

Primena metoda tankoslojne hromatografije i hromatografije na koloni u praćenju sinteze α -tokoferil-lizin estra

Žarko Gagić^{1*}, Branka Ivković², Katarina Nikolić², Danica Agbaba²

¹ Univerzitet u Banjoj Luci – Medicinski fakultet, Odsek farmacija, Save Mrkalja 14, Banja Luka, Republika Srpska

² Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku hemiju, Vojvode Stepe 450, Beograd, Srbija

*autor za prepisku, Tel: +387 51 340 106; e-mail: zarko.gagic@unibl.rs

Kratak sadržaj

Vitamin E sačinjavaju dve klase jedinjenja, tokoferoli i tokotrienoli. Dobro je poznata njegova antioksidativna aktivnost, a danas se posebna pažnja obraća na upotrebu vitamina E i njegovih derivata u prevenciji i terapiji kancera. Sintetisani su brojni derivati vitamina E koji ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost. Pokazano je da estar α -tokoferola sa aminokiselinom lizinom ispoljava bolju antiproliferativnu aktivnost na MCF-7 ćelijskoj liniji karcinoma dojke u odnosu na komercijalno dostupne preparate. U prvoj fazi sintetisan je estar α -tokoferola sa di-Cbz-lizinom. Tok sinteze estra praćen je metodom tankoslojne hromatografije (mobilna faza: *n*-heksan/etilacetat 3: 1,2 v/v), dok je prečišćavanje proizvoda izvršeno *dry flash* hromatografijom i preparativnom hromatografijom na ploči (mobilna faza: *n*-heksan -etil acetat 3: 1,2 v/v). U drugoj fazi katalitičkom hidrogenacijom uklonjene su zaštitne Cbz-grupe sa amino grupa lizina. Finalni proizvod α -tokoferil lizin estar detektovan je primenom TLC metode (mobilna faza: dihlormetan–metanol–amonijak 9 : 0,9 : 0,1 v/v/v).

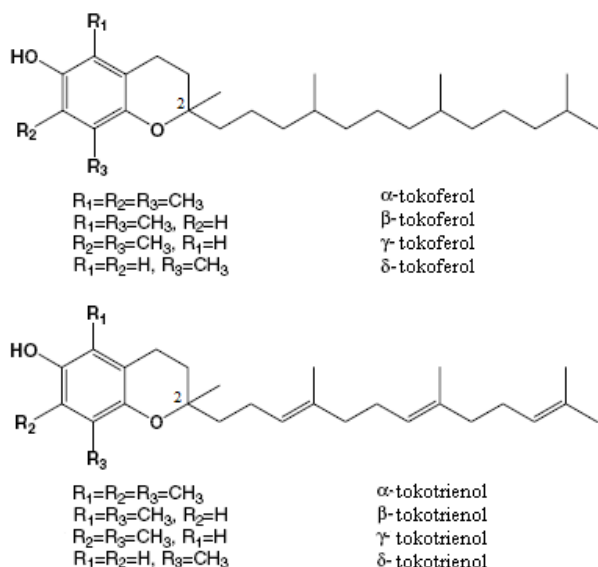
Ključne reči: α -tokoferol; antiproliferativna aktivnost; MCF-7; tankoslojna hromatografija; *dry flash* hromatografija

Uvod

Vitamin E predstavlja snažan prirodni antioksidans koji u organizmu kontroliše reakcije peroksidacije i stvaranje slobodnih radikala. Ustanovljeno je da mnoga biološka dejstva individualnih izoformi vitamina E ne zavise od njihove antioksidativne aktivnosti. Danas se posebna pažnja obraća na upotrebu vitamina E i njegovih derivata u prevenciji i terapiji kancera. Specifične forme vitamina E ispoljavaju snažnu apoptotsku aktivnost protiv različitih tipova tumorskih ćelija, dok ne deluju, ili u maloj meri deluju, na aktivnost zdravih ćelija.

Ekperimentalni podaci su pokazali da unutarćelijski mehanizmi nastajanja apoptotskih efekata specifičnih formi vitamina E pokazuju veliki diverzitet kod različitih tipova ćelija kancera. Takođe je dokazano, da derivati vitamina E mogu da uspostave ponovnu osetljivost multirezistentnih tumorskih ćelija na hemoterapijske agense. Ovi podaci jasno ukazuju da se sintetski i neki prirodni analozi vitamina E mogu efikasno koristiti u terapiji kancera, bilo sami ili u kombinaciji sa drugim antitumorskim lekovima, kako bi se poboljšalo njihovo dejstvo i smanjila toksičnost [1, 2].

Vitamin E sačinjavaju dve klase jedinjenja, tokoferoli i tokotrienoli, koje karakteriše hromanski prsten i izoprenski bočni lanac. Članovi svake familije su označeni kao alfa (α -), beta (β -), gama(γ -) ili delta (δ -), u zavisnosti od rasporeda metil grupa vezanih za hromanski deo molekula (Slika 1a). Postoji 8 mogućih stereoisomera, pri čemu se samo RRR-forma javlja u prirodi. Tokoferoli i tokotrienoli se razlikuju po bočnom lancu u položaju 2 hromanskog prstena, koji je kod tokoferola zasićen a kod tokotrienola nezasićen (Slika 1a) [3].



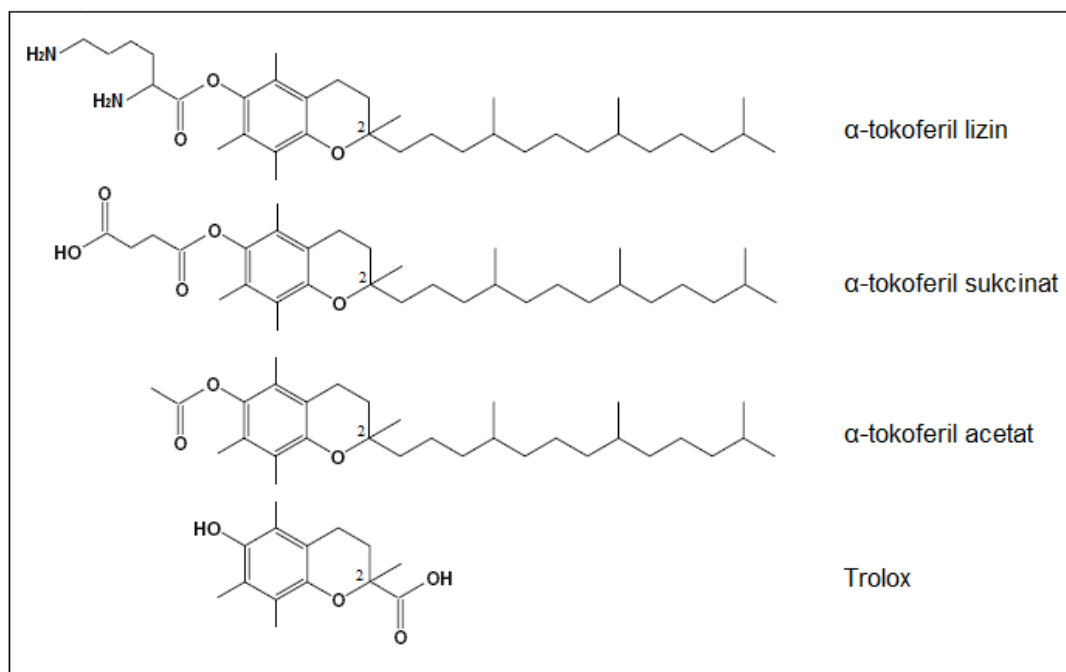
Slika 1a. Jedinjenja iz grupe vitamina E

Figure 1a. The compounds of the vitamin E family

Derivati vitamina E, kao što je α -tokoferil sukcinat, koji su esterifikacijom sa dikarboksilnim kiselinama *izgubili* aktivnost protiv slobodnih radikala, deluju na rast mnogih malignih ćelija i indukuju apoptozu efektivnije od samog α -tokoferola. Studije veze između strukture i dejstva ukazuju na ključnu ulogu sukcinil komponente u započinjanju *pro*-apoptotske kaskade događaja kroz sinergističke puteve. α -Tokoferil komponenta je uključena u aktivaciju protein fosfataze 2A (PP2A), što vodi ka inaktivaciji protein kinaze C (PKC) i defosforilaciji *anti*-apoptotičkog mitohondrijalnog proteina *bcl-2*. Naelektrisana sukcinil grupa uzrokuje destabilizaciju mitohondrijalnih i lizosomalnih membrana, što dalje vodi ka α -tokoferil-indukovanom oslobađanju citohroma C, i prema tome pojačanju apoptotičkog signala [4 - 6].

Građenjem aminokiselinskih estara u molekul se uvodi pozitivno naelektrisana grupa koja se u *in vivo* uslovima hidrolizuje pod dejstvom esteraza. Modifikacijom dužine bočnog aminokiselinskog lanca smanjuje se lipofilnost i povećava rastvorljivost u vodenom medijumu. Hromanski prsten kao farmakoforni deo molekula ostaje nedirnut, jer *nor* i *homo* analogi pokazuju neznatno bolju antioksidativnu aktivnost.

Antiproliferativna aktivnost estra α -tokoferola sa lizinom (Slika 1b) na humanoj ćelijskoj liniji kancera dojke (MCF-7) upoređena je sa komercijalno dostupnim derivatima vitamina E (α -tokoferol, α -tokoferil acetat, α -tokoferil sukcinat i *rac*-Trolox). Zamena acetatne grupe α -tokoferil acetata sa lizinom je imala za rezultat značajan porast antiproliferativne aktivnosti [7].



Slika 1b. Derivati vitamina E

Figure 1b. Derivatives of vitamin E

Cilj ovog rada bio je definisanje optimalnih hromatografskih uslova za praćenje toka sinteze α -tokoferil-lizin estera, kao i hromatografskih uslova za prečišćavanje finalnog proizvoda. Tok sinteze estera praćen je metodom tankoslojne hromatografije (eng. *Thin Layer Chromatography* – TLC), dok je za prečišćavanje proizvoda upotrebljena *dry flash* hromatografija i preparativna hromatografija na ploči.

Eksperimentalni deo

Rastvarači i hemikalije. Svi rastvarači i hemikalije koji su korišćeni u radu su p. a. čistoće: hloroform, metanol, etil acetat, *n*-heksan i amonijak proizvođača Merck, Nemačka, a *p*-dimetilamino benzaldehid, koncentrovana sumporna kiselina i etanol proizvođača Sigma Aldrich, USA.

Hromatografski sistem. Kao stacionarna faza korišćene su komercijalne, aluminijske ploče silikagela GF 254 (Merck, Nemačka). Za pripremu preparativnih ploča korišćen je silikagel GF 254 (Merck, Nemačka). Hromatografija u koloni izvedena je na silikagel 60 za *dry flash* hromatografiju (veličina čestica 0,035 mm 0,075 mm (220 – 440 mesh), veličina pore 60 Å) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

Priprema ploče za preparativnu hromatografiju: Odmereno je 22 g silikagela, suspendovano u 55 mL vode i mešano kružnim pokretima ruke oko 5 min. kako bi se istisnuo inkorporirani vazduh. Masa je nanosena na staklenu ploču 20 cm x 20 cm koja je prethodno prebrisana acetonom i ostavljena da se osuši na sobnoj temperaturi. Aktivacija silikagela izvršena je grejanjem u sušnici na 105 °C tokom jednog sata.

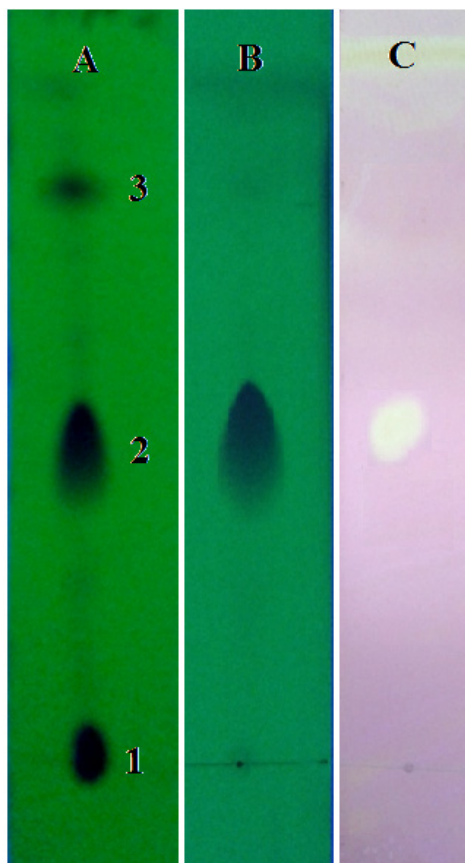
Priprema kolone za dry flash hromatografiju: Odmerena je količina silikagela koja je 25 do 50 puta veća u odnosu na količinu sirovog uzorka za razdvajanje i aktivirana u sušnici na 105 °C tokom jednog sata. Aktiviranim silikagelom je napunjen stakleni levak sa dnom od sinterovanog stakla, a zatim pipetom dodavan *n*-heptan kao rastvarač manje polarnosti i njime natapan adsorbens. Rastvarač je kroz silikagel istisnut pomoću vakuuma, a zatim pipetom ravnomerno nanosen na vrh stuba adsorbensa uzorak rastvoren u eluentu.

Rezultati i diskusija

U prvoj fazi sintetisan je estar α -tokoferola sa di-Cbz-lizinom [8]. Za praćenje toka reakcije primenjena je TLC metoda. Za razdvajanje proizvoda sinteze od polaznih supstanci bilo je neophodno pronaći mobilnu fazu optimalnog sastava. Pripremljeno je više mobilnih faza sledećeg sastava:

- hloroform
- hloroform – metanol, 10 : 0,5; 10 : 1; 10 : 1,5 v/v
- *n*-heksan
- *n*-heksan – etil acetat, 3 : 0,5; 3 : 0,8; 3 : 1; 3 : 1,2; 3 : 1,5 v/v

Najbolje razdvajanje polaznih komponenata od finalnog proizvoda (estra) postignuto je upotrebom mobilne faze *n*-heksan – etil acetat, 3 : 1,2 v/v. Budući da su za TLC korištene ploče sa fluorescentnim indikatorom mrlje su detektovane pod UV-lampom. Dodatno, detekcija mrlja je izvršena uranjanjem pločice u rastvor kalijum permanganata, a potom izlaganjem pločice povišenoj temperaturi. Na Slici 2 predstavljeno je razdvajanje komponenata iz reakcione smeše (A), prečišćeni estar (B) i detekcija prečišćenog estra pomoću rastvora kalijum permanganata (C), mobilna faza *n*-heksan – etil acetat, 3 : 1,2 v/v.

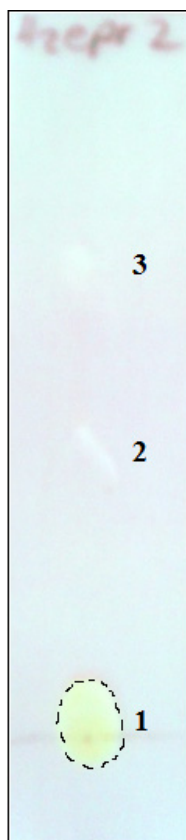


Slika 2. TLC hromatogrami: A – reakciona smeša, 1-di-Cbz-lizin; 2- α -tokoferol-di-Cbz-lizin estar; 3- α -tokoferol (detekcija: UV); B – prečišćeni estar (detekcija: UV); C – prečišćeni estar (detekcija: KMnO_4). Mobilna faza: *n*-heksan–etil acetat, 3 : 1,2 V/V.

Figure 2. TLC chromatograms: A - the reaction mixture, 1-di-Cbz-lysine; 2- α -tocopherol-di-Cbz-lysine ester; 3- α -tocopherol (detection: UV); B - purified ester (detection: UV); C - purified ester (detection: KMnO_4). Mobile phase: *n*-hexane-ethyl acetate, 3: 1,2 V / V.

Nakon završetka reakcije prečišćavanje estera je izvršeno *dry flash* hromatografijom na silikagelu uz mobilnu fazu *n*-heksan – etil acetat, 3 : 1,2 v/v. Sakupljene su frakcije koje su sadržale estar, nakon čega je uklonjen rastvarač uparavanjem na rotacionom vakuum uparivaču. Frakcije koje su pored estera sadržavale i polazni tokoferol takođe su sakupljene i izvršeno je dodatno prečišćavanje preparativnom TLC. Sa ploče je izolovana zona koja odgovara α -tokoferil-di-Cbz-lizin estru i izvršena je ekstrakcija acetonom.

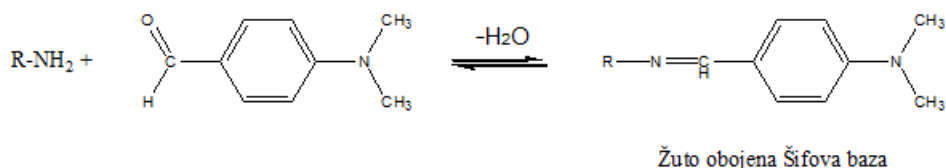
U drugoj fazi katalitičkom hidrogenacijom uklonjene su zaštitne Cbz-grupe sa amino grupa lizina [8]. Tok reakcije praćen je TLC metodom. Pri hromatografskim uslovima navedenim u tekstu (mobilna faza *n*-heksan – etil acetat, 3 : 1,2 v/v) proizvod reakcije zadržavao se na startu (Slika 3).



Slika 3. TLC hromatogram: 1- α -tokoferil-lizin estar; 2- α -tokoferol- di-Cbz-lizin estar; 3- α -tokoferol (detekcija: Ehrlich-ov reagens). Mobilna faza: *n*-heksan – etil acetat, 3 : 1,2 V/V.

Figure 3. TLC chromatogram: 1- α -tocopheryl-lysine ester; 2- α -tocopheryl- di-Cbz-lysine ester; 3- α -tocopherol (detection: Ehrlich's reagent). Mobile phase: *n*-hexane – ethyl acetate, 3: 1,2 V / V.

Proizvod je detektovan prskanjem hromatografske pločice Ehrlich-ovim reagensom. Ehrlich-ov reagens u svom sastavu sadrži p-dimetilaminobenzaldehid koji sa amino grupom gradi žuto obojenu Šifovu bazu (Šema 1).



Šema 1. Mehanizam nastanka Šifove baze

Scheme 1. The mechanism of Schiff base formation

Budući da reakcijom nastaje proizvod sa polarnim amino grupama bilo je potrebno definisati novi sistem rastvarača čija bi polarnost u poređenju sa prethodnim bila veća i time uticala na pokretljivost baznog estara. Pripremljeno je više mobilnih faza:

- hloroform – metanol – amonijak, 10 : 1 : 0,1; 8 : 1 : 0,1, 8 : 1,5 : 0,1 v/v/v
- hloroform – aceton, 4 : 1 v/v
- dihlormetan – metanol, 9,5 : 0,5; 9 : 1 v/v
- dihlormetan – metanol – amonijak, 9,5 : 0,4 : 0,1; 9 : 0,9 : 0,1 v/v/v

Najbolju pokretljivost ($R_f = 0,2$) sintetisani estari pokazao je sa sistemom rastvarača dihlormetan – metanol – amonijak, 9 : 0,9 : 0,1 v/v/v kao mobilnom fazom. Mrlje su detektovane pod UV-lampom (Slika 4) i prskanjem Ehrlich-ovim reagensom. Prisustvo amonijaka kao baznog modifikatora utiče na pokretljivost baznog estara kao i polarniji dihlormetan.



Slika 4. TLC hromatogram: α -tokoferol-lizin estar (detekcija: UV). Mobilna faza: dihlormetan – metanol – amonijak, 9 : 0,9 : 0,1 V/V/V.

Figure 4. TLC chromatogram: α -tocopheryl-lysine ester (detection: UV). Mobile phase: dichloromethane - methanol - ammonia, 9: 0,9: 0,1 V / V / V.

Zaključak

Za praćenje sinteze estra tokoferola sa aminokiselinom lizinom uspešno je primenjena TLC metoda. Pronađeni su optimalni uslovi za razdvajanje polaznih komponenata od proizvoda reakcije a detekcija proizvoda izvršena je posmatranjem pločice pod UV-lampom, uranjanjem u rastvor kalijum permanganata i prskanjem Ehrlich-ovim reagensom. Za prečišćavanje proizvoda primenjena je metoda *dry flash* hromatografije na silikagelu. Uz pronalaženje optimalnog sastava mobilne faze TLC i hromatografija na koloni predstavljaju brz i jednostavan način za praćenje toka reakcije i prečišćavanje proizvoda.

Literatura

1. Guthrie N, Gapor A, Chambers AF, Carroll KK. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 and -positive MCF-7 human breast cancer cells by palm oil tocotrienols and tamoxifen, alone and in combination. *J Nutr* 1997;127(3):544-48.
2. McIntyre BS, Briski KP, Tirmenstein MA, Fariss MW, Gapor A, Sylvester PW. Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on normal mouse mammary epithelial cells. *Lipids* 2000;35(2):171-80.
3. Combs GF, Jr (ed.). *The Vitamins. Fundamental aspects in nutrition and health.* Academic Press, Inc. USA; 1992, 63 p.
4. Yu W, Simmons-Menchaca M, Gapor A, Sanders BG, Kline K. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by tocopherols and tocotrienols. *Nutr Cancer* 1999;33(1):26-32.
5. Shah S, Gapor A, Sylvester PW. Role of caspase-8 activation in mediating vitamin E-induced apoptosis in murine mammary cancer cells. *Nutr Cancer* 2003;45(2):236-46.
6. Nikolic KM, Design and QSAR study of analogs of α -tocopherol with enhanced antiproliferative activity against human breast cancer cells. *J Mol Graph Model* 2007; 26:868-73.
7. Arya P, Alibhai N, Qin H, Burton BW. Design and synthesis of analogs of vitamin E: Antiproliferative activity against human breast adenocarcinoma cells. *Bioorg Med Chem Lett* 1998;8: 2433-38.
8. Gagic Ž, Ivkovic B, Vucicevic J, Agbaba D, Nikolic K. The synthesis of amino acid analog of vitamin E. *Proceedings of the 12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry; 2014 Sep 22-26; Society of Physical Chemists of Serbia, Belgrade, Serbia.* 2014;1:1149-52.

Application of thin layer and column chromatography in monitoring the synthesis of α -tocopheryl-lysine ester

Žarko Gagić ^{1*}, Branka Ivković ², Katarina Nikolić ², Danica Agbaba ²

¹ University of Banja Luka - Faculty of Medicine, Pharmacy Department,
Save Mrkalja 14, Banja Luka, Republika Srpska

² University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical
Chemistry, Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia

* Corresponding author, Tel: +387 51 340 106; e-mail: zarko.gagic@unibl.rs

Summary

Vitamin E comprises of two families of compounds, tocopherols and tocotrienols. It is well known for its antioxidant activity, but recently special attention is paid to the use of vitamin E and its derivatives in the prevention and the treatment of cancer. Various derivatives of vitamin E are synthesized, which exhibit antiproliferative activity. It has been shown that the α -tocopherol ester with the amino acid lysine exhibits improved antiproliferative activity on MCF-7 breast cancer cell line as compared to commercially available preparations. The first stage was the synthesis of α -tocopherol ester with di-Cbz-lysine. Synthesis of ester was monitored by thin layer chromatography (mobile phase: *n*-hexane-ethyl acetate 3: 1,2 v/v) and the purification of product was done by *dry flash* column chromatography and by preparative plate chromatography (mobile phase: *n*-hexane-ethyl acetate 3: 1,2 v/v). In the second stage, Cbz protecting groups were removed by catalytic hydrogenation. The final product α -tocopheryl-lysine ester was detected by TLC (mobile phase: dichloromethane-methanol-ammonia 9 : 0,9 : 0,1 v/v).

Key words: α -tocopherol; antiproliferative activity; MCF-7;
thin layer chromatography; *dry flash* chromatography
