot spremenjeno mobilno fazo (HPLC: Metoda 6). Iz kromatograma na sliki 22 je razvidno, da uporaba THF v mobilni fazi uspešno loči med seboj prvi, drugi in tretji vrh. S temi kromatografskimi pogoji smo uspešno ločili vse tri kromatografske vrhove, ki so prisotni v vzorcu. Iste kromatografske pogoje smo kasneje uporabili pri ločevanju na »flash« kromatografiji, kjer pa kromatografska ločba ni bila ustrezna.



Slika 22: Kromatogram reakcijske zmesi po ločbi s »flash« kromatografijo, kjer so v reakcijski zmesi prisotni trije vrhi od treh, ki jih je vseboval vzorec. Pri tem smo uporabili HPLC: Metodo 6.

5.3. Ločevanje derivatov s »flash« kromatografijo

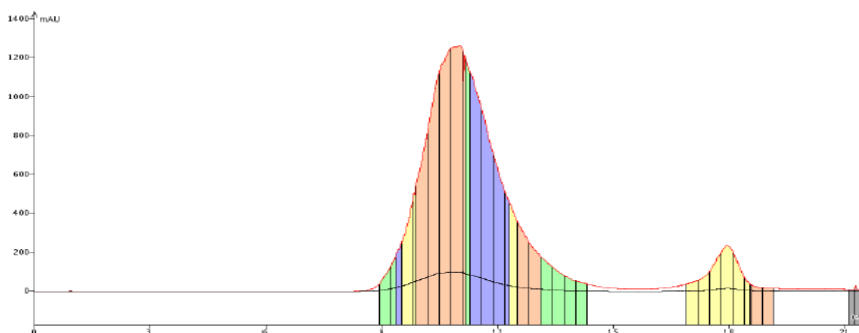
Po sintezi reduciranih derivatov P4 smo le-te ločili med seboj, saj so se vsi nahajali v reakcijski zmesi. Kromatografsko ločbo reduciranih derivatov smo izvedli s pomočjo »flash« kromatografije. Derivate smo ločevali s kromatografsko metodo in iskali najustreznejše kromatografske pogoje za ločbo.

Kromatografskih pogojev za preverjanje vrhov s pomočjo HPLC sistema so bili znani iz članka (25), medtem ko smo morali pogoje za kromatografsko ločbo za »flash« kromatografijo poiskati sami. V osnovi smo uporabili pogoje, ki so bili predpisani za analitsko HPLC kromatografijo, saj »flash« kromatografija deluje na podoben princip kot kromatografska ločba s HPLC sistemom. Razlika med »flash« kromatografijo in kromatografijo s pomočjo HPLC sistema je le v velikosti delcev, ki se nahajajo v posamezni koloni. Ko govorimo o velikosti delcev na analitski koloni, se le ti gibajo okoli 5 do 10 μm , medtem ko imamo na »flash« koloni delce v velikosti okoli 50 μm . Na samo ločbo vpliva tudi dolžina kolone. Daljša kot je kolona, večje je verjetnost, da se bodo posamezne snovi med seboj ločile. Predvsem je to pomembno pri snoveh, ki so si med seboj zelo podobne in potrebujejo več časa, da se ločijo med seboj.

Odločili smo se za reverzno-fazni sistem, ker je bila podana reverzno-fazna mobilna faza za ločbo na HPLC sistemu, kjer je bila kromatografska ločba uspešna. Pri poskusu ločbe derivatov s pomočjo tenkoplastne kromatografije se lise med seboj niso ločile.

Za osnovo prve kromatografske ločbe smo izbrali kromatografske pogoje, ki so opisani v članku (25) za identifikacijo vrhov na HPLC sistemu. Izbrana kromatografska ločba je bila uspešna, saj smo hitro prišli do ustrezne kromatografske ločbe vrhov, vendar smo kromatografske pogoje nekoliko prilagodili za »flash« kromatografijo.

Kot je razvidno iz slike 23 smo z izbiro kromatografskih pogojev pri »flash« kromatografiji (»Flash«: Metoda 1) dobili ločbo med posameznimi derivati, ki se nahajajo v reakcijski zmesi sinteze 2. Po preverjanju sestave na HPLC sistemu za nekatere frakcije smo ugotovili, da se oba nastala derivata nahajata v območju med osmim in petnajstim CV torej v prvem vrhu na spektru.

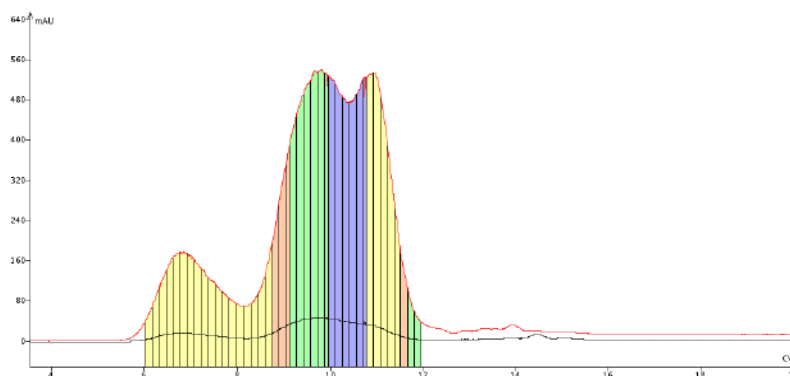


Slika 23: Potek prve kromatografske ločbe derivatov progesterona sinteze 2 »flash« kromatografijo

V nadaljevanju smo izvedli še kromatografsko ločbo derivatov sinteze 1 s pomočjo »flash« kromatografije in med preverjanjem sestave na HPLC sistemu smo ugotovili, da MeCN v mobilni fazi daje ustrežnejšo ločbo kot pa prisoten Pri ločevanju s »flash« kromatografijo smo se odločili, da kot mobilno fazo uporabimo 50 % MeCN v vodi in s tem izboljšamo kromatografsko ločbo posameznih derivatov P4 (»Flash«: Metoda 2).

Pri ločbi z »flash«: Metodo 2 smo dobili ustrežnejšo ločbo surovega produkta med posameznimi derivati kar je vidno na sliki 24. Vsi štirje derivati se nahajajo v območju med šestim in dvanajstim CV. Sestavo posameznih frakcij smo preverili s HPLC sistemom in pri tem ugotovili, da se v prvem vrhu kromatograma nahaja predvsem prvi vrh določen s HPLC sistemom, v drugem vrhu na kromatogramu se nahajata drugi in tretji vrh določena

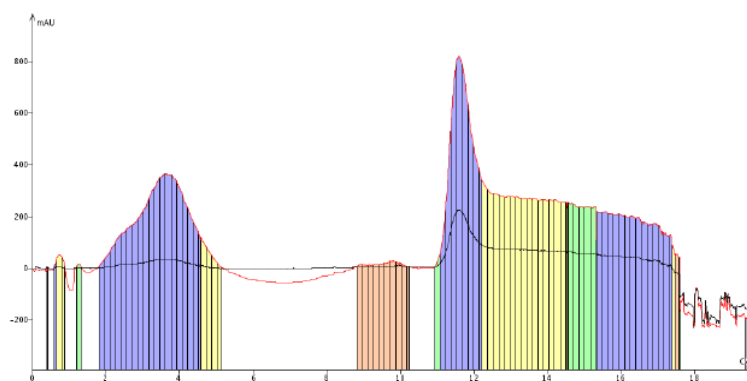
s HPLC sistemom ter v tretjem vrhu na kromatogramu se nahaja četrti vrh določen s HPLC sistemom.



Slika 24: Potek druge ločbe derivatov progesterona sinteze 1 na »flash« kromatografiji, kjer so nakazani posamezni vrhi. Uporabili smo »flash«: Metodo 2.

Zbrane frakcije, ki smo jih pridobili pri zbiranju pri »flash« kromatografiji smo združili med seboj, glede na sestavo in na tak način pričeli z zbiranje čistih derivatov. V nadaljevanju smo sestavo preverili s pomočjo HPLC sistema.

Z uporabo THF kot topila pri »flash« kromatografiji (»flash«: Metoda 3) smo želeli izboljšati kromatografsko ločbo izoliranih derivatov. Uporaba THF-a se je pri analitski ločbi izkazala za najboljšo, kar je vidno tudi na sliki 22. Pri kromatografski ločbi na »flash« kromatografiji smo dobili sledeči kromatogram na sliki 25:



Slika 25: Potek ločbe derivatov progesterona sinteze 1 na Isoleri z uporabo »flash« Metode 3.

Po identifikaciji posameznih frakcij na HPLC sistemu smo ugotovili, da z uporabo THF-a nismo izboljšali kromatografske ločbe v primerjavi s pogoji ločbe »flash« Metode 2, saj so vsi štirje derivati eluirali v območju med 2 in 6 CV. Odločili smo se, da THF-a ne bomo več uporabljali pri nadaljnjem delu, saj kromatografska ločba ni bila ustrezna.

Tekom ločbe s pomočjo »flash« kromatografije nam je uspelo izolirati naslednje čiste kromatografske vrhove, ki smo jih preverili s pomočjo HPLC sistema in sicer: prvi, tretji in četrti kromatografski vrh. Izolirane derivate, ki so na HPLC sistemu vsebovali samo en kromatografski vrh (čisto spojino) smo identificirali s pomočjo jedrske magnetne resonance (NMR) in masne spektrometrije (MS). Z njima smo potrdili, da smo sintetizirali in kasneje ločili iskane derivate, ki so bili opisani v izbrani publikaciji (25).

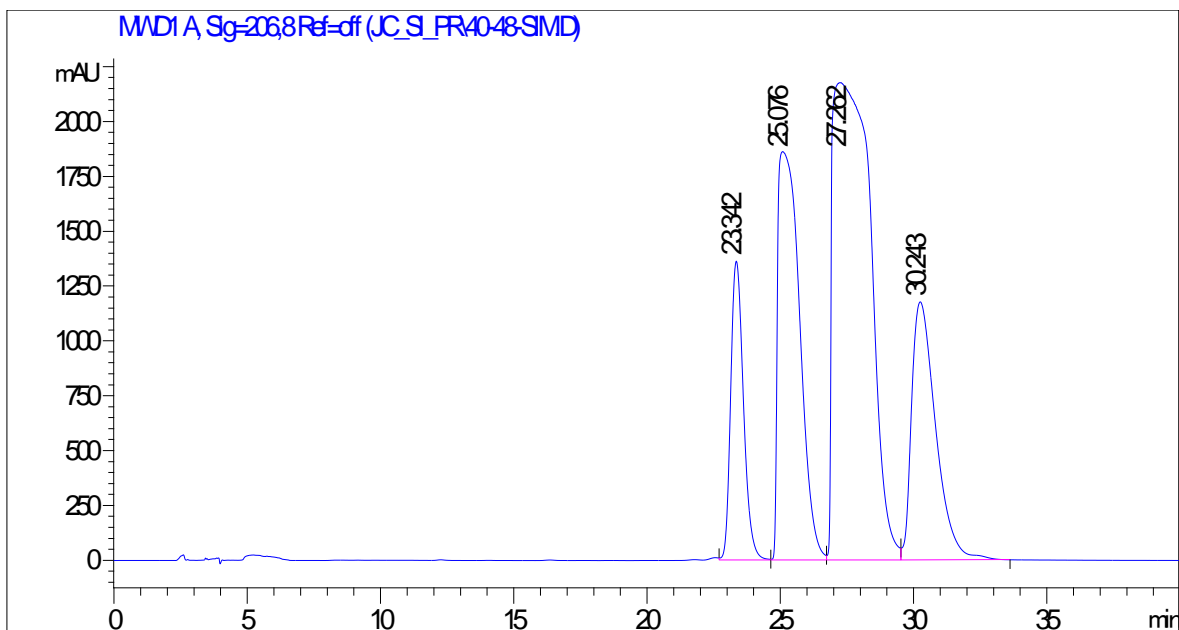
Kromatografska ločba drugega in tretjega kromatografske vrha pri HPLC sistemu z uporabo »flash« kromatografije ni bila uspešna. Kromatografska vrhova sta med seboj koeluirala. Pri tem smo opazili, da je drug kromatografski vrh v precej manjši kot tretji kromatografski vrh, kar je kromatografsko ločbo še otežilo. Tretjega vrha je bilo v reakcijski zmesi največ, medtem ko je bilo drugega vrha najmanj.

Zaradi neuspešne kromatografske ločbe drugega in tretjega kromatografske vrha s pomočjo »flash« kromatografije, smo v nadaljevanju izvedli ločbo teh vrhov s pomočjo preparativne tehnike na HPLC sistemu.

5.4. Ločba derivatov s preparativno HPLC

Za namene preparativne ločbe smo na izbranem HPLC sistemu analitsko kolono zamenjali s preparativno kolono. Preparativna kolona je v primerjavi z analitsko kolono po dimenzijah daljša in širša. Uporabili smo kolono BIA Eurospher C18; 250x16,0 mm; 5 μ m. Pred prehodom na preparativno kolono smo naredili teste povečanja injiciranja na analitski koloni, ki smo jo pred tem uporabili za preverjanje posameznih vrhov. Uporabili smo metodo povečanja koncentracije nanosa vzorca na kolono kot tudi povečanje volumna, saj smo bili omejeni s topnostjo.

Nekoliko smo priredili HPLC metodo, ki smo jo imeli za hitro preverjanje vrhov. V mobilni fazi smo povečali delež MeCN in s tem omogočili hitrejšo elucijo kromatografskih vrhov. Hitrejšo elucijo kromatografskih vrhov iz analitske kolone smo dosegli tudi s povišanjem temperature iz 25 °C na 35 °C. Glede na to, da smo uporabili večjo kolono, smo podaljšali tudi čas snemanja kromatograma.

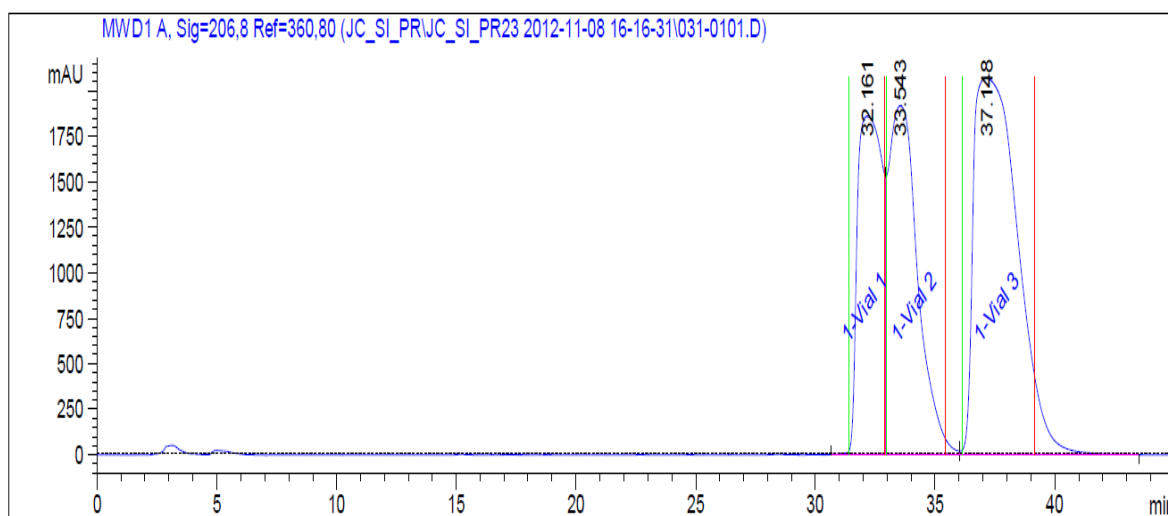


Slika 26: Kromatogram reakcijske zmesi po sintezi 1 pri simulaciji večjega nanosa vzorca na analitsko kolono z uporabljeno metodo na analitski koloni pred preходом na preparativno kolono.

Ko smo dosegli ustrezno kromatografsko ločbo povečane količine vzorca na analitski koloni, kar je razvidno na sliki 26, smo prešli na preparativno kolono. Tudi pri prehodu na preparativno kolono smo morali nekoliko optimizirati kromatografske pogoje. Tako smo za potrebe preparativne kromatografije povečali volumen injiciranja, temperaturo na koloni ter segreli mobilno fazo na 40 °C. S povečanjem temperature smo dosegli, da derivati niso kristalizirali na koloni. Dodatno smo nekoliko skrajšali čas ločevanja na koloni v primerjavi glede na čas, kdaj se iz kolone eluira zadnji vrh, pri tem smo uporabili Metodo na preparativni koloni. Pri pretoku smo bili omejeni s tlakom, saj nam je aparatura omogočala maksimalni tlak 200 barov (pri pretokih nad 5 mL/min).

Ko smo dosegli ustrezno kromatografsko ločbo, kar je razvidno iz slike 27 smo izvedli optimizacijo sistema s pomočjo avtomatske ločbe vrhov med seboj, kar nam je omogočal sam sistem. S tem smo dosegli, da je sistem deloval avtomatično in je ločeval posamezne vrhove med seboj. Pozorni smo morali biti, da nam ni zmanjkalo vzorca v viali, saj smo pri vsakem injiciranju injicirali po 300 μ L vzorca. Prav tako smo morali biti pozorni na zadostno količino mobilne faze, saj jo je hitro zmanjkovalo pri pretoku 6,8 mL/min.

Avtomatizacija HPLC sistema je bila uspešna. Sistem je samostojno zbral frakcije glede na kromatografski vrh na kromatogramu in pri tem ločeval frakcije med seboj. V nadaljevanju smo združevali frakcije, ki so vsebovale prvi in drugi vrh. Ostale frakcije smo zavrgli.



Slika 27: Kromatogram reakcijske zmesi na preparativni koloni po ločbi s »flash« kromatografijo. Uporabili smo Metodo na preparativni koloni.

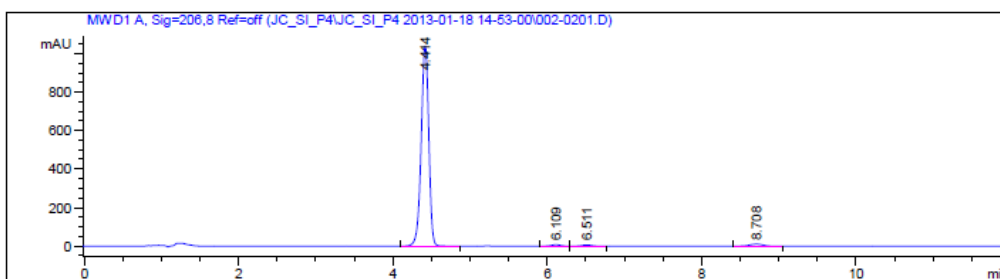
S pomočjo preparativne HPLC kromatografije smo uspešno izolirati tudi drugi vrh in tako pridobili čist derivat, kateremu ta vrh tudi pripada. Prvi vrh na sliki 27 predstavlja prvi vrh na kromatogramu (viala 1), drugi vrh je iskani drugi vrh na kromatogramu (viala 2) in tretji vrh pripada tretjemu vrhu na kromatogramu (viala 3).

Po kromatografski ločbi vrhov s pomočjo združevanja frakcij »flash« in preparativne HPLC kromatografije smo s pomočjo rotavaporja odstranili tudi vsa organska topila. Zaostanek vode v vzorcu smo s pomočjo tekočega dušika zamrznili in vzorcem s pomočjo liofilizacije odstranili zaostalo vodo. Pri liofilizaciji gre za sublimacijo topila iz trdnega v plinasto stanje s pomočjo znižanja temperature in tlaka v odparitveni bučki.

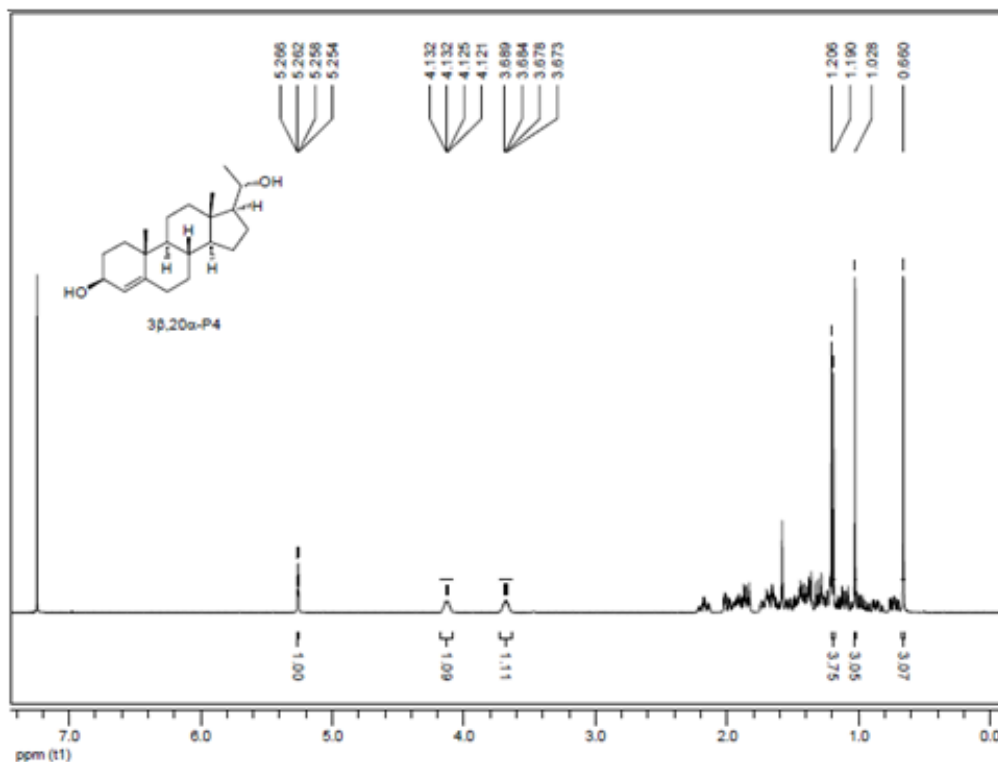
5.5. Identifikacija izoliranih derivatov z NMR spektroskopijo in masno spektrometrijo

Ločene derivate, glede na kromatografske vrhove smo po končani ločbi identificirali s pomočjo NMR in masne spektrometrije. Dobili smo naslednje potrjene identifikacije za dobljene derivate:

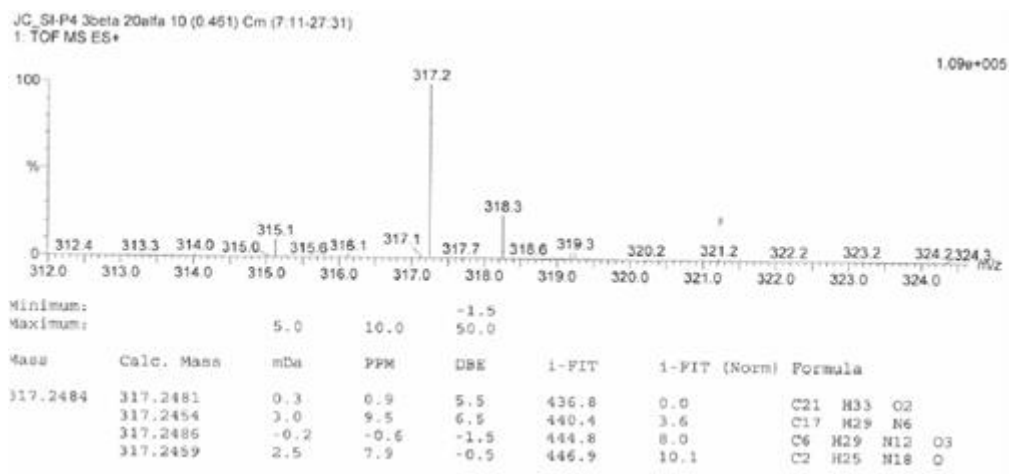
Izoliran prvi vrh na kromatogramu predstavlja **3 β ,20 α -P4**



Slika 28: Kromatogram prvega vrha na HPLC

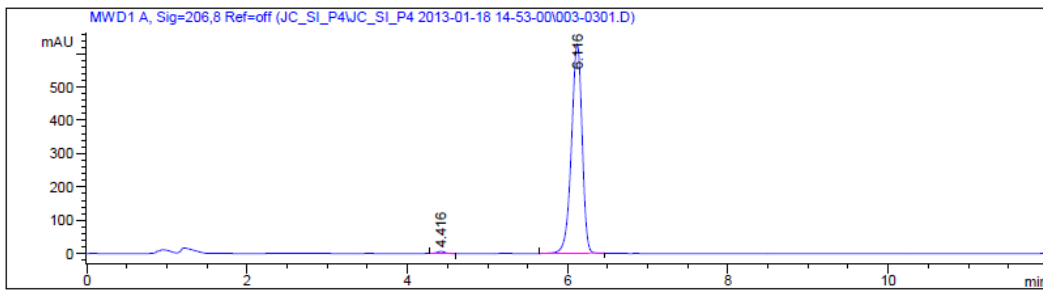


Slika 29: Speker NMR prvega vrha

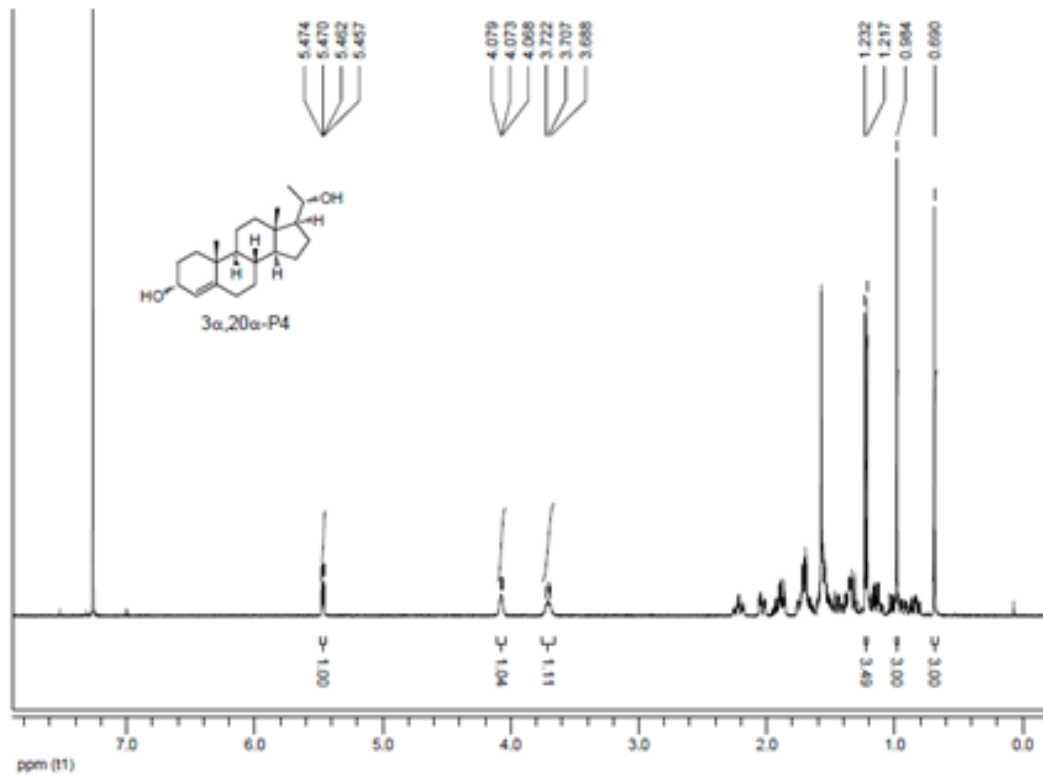


Slika 30: Speker MS prvega vrha

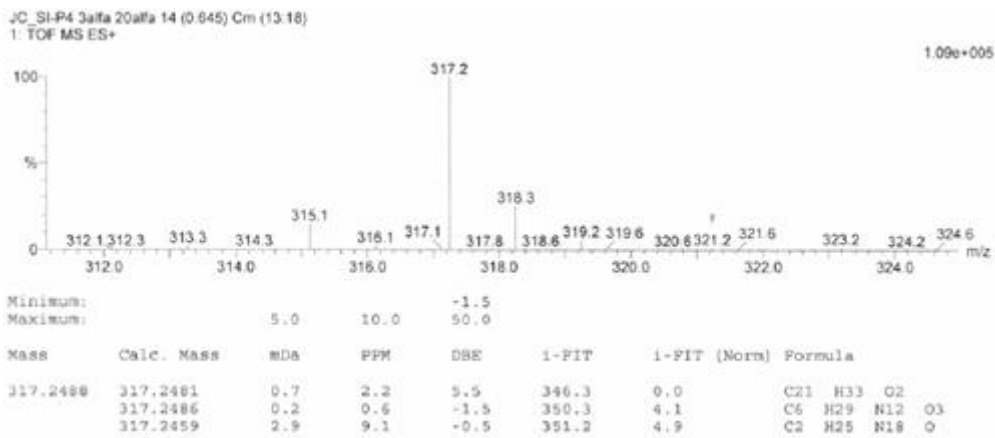
Izoliran drugi vrh na kromatogramu predstavlja **3 α ,20 α -P4**



Slika 31: Kromatogram drugega vrha na HPLC

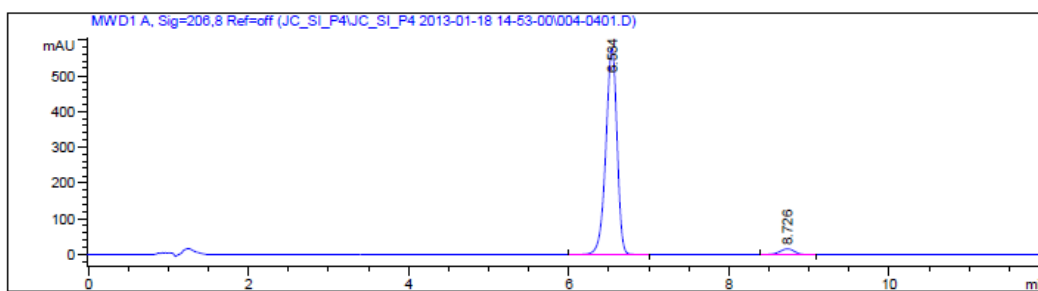


Slika 32: Spekter NMR drugega vrha

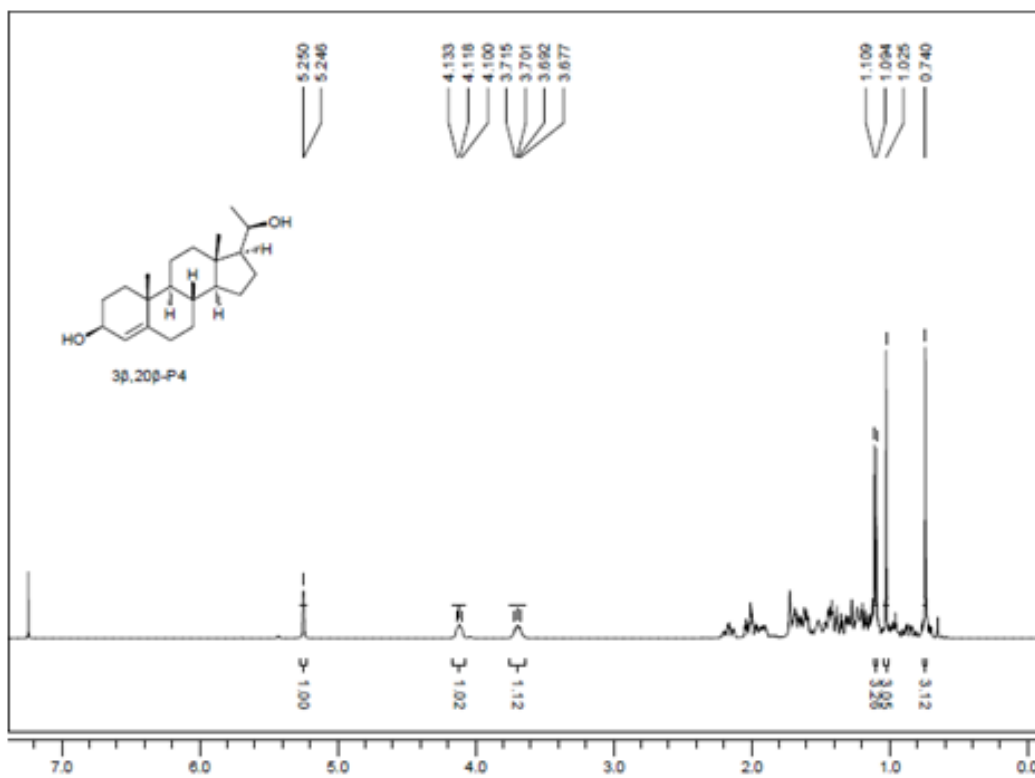


Slika 33: Spekter MS drugega vrha

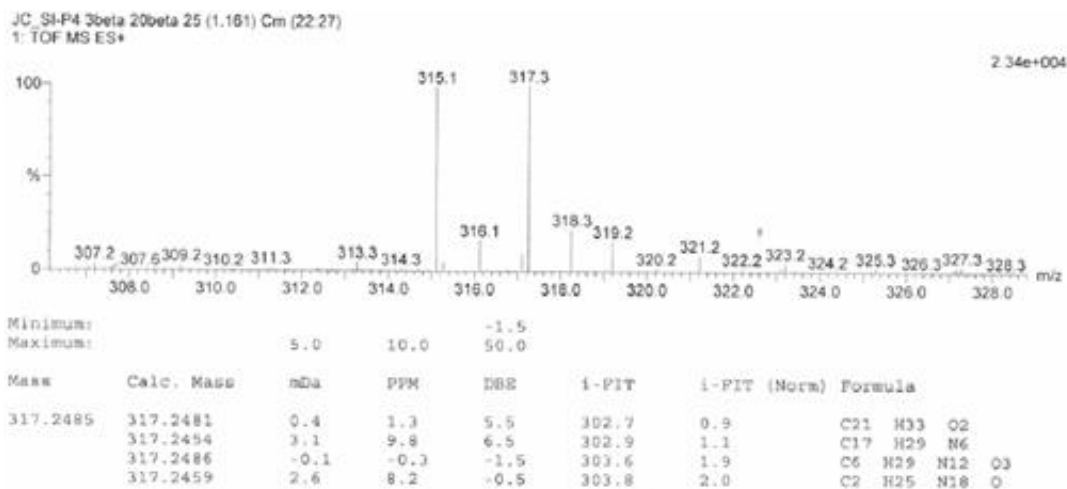
Izoliran tretji vrh na kromatogramu predstavlja **3 β ,20 β -P4**



Slika 34: Kromatogram tretjega vrha na HPLC

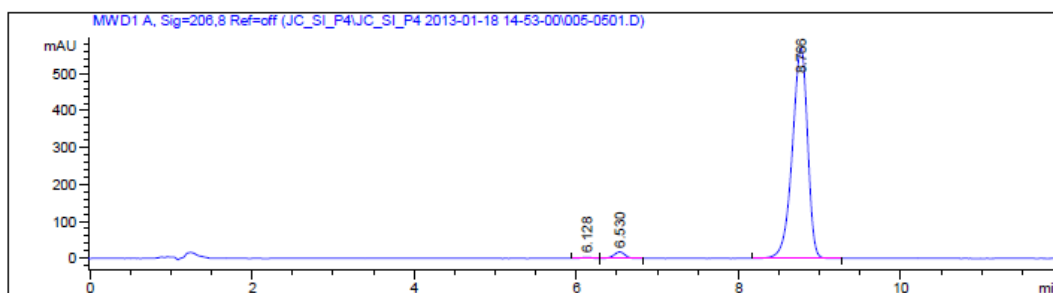


Slika 35: Spekter NMR tretjega vrha

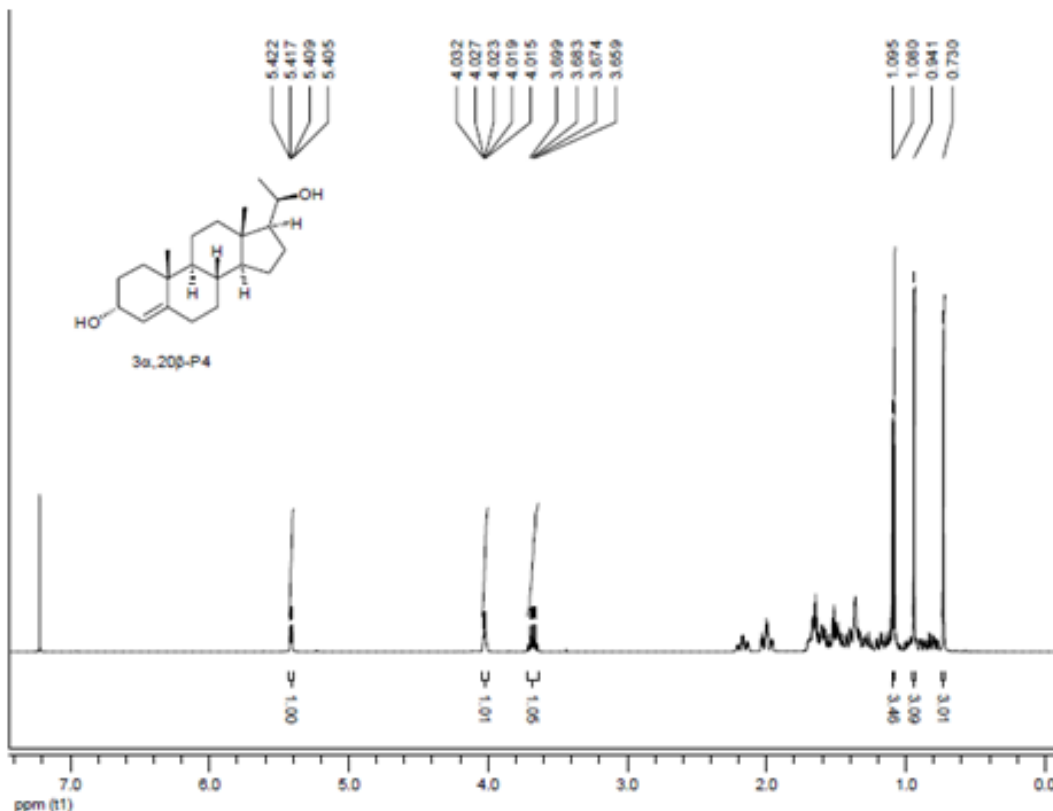


Slika 36: Spekter MS tretjega vrha

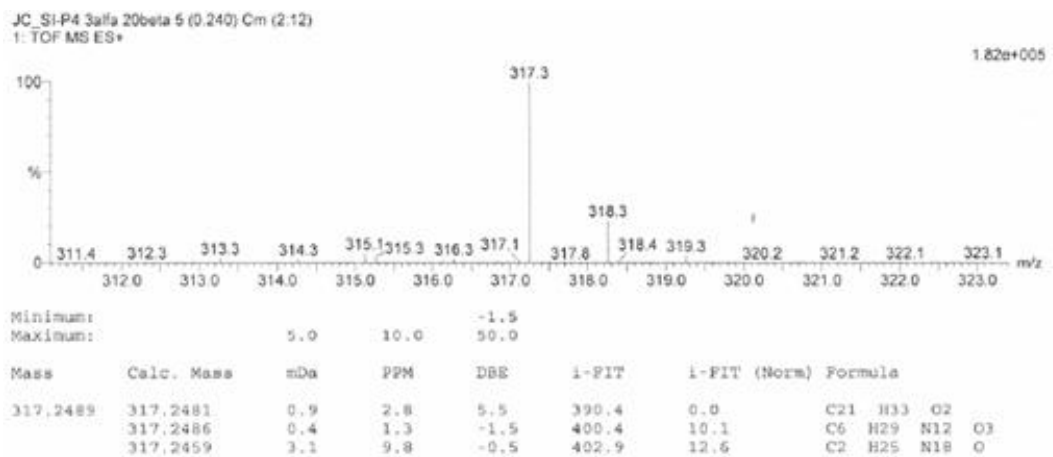
Izoliran četrti vrh na kromatogramu predstavlja **3 α ,20 β -P4**



Slika 37: Kromatogram četrtga vrha na HPLC



Slika 38: Spekter NMR četrtga vrha



Slika 39: Spekter MS četrtga vrha

Med eksperimentalnim delom smo uspešno sintetizirali iskane štiri derivate P4 in le-te kasneje uspešno ločili med seboj s pomočjo različnih tekočinskih kromatografij. S pomočjo »flash« kromatografije nam je uspelo ločiti prvi, tretji in četrti vrh na HPLC kromatogramu. Več težav smo imeli z drugim vrhom, kateri se je nahajal v frakcijah, ki je vseboval tudi tretji in v nekaterih frakcijah tudi prvi vrh. Za ločbo drugega vrha od prvega in tretjega vrha smo uporabili preparativno HPLC kromatografijo. Z uporabo le-te nam je uspelo ločiti tudi drugi vrh od ostalih vrhov.

Z MS smo potrdili molsko maso iskanih čistih derivatov. Vsi iskani derivati imajo enako molsko maso in sicer 317,25 g/mol, medtem ko je bila predpisana vrednost v članku 318,25 g/mol (razlika je posledica samega načina ionizacije pri snemanju MS spektrov). V našem primeru je to pravilna potrditev, saj smo iskali štiri stereoizomere. Osnovni skelet za iskane posamezne derivate je isti. Razlika je le v tem, v kateri ravnini se nahaja –OH skupina na C-3 in na C-20.

Posneli smo NMR spektre vseh štirih derivatov in dobljene spektre (kemijske premike posameznih skupin) primerjali med seboj ter z vrednostmi, ki so popisane v članku (25).

derivat	Kromatografski vrh (izokratska metoda z MeOH)	molska masa (g/mol)	18-CH ₃ (ppm)	19-CH ₃ (ppm)	21-CH ₃ (ppm)	3-H (ppm)	4-H (ppm)	20-H (ppm)
3α,20α-P4	tretji	318,26	0,69	0,98	1,22	4,07	5,44	3,70
3α,20β-P4	četrti	318,26	0,73	0,94	1,09	4,03	5,40	3,67
3β,20α-P4	prvi	318,26	0,66	1,03	1,20	4,13	5,26	3,70
3β,20β-P4	drugi	318,26	0,74	1,03	1,10	4,12	5,25	3,71

Tablela 12: NMR vrednosti v članku (25)

derivat	Kromatografski vrh (gradientna metoda z MeCN)	molska masa (g/mol)	18-CH ₃ (ppm)	19-CH ₃ (ppm)	21-CH ₃ (ppm)	3-H (ppm)	4-H (ppm)	20-H (ppm)
3α,20α-P4	drugi	317,25	0,66	0,96	1,23	4,07	5,47	3,71
3α,20β-P4	četrti	317,25	0,73	0,94	1,09	4,02	5,41	3,68
3β,20α-P4	prvi	317,25	0,66	1,03	1,21	4,13	5,26	3,68
3β,20β-P4	tretji	317,25	0,74	1,03	1,11	4,12	5,25	3,70

Tabela 13: Vrednosti kemijskih premikov značilnih signalov v ¹H-NMR spektru, ki so nam služile za identifikacijo posameznih derivatov.

Iz primerjave tabel 12 in 13 smo ugotovili, da se vrednosti kemijskih premikov naših derivatov povsem ujemajo z literaturnimi, tako da smo lahko že zgolj na njihovi podlagi identificirali strukturo posameznih derivatov. V tabeli je tudi opazno, da se drugi in tretji vrh zamenjata ob menjavi mobilne faze in sicer MeOH z MeCN.

6. SKLEP

V okviru magistrskega dela smo sintetizirali in izolirali štiri reducirane derivate progesterona, kateri imajo na mestih 3 in 20 hidroksilno skupino. Pri redukciji z $\text{Al}(\text{iPrO})_3$ so nastali vsi štiri iskani derivati, v različnih deležih. Pri zamenjavi reducenta z NaBH_4 sta nastala samo dva derivata. Odločili smo se, da to pot opustimo.

S kolonsko »flash« kromatografijo nam je iz zmesi produktov uspelo izolirati P4 derivate, ki so jim pripadali prvi vrh ($3\beta,20\alpha\text{-P4}$), tretji vrh ($3\beta,20\beta\text{-P4}$) in četrti vrh ($3\alpha,20\beta\text{-P4}$) na kromatogramu. Uporabili smo reverzno-fazno kolono ter zmes vode, metanola in acetonitrila za mobilno fazo. Po kromatografski ločbi smo sestavo frakcij preverili s HPLC sistemom ter združili tiste frakcije, ki so vsebovale samo en vrh. Čiste produkte smo izolirali z odparitvijo organskega topila ter liofilizacijo.

Z ločbo drugega derivata, ki mu je pripadal drugi vrh, smo imeli največ težav, saj se je leta nahajal v frakcijah, ki so vsebovale tudi tretji vrh. V nekaterih frakcijah je bil ob drugem in tretjem vrhu prisoten tudi prvi vrh, predvsem v prvih frakcijah, ki so prve prihajale iz »flash« kromatografije. Poizkusi zamenjave organskega topila, pri katerih smo za ločbo namesto metanola in acetonitrila uporabili izopropanol in tetrahidrofuran, niso obrodili sadov.

Drugi vrh nam je uspelo ločiti s pomočjo preparativne HPLC, kjer smo namesto analitske kolone uporabili preparativno kolono. Ločba s preparativno kolono je bila uspešna, saj smo na ta način uspeli ločiti tudi drugi iskani vrh ($3\alpha,20\alpha\text{-P4}$).

Strukturo izoliranih derivatov smo potrdili z NMR spektroskopijo in masno spektrometrijo. S tem smo potrdili, da smo med eksperimentalnima deloma uspešno sintetizirali in kasneje ločili naslednje derivate: $3\alpha,20\alpha\text{-P4}$ (drugi vrh); $3\alpha,20\beta\text{-P4}$ (četrti vrh); $3\beta,20\alpha\text{-P4}$ (prvi vrh) in $3\beta,20\beta\text{-P4}$ (tretji vrh).

Prav tako smo za raziskovalne namene pridobili dovolj čistih derivatov za dokazovanje njihove prisotnosti trenutno še v celičnih linijah, kasneje za določanje prisotnosti v sesalskem organizmu. Za pridobivanje večjih količin derivata $3\alpha,20\alpha\text{-P4}$ bi bilo smiselno sintezo in izolacijo še nekoliko optimizirati, saj so njegove količine znatno manjše od ostalih treh derivatov.

7. LITERATURA

- (1) Internet: <http://en.wikipedia.org/wiki/Progesterone>, dostopano 8.4.2013
- (2) Internet: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Steroidogenesis.svg>, dostopano 10.8.2013
- (3) Internet: http://www.mitax.si/progesterone_therapy.html, dostopano 8.4.2013
- (4) Internet: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Jaj%C4%8Dnik>, dostopano 11.8.2013
- (5) MacNevin CJ, Atif F, Sayeed I., Stein DG and Loitta: Development and screening of water – soluble analogues of progesterone and allopregnanolone in models of brain injury: *Jornual of medicinal chemistry* 2009: 52 (19), 6012 - 6023
- (6) Wiebe JP: Progesterone metabolites in breast cancer: *Endocrine – related cancer* 2006: 13, 717 – 738
- (7) Wiebe JP, Muzia D, Hu J, et al.: The 4-pregnene and 5 α -pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion; *Cancer research* 2000: 60, 936-943
- (8) Wiebe JP, Lewis MJ: Activity and expression of progesterone metabolizing 5 α -reductase, 20 α -hydroxysteroid oxidoreductase and 3 α (β)-hydroxysteroid oxidoreductase in tumorigenic (MCF-7, MDA-MB-231, T-47D) and nontumorigenic (MCF-10A) human breast cancer cells: *BMC cancer* 2003: 3, 9
- (9) Wiebe JP, Lewis MJ, Cialacu V, Pawlak KJ, Zhang G: The role of progesterone metabolites in breast cancer: Potential for new diagnostic and therapeutics: *Journal of steroids biochemistry & molecular biology* 2005: 93, 201 – 208
- (10) Pawlak KJ, Wiebe JP: Regulation of estrogen receptor (ER) levels in MCF-7 cells by progesterone metabolites: *Journal of steroids biochemistry & molecular Biology* 2007: 107, 172 -179
- (11) Mohareb RM, Hana HY; Synthesis of progesterone heterocyclic derivatives of potential antimicrobial activity: *Acta Pharm.* 2008: 58, 29-42
- (12) Internet: <http://en.wikipedia.org/wiki/Chromatography>, dostopano 12.8.2013
- (13) Internet: <http://www.sms-muzeji.si/udatoteke/publikacija/netpdf/6-3-7.pdf>, dostopano 13.4.2013
- (14) Meyer VR: *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, Fourth Edition, Switzerland, 2005

- (15) Internet:
<http://orgchem.colorado.edu/Technique/Procedures/Columnchrom/Columnchrom.html>, dostopano 17.4.2013
- (16) Internet: http://en.wikipedia.org/wiki/High-performance_liquid_chromatography, dostopano 18.4.2013
- (17) Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL: Practical HPLC method development, Second Edition: USA, 1997, 174 – 349 in 616 – 642
- (18) Internet: <http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5989-6639EN.pdf>; dostopano 28.8.2013
- (19) European Pharmacopeia, 7th Edition 2013 (7,8), 2.2.46. Chromatographic separation techniques.
- (20) Svete J: Preparativna organska kemija: Ljubljana, 1999, 76 - 79
- (21) Internet: <https://www.chromspec.com/pdf/e/kn11.pdf>, doatopano 18.4.2013
- (22) Huber U, Majors RE: Principles in preparative HPLC, Germany, 2007
- (23) Internet: http://sl.wikipedia.org/wiki/Jedrska_magnetna_resonanca, dostopano 30.8.2013
- (24) Internet:
<http://www.usciences.edu/academics/collegesDepts/chemistry/instrum/nmrsec2.aspx>, dostopano 18.5.2013
- (25) Wiebe JP, Davea V, Stothersb JB: Synthesis and characteristics of allylic 4-pregnene-3,20-diols found in gonadal and breast tissues: Steroids 1986, 47/4 – 5, 249 – 259
- (26) Internet: <http://hr.wikipedia.org/wiki/Destilacija>, dostopano 11.5.2013
- (27) Internet: <http://www.biotage.com/DynPage.aspx?id=58261>, dostopano 17.4.2013
- (28) Internet: <http://www.biotage.com/DynPage.aspx?id=56922>, dostopano 17.4.2013