

Centro de Química Farmacéutica

ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LA SAL SÓDICA DE LA PROSTACICLINA OBTENIDA EN CUBA

José A. González Lavaut,¹ Marta Álvarez Sotolongo,² Jorge Pérez Pons³ y Osmel Díaz Abín⁴

RESUMEN

Se realizó el análisis físico-químico de la sal sódica de la prostaciclina por espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear protónica y de carbono-13. Como corroboración de la estructura de la molécula estudiada se realizó también el estudio espectroscópico al producto de su hidrólisis, la 6-ceto prostaglandina $F_{1\alpha}$ mediante la espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear protónica y de carbono-13 con ayuda de las técnicas COSY, así como el reporte de la composición elemental. Se realizó un estudio de la transformación hidrolítica de la sal sódica de la prostaciclina en 6-ceto prostaglandina $F_{1\alpha}$ con el empleo de la detección por cromatografía líquida de alta resolución, lo cual corroboró que éste es el producto único que se forma en dicho proceso.

Descriptor DeCS: EPOPROSTENOL/química.

La sal sódica de la prostaciclina (ácido 6,9-epoxi-11,15-dihidroxi-prosta-5,13-dienoico sal sódica; PGI_2Na) pertenece a la familia de los prostanoides y es utilizada para el tratamiento de la hipertensión pulmonar, como inhibidor de la agregación plaquetaria, lavado de órganos para trasplantes y plaquetas, así como para el tratamiento de otras afecciones del sistema cardiovascular, respiratorio, etcétera.¹

El descubrimiento, la síntesis y la determinación estructural de la prostaciclina

(PGI_2), fueron precedidas por varias observaciones relevantes; la más importante de éstas fue la caracterización y síntesis de la molécula de 6-ceto prostaglandina $F_{1\alpha}$ (6CPGF). El aislamiento de este compuesto de fuentes biológicas y no de la prostaciclina, relativa a su alta reactividad, motivó el estudio de su interconversión.²

La PGI_2 es muy inestable y dada sus propiedades químicas es muy susceptible a una rápida hidrólisis a 6CPGF y consecuentemente su inactivación.³ El descubrimiento

¹ Licenciado en Química. Investigador Auxiliar.

² Doctora en Ciencias Farmacéuticas. Investigadora Titular. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos.

³ Técnico Medio en Química. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos.

⁴ Técnico Medio en Química.

de que la PGI₂ es (a) el paso biosintético intermedio entre la PGH₂ y la 6CPGF y (b) la rápida hidrólisis a 6CPGF dio una explicación a la existencia de esta molécula en varios sitios biológicos.¹ Esta hidrólisis rápida se debe a la proximidad del grupo 1-carboxilo al sistema enol cíclico estéricamente torcido de la PGI₂, provocando la adición de agua por vía de la migración de enlaces y ruptura del anillo a 6-ceto. Este mecanismo es soportado por el incremento de la estabilidad hidrolítica de ésteres de PGI₂.⁴

Tal inusual alta reactividad de PGI₂ debida al vinil éter es atribuida a factores estéricos que incrementa la velocidad de protonación del carbono 5, cuya constante de velocidad de primer orden es independiente del pH para la hidrólisis espontánea, catalizada por agua como un ácido general.^{5,6}

Se señala en un artículo de *De B y otros*⁷ que la identificación de la PGI₂ obtenida, se basó en la inhibición de la agregación plaquetaria de los trombocitos humanos con esta sal y su inestabilidad a un pH ácido del medio, conjuntamente con la demostración química posterior de este metabolito, lo que le permitió concluir sobre la compatibilidad de la configuración de la PGINa. Igual señalamiento realizan *Johnson y otros*² al plantear que la estructura asignada a la PGI₂ depende de la comparación de las propiedades biológicas y químicas de la PGI₂ natural con la de la sal sódica de la síntesis.¹

Un estudio colaborativo entre los laboratorios de las firmas Upjohn y Wellcome Research estableció la estructura de la PGI₂ al señalar que es un enol éter bicíclico que descompone por hidrólisis a valores de pH fisiológico para dar 6CPGF.⁴

La PGINa es higroscópica.⁸ Se señala que muestras de PGINa contienen trazas de agua y bicarbonato de sodio que son excesivamente difícil de eliminar, por lo cual no ha sido posible obtener muestras puras

del ácido libre ya que siempre la 6CPGF está presente.³ Cuando se aplicó a placas de cromatografía de capa delgada (CCD) sobre silicagel y se desarrolló en sistemas de solventes acídicos la PGINa de curso se transformó inmediatamente al ácido libre y por tanto a la 6CPGF.³ Por igual motivo tampoco es posible utilizar columnas cromatográficas para su purificación. Debido a alta sensibilidad el análisis por CCD se realiza al éster metílico por conversión en el derivado p-fenilfenacilo por reacción con α -bromo-p-fenilacetofenona en exceso en presencia de una amina;³ mientras que el análisis por CCD de la PGINa se realiza por transformación a 6CPGF utilizando como control una muestra de referencia.

En el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) fue inmediatamente revelado que la PGI₂ se descompone espontáneamente a 6CPGF durante la resolución en una columna CLAR de fase normal con una fase móvil anhidra, así como en una columna de fase reversa con fase móvil a pH 8,5. Este fenómeno es atribuido al poder catalítico de los sitios de adsorción acídicos en las columnas empleadas,⁵ de ahí la necesidad de trabajar con fases móviles a pH superiores a 9 con vistas a preservar su estabilidad química.

En el análisis por espectrometría de masa se reporta la realización de espectros a derivados silanizados de 6CPGF, señalando que es el método de identificación de este compuesto.⁹

Para realizar el estudio por resonancia magnética nuclear protónica y de carbono-13 y medir sus constantes de acoplamiento, la literatura señala el empleo del éster metílico de PGI₂, en el que se realizó un tratamiento complejo con empleo de disolventes deuterados (CD₃OD, CDCl₃ y D₂O), de soluciones *buffer* y temperaturas muy bajas, como vía de minimizar la hidrólisis de la PGI.¹⁰ Por lo anteriormente expues-

to se justifica que el análisis físico-químico de la sal sódica de la prostaciclina con vistas a corroborar la estructura química puede hacerse mediante la conjunción de los estudios de su acción antiagregante plaquetario y de las propiedades que presenta la 6-cetoprostaglandina $F_{1\alpha}$ como su principal producto de hidrólisis el cual se obtiene por transformación del producto sintetizado.

Es objetivo de este trabajo mostrar los resultados del análisis físico-químico de la sal sódica de la prostaciclina por espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear protónica y de carbono-13. Como corroboración de la estructura de la molécula estudiada, se realiza también el estudio espectroscópico al producto de su hidrólisis, la 6-ceto prostaglandina $F_{1\alpha}$, mediante la espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear protónica y de carbono-13 con ayuda de las técnicas COSY y el análisis de su composición elemental; así como, el estudio de la transformación hidrolítica de la sal sódica de la prostaciclina I_2 en 6-ceto prostaglandina $F_{1\alpha}$ y su detección por CLAR.

MÉTODOS

La PGINa es un polvo blanco-crema que se obtuvo por transformación química a partir de $PGF_{2\alpha}$, según se reporta.⁴ La 6CPGF fue obtenida a partir de la PGINa mediante acidificación de una disolución acuosa y purificada por recristalización. Las sustancias de referencia utilizadas fueron de PGINa de la firma Chinoin, Hungría.

El análisis elemental se realizó en un equipo de microanálisis elemental desarrollado en el laboratorio de la Universidad de Zurich, Suiza.

La temperatura de fusión fue determinada en un equipo Electrothermal (Reino Unido).

Los espectros infrarrojos se registraron en un equipo Bruker y en un espectrofotómetro PU9512.

Los espectros de RMN^1-H , ^{13}C , COSY HH Y HC, se registraron en un equipo Bruker de 200 MHz en dimetilsulfóxido- d_6 para la PGINa y en $CDCl_3$ para la 6CPGF y TMS como referencia interna.

El espectro de masa se realizó en un equipo TRIO-1000, de FISIONS Instruments por el método de introducción directa, modo ionización (EI+) 70 e V y temperatura de la fuente de 270 °C.

Los estudios cromatográficos se realizaron en los equipos de HPLC-KNAUER con detector UV-Knauer de longitud de onda variable y microprocesadora Shimadzu CR-3A y LaChrom (Merck-Hitachi) con una bomba L-7100 y detector UV de longitud de onda variable acoplado a una microcomputadora personal con programa Biochrom (CIGB-Cuba). Se emplearon las condiciones cromatográficas siguientes: columna Lichrospher 100 RP-18, 5 μ (250 x 4 mm), detección a 205 nm, flujo 1,2 mL/min; fase móvil: acetonitrilo: agua (20:80; v:v) llevada a pH=9,3 con *buffer* ácido bórico (0,009 mol/L)-tetraaborato de sodio (0,04 mol/L). Para el análisis de pureza de 6CPGF la fase móvil estuvo compuesta de acetonitrilo: *buffer* de ácido fosfórico (0,017 mol/L) en proporción 32,8:67,2; v:v) con detección a 194 nm y flujo 1 mL/min.

RESULTADOS

CLAR. Con vistas a evaluar la pureza y el perfil cromatográfico de 3 lotes de 6CPGF obtenidos a partir de 3 lotes de PGINa que permitiría confirmar la identidad de estos últimos, se registraron los cromatogramas a muestras de éstas contra material de referencia químico observando un solo pico, lo que demuestra la pureza del producto

obtenido, así como semejante tiempo de retención (alrededor de 6,1 min) a la del material de referencia químico. El perfil cromatográfico de todas las muestras fue el mismo.

Temperatura de fusión. El valor obtenido de la temperatura de fusión para la 6CPGF fue de 105-108 °C, lo que está en correspondencia con lo reportado de 101-108 °C.³

Análisis elemental. El análisis elemental para la 6-ceto prostaglandina F_{2α} reportó los valores siguientes: carbono = 64,53 %; hidrógeno = 9,69 %, resultados permisibles de acuerdo con los teóricos: carbono = 64,86 %; hidrógeno = 9,19 %.

Espectroscopia infrarroja. En el espectro infrarrojo obtenido para la PGINa se observan las bandas características a 3 350 (OH), 1 690 (O-C=C), 1 555 y 1 470 (CO₂) y 970 (C₁₃=C₁₄) cm⁻¹. En los espectros infrarrojos obtenidos para la 6CPGF se observan las bandas características a 3 400 (OH), 2 600 (OH, ácido), 1 690 (C=O) y 970 (C₁₃=C₁₄) cm⁻¹.

Espectrometría de masas. En el espectro de masa para la 6CPGF, obtenido por introducción directa de la muestra sin derivatizar, no aparece el pico de ion molecular; sin embargo, sí se observa un pico característico con un valor de m/z de 352 correspondiente a la pérdida de una molécula de agua y otros picos de diferentes intensidades correspondientes a este compuesto, como: 335, 279, 251, 208, 181 (100 %), 121, 99, etc. En la literatura los espectros de masas referidos a este compuesto se encuentran registrados como derivados.⁹

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear protónica. La asignación de las señales correspondientes dados los corrimientos químicos (δ) en p.p.m. y multiplicidad (s= singlete, t= triplete, m= multiplete) para la PGINa y 6CPGF, son las siguientes:

PGINa: 5,42 (m, 2H, C_{13,14} vinil); 4,48 (m, 1H, CHO); 4,05 (m, 1H, OC=CH); 3,85

(m, 1H, C₁₅H); 3,64 (m, 1H, CHO); 3,40 (s), 2H, OH); 0,85 (t, 3H, CH₃).

6CPGF: 5,5-5,6 (m, 2H, C_{13,14} vinil); 5,0 (s, 3H, 3OH); 3,5-4,6 (m, 6H, CH); 1,9-2,7 (m, 6H, CH); 1,0-1,8 (m, 14H); 0,90 (t, 3H, CH₃).

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de carbono-13. La asignación de las señales correspondientes dados los corrimientos químicos (δ) en p.p.m. para la PGINa y 6CPGF, son las siguientes:

Carbono	PGINa	6CPGF
1	-	177,4
2	37,3	34,8
3	24,7	26,3
4	27,2	26,3
5	96,2	38,2
6	153,6	112,9
7	32,0	40,8
8	44,4	47,0
9	82,9	73,6
10	41,1	42,9
11	76,1	81,2
12	53,4	58,2
13	129,7	132,5
14	135,4	135,9
15	70,8	78,6
16	38,2	34,8
17	25,4	25,2
18	31,2	32,9
19	22,1	23,6
20	13,9	14,4

Con vistas a corroborar lo planteado en la literatura,^{3,6,8} de que la transformación de PGINa a 6CPGF ocurre rápidamente y como producto exclusivo, lo cual permitiera la confirmación de la estructura de la PGINa, fue que se realizó la transformación de ésta en 6CPGF.

En los cromatogramas por CLAR del material de referencia químico y el del producto sintetizado, en el tiempo cero presenta un pico mayoritario correspondiente a la PGINa con un tiempo de retención de

alrededor de 5,6 min y un pico minoritario con tiempo de retención de alrededor de 1,5 min correspondiente a la 6CPGF, que se corresponde con el pico del material de referencia químico de 6CPGF. La transformación paulatina puede observarse en los cromatogramas al transcurrir el tiempo (3 y 24 h); mientras que a las 72 h no se observa la presencia de PGINa. En los cromatogramas no aparece otro pico adicional que no sean los correspondientes a estos compuestos, lo cual permanece invariable hasta las 96 h.

Todo ello nos permite realizar el análisis físico-químico conjunto de la PGINa sintetizada y de la 6CPGF obtenida, como vía de corroborar la identidad química de estos productos.

Los espectros IR de PGINa y 6CPGF concuerdan con lo reportado en la literatura.³

Es necesario señalar que al registrar un espectro de masa de la PGINa, se pudo observar que la muestra descompone intensamente y la cantidad de señales es numerosa, por lo que no se pudo determinar ninguna posible fragmentación. Por otro lado, dicho espectro no se encuentra reportado en la literatura ampliamente consultada.

Los espectros de RMN-¹H para la PGINa y la 6CPGF coinciden con lo reportado en la literatura para ambos compuestos. Es necesario señalar que los espectros COSY HH permitieron dar una mejor interpretación

de los resultados y asignar las señales correspondientes para la 6CPGF.

En los espectros de RMN-¹³C desacoplados a banda ancha coincide el número de señales con el número de átomos de carbono de las estructuras, no aparece en el registro la señal correspondiente al carbono carboxílico de alrededor de 174 p.p.m. por usarse una escala amplia con vistas a separar las señales más importantes.

Con vistas a la mejor asignación de los corrimientos químicos para la 6CPGF se utilizaron técnicas bidimensionales, no reportadas anteriormente en la literatura para este compuesto.

El estudio sobre la agregación plaquetaria de la PGINa obtenida en Cuba se encuentra publicado, cuyos resultados demuestran el comportamiento biológico de ésta de acuerdo con la estructura asignada.¹¹

Se concluye en este estudio, que mediante CLAR la hidrólisis de la sal sódica de la prostaciclina I₂ sólo produce 6-ceto prostaglandina F_{1α}, de acuerdo con nuestras condiciones de trabajo. Además, se demostró que la estructura de la sal sódica de la prostaciclina I₂ mediante diversas técnicas físico-químicas de elucidación estructural concuerda con lo esperado y lo reportado en la literatura, tanto por análisis de sus propias características espectroscópicas como la de su producto de hidrólisis, la 6-ceto prostaglandina F_{1α}.

SUMMARY

The physical and chemical analysis of prostacyclin sodium salt was made by infrared spectroscopy, proton-emission and carbon-13 nuclear magnetic resonance. To corroborate the structure of the studied molecule, the product of its hydrolysis, 6-ketoprostaglandin F_{1α}, was also studied by infrared spectroscopy, and proton-emission and carbon-13 nuclear magnetic resonance assisted by COSY techniques. The report of the elemental composition was made, too. A study of the hydrolytic transformation of prostacyclin sodium salt into 6-ketoprostaglandin was carried out by high resolution liquid chromatography, which confirmed that this is the only product obtained in such a process.

Subject headings: EPOPROSTENOL/chemistry.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reynolds JEF. The extra pharmacopeia martindale. 29 ed. London: The Pharmaceutical Press;1989:1371.
2. Johnson R. Synthesis of thromboxanes, prostacyclin and endoperoxides. Adv Prostaglandin Thromboxanes Leokot Res 1985;14:131-54.
3. Johnson R, Lincoln F, Nidy E, Schneider W, Thompson J, Axen U. Synthesis and characterization of prostacyclin, 6-ketoprostaglandin $F_{1\alpha}$, prostaglandin I_1 and prostaglandin I_3 . J Am Chem Soc 1978;100(21):7690-705.
4. Whittaker N. A synthesis of prostacyclin sodium salt. Tetrahedron Letter 1977;32:2805-8.
5. Chao M, Allen M. Chemical stability of prostacyclin in aqueous solution. Prostaglandins 1978;15(6):943-54.
6. Kresge A. Unusual reactivity of prostacyclin: rational drug design through physical organic chemistry. Acc Chem Res 1987;20:364-70.
7. De B, Andersen N, Ippolito R, Wilson C, Johnson D. Synthesis and chiroptical characterization of prostacyclin diastereoisomers. Prostaglandins 1980;19(2):221-47.
8. Rahway NJ. The Merck index. 11 ed. Rahway NJ:Merck;1989:120.
9. Schweer H, Seyberth H, Meese C, Furst O. Negative ion chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry. Biomed Environment Mass Spect 1988;15:143-51.
10. Beirbeck H, Kotovych G, Suguira M. The conformations of prostacyclin and related prostaglandins. Can J Chem 1985;63:1143-9.
11. González I, Almagro D, Díaz Y, González JA, Orta R, Padilla A. Efecto sobre la agregación plaquetaria de la prostaciclina obtenida en Cuba. Rev Iberoam Trom Hemost 1990;3(2|3):130-2.

Recibido: 17 de abril de 1999. Aprobado: 21 de mayo de 1999.

Lic. *José A. González Lavaut*. Centro de Química Farmacéutica. Calle 200 y Ave. 21, Atabey, Playa, Ciudad de La Habana 11600, Cuba.