



В.І. Гусаров, С.М. Коваленко, О.В. Заремба, Т.Д. Гусарова

Препаративна очистка синтетичних кумаринів, що містять залишок холевої кислоти

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: жовчні кислоти, кумарини, 1,3,4-оксадіазолі, ВЕРХ, препаративна хроматографія.

Ключевые слова: желчные кислоты, кумарины, 1,3,4-оксадиазолы, ВЭЖХ, препаративная хроматография.

Key words: bile acid, coumarins, 1,3,4-oxadiazoles, HPLC, preparative chromatography.

Розроблено методику препаративної очистки синтезованих 3-(2-холіл-1,3,4-оксадіазоліл)-кумаринів методом ВЕРХ з метою подальшого вивчення їх флуоресцентних властивостей. Структуру сполук підтверджено даними ¹H-ЯМР-спектроскопії, чистоту – хроматографічними методами.

Разработана методика препаративной очистки синтезированных 3-(2-холил-1,3,4-оксадиазолил)-кумаринов методом ВЭЖХ с целью дальнейшего изучения их флуоресцентных свойств. Структура соединений подтверждена данными ¹H-ЯМР-спектроскопии, чистота – хроматографическими методами.

The method of preparative purification of the obtained 3-(2-choyl-1,3,4-oxadiazolyl)-coumarin by HPLC for further study of their fluorescent properties was proposed. The structure of the compounds was confirmed by ¹H-NMR spectroscopy. Purity of compounds was confirmed by chromatography.

Інтенсивний розвиток методів аналізу, заснованих на використанні флуоресценції, зробив їх одними із найважливіших експериментальних методів у багатьох наукових дисциплінах. Застосування флуоресцентних міток у біотехнології та медицині призвело до появи і розвитку методів реєстрації біоспецифічних взаємодій, що застосовують у медичній діагностиці й різноманітних біологічних аналізах [1–3]. У якості флуоресцентних барвників найчастіше використовують поліциклічні ароматичні сполуки, похідні кумаринів, хінолінів, індолів, імідазолів, флуоресцеїну, родаміну тощо [4–6], що модифікують для надання потрібних властивостей (спорідненість до біологічних мембран або рідин, розчинність, ліпофільність).

Відомо, що природна холева кислота містить бідентатну та поліфункціональну структуру, має низьку токсичність і високу біологічну доступність [7,8]. Хемосенсиори на базі холевої кислоти є дуже привабливими системами для аналізу біологічних процесів [9,10], адже поєднують амфифільну (відповідає за селективність сольватування) і флуорофорну частину (відповідає за передачу аналітичного сигналу).

Раніше запропоновано синтетичні підходи до створення здатних до флуоресценції сполук на базі кумаринового ядра, що містили залишок холевої кислоти, приєднаний через 1,3,4-оксадіазольний місток [11].

Мета роботи

Розробка методів препаративної очистки отриманих синтетичних 3-(2-холіл-1,3,4-оксадіазоліл)-кумаринів для подальшого вивчення їх флуоресцентних властивостей.

Матеріали і методи дослідження

Препаративне виділення проводили на хроматографі Varian ProStar у комплектації: градієнтна система високого тиску ProStar 210; спектрофотометричний детектор ProStar 325; вузол ручного вводу з об'ємом дозуючої петлі 1 мл. Колонка – Диасорб-130-C16T (250×15 мм, 7 мкм). Спектри ¹H-ЯМР отримано на спектрометрі Varian WXR-400 (робоча частота 400 MHz) в ДМСО-d₆, внутрішній стандарт – ТМС.

Результати та їх обговорення

3-(2-Холіл-1,3,4-оксадіазоліл)-кумарини **1a-1g** (рис. 1), отримані в результаті синтезу у декілька стадій, містили домішки напівпродуктів реакцій (гідразид холевої кислоти, 2-імінокумарини, 2-холілгідразо-кумарин-3-карбоксаміди) і побічних продуктів реакцій.

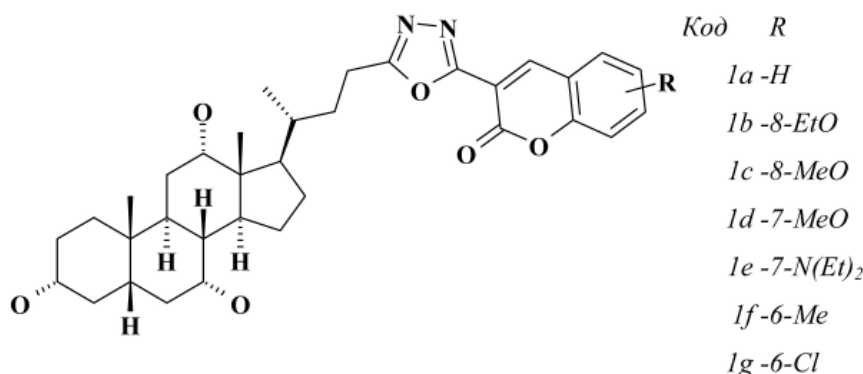


Рис. 1. 3-(2-Холіл-1,3,4-оксадіазоліл)-кумарини.

Для препаративної хроматографії готували розчини сполук для очистки з концентрацією приблизно 25–50 мг/мл. Зразки **1a–e** розчиняли у суміші ацетонітрил – метанол (1:1), **1f–g** у суміші ацетонітрил – метанол – тетрагідрофуран (1:1:0,2). У якості рухомої фази А використовували 45% ацетонітрил, рухомої фази В – 90% ацетонітрил. Швидкість подання рухомої фази складала 4,5 мл/хв.

Добір умов хроматографування проводили за довжини хвилі 235 нм (відповідає максимуму поглинання залишку холевої кислоти). Інжекція – еквівалент 2 мг суміші для розділення. За таких умов спостерігали чіткий аналітичний сигнал детектора (рис. 2, верхня хроматограма, на прикладі сполуки **1e**). Препаративне розділення проводили за довжини хвилі 270 нм (очікуваний мінімум поглинання, обраний для запобігання надмірної інтенсивності піків внаслідок збільшення концентрації аналіта у 15–25 разів). Інжекція – еквівалент 30–50 мг суміші для розділення. Аналітичний сигнал детектора внаслідок високої концентрації аналіта у розчині виходив за межі діапазону вимірювання детектора, що утруднювало ідентифікацію меж піків основної речовини і домішок (рис. 2, нижня хроматограма, на прикладі сполуки **1e**).

Співвідношення рухомих фаз А та В, обраних для препаративного виділення, склало для зразків **1a, 1c, 1d, 1f** – 30:70, для **1b, 1e, 1g** – 50:50. Час утримування фракцій цільових сполук: **1a** – 21,4–24,0 хв; **1b** – 13,6–15,7 хв;

1c – 16,3–18,1 хв; **1d** – 21,9–24,1 хв; **1e** – 12,6–15,4 хв; **1f** – 21,5–23,5 хв; **1g** – 22,4–26,0 хв.

Фракції збирали вручну. Однакові фракції після декількох інжекцій об'єднували і концентрували на роторному випарнику при 35–50°C та залишковому тиску близько 10^{-2} атм та перекристалізовували з ацетонітрилу. Зразки ідентифікували за допомогою методу ^1H -ЯМР-спектроскопії.

Оскільки цільова сполука виходила з колонки не останньою, для зменшення загального часу аналізу використано метод введення наступної проби до закінчення попередньої хроматограми з розрахунком, щоб потрібний аналіт виходив у вільній від домішок попередньої хроматограми області. Так, на прикладі очистки сполуки **1b** на рис. 3 наведено хроматограму одиночного вводу зразка. Час хроматографування складав близько 55 хвилин.

На рис. 4 наведено хроматограму у режимі «серійного» введення зразків сполуки **1b**. Час хроматографування 5 проб склав близько 160 хвилин (замість 275 хвилин), що дозволило економити близько 40% часу.

Результати ^1H -ЯМР для очищених 3-(2-холіл-1,3,4-оксадіазоліл)-кумаринів (або похідних 3-(5-((R)-3-((3R, 5S, 7R, 8R, 9S, 10S, 12S, 13R, 14S, 17R)-3, 7, 12-тригідрокси-10, 13-диметилгексадекагідро-1Н-циклопента[а]фенантрен-17-іл)бутил)-1, 3, 4-оксадіазол-2-іл)-2Н-хромен-2-ону) наведено нижче.

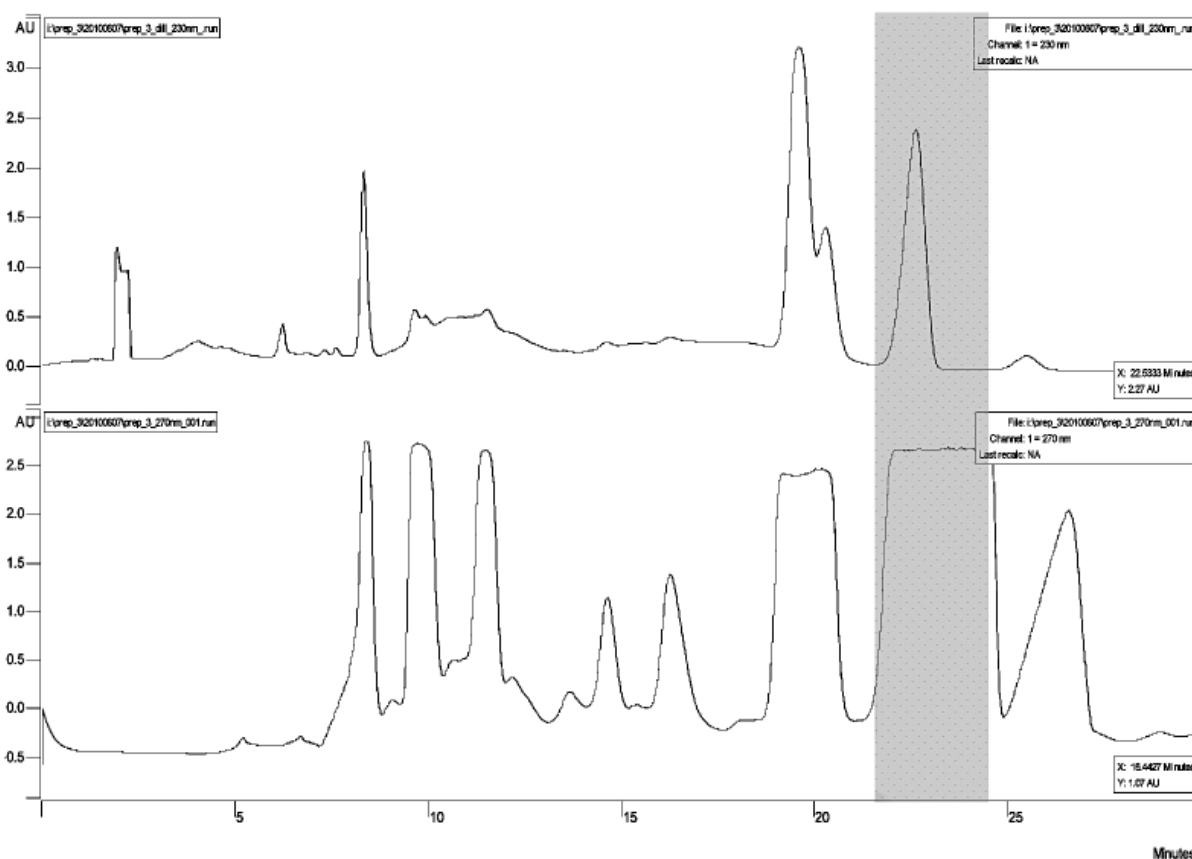
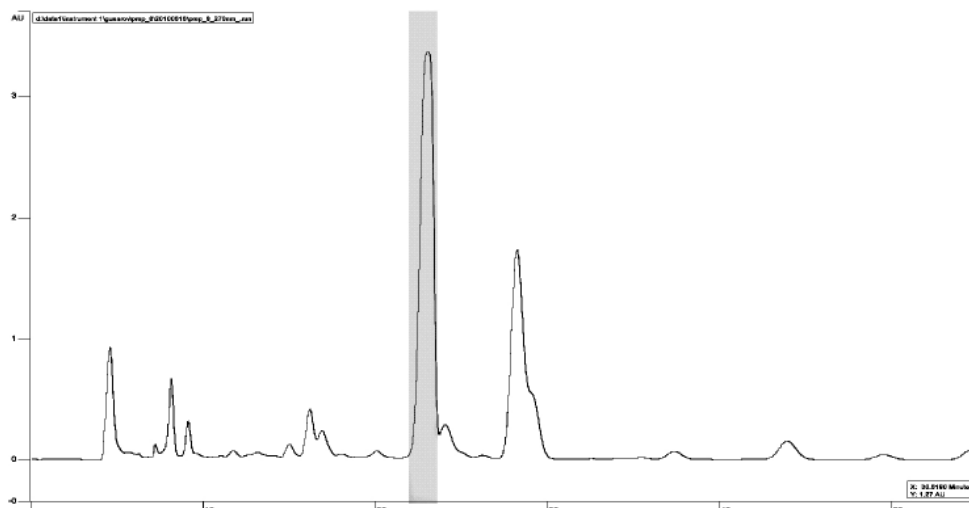
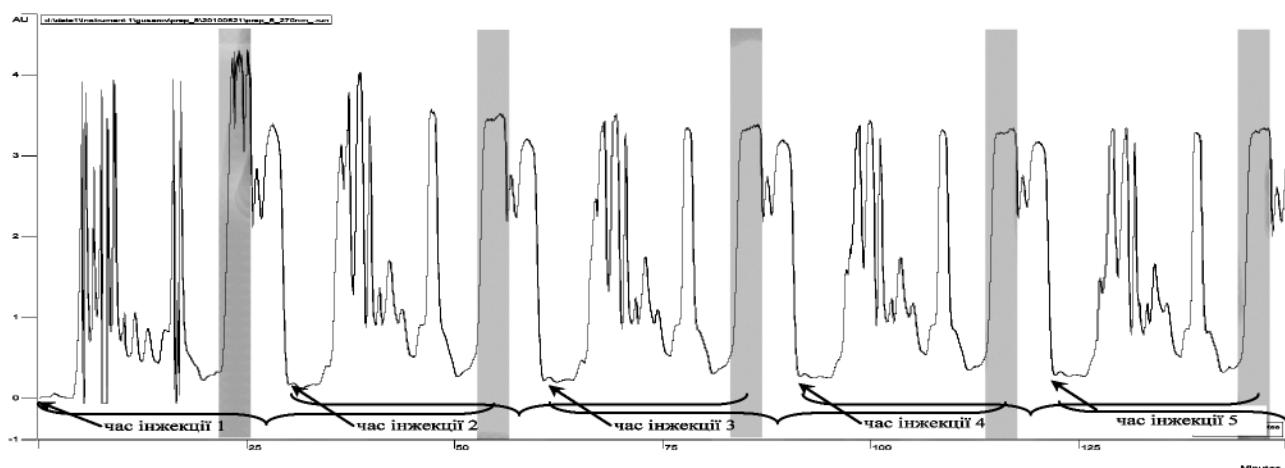


Рис. 2. Хроматограми сполуки **1e**. Кольором виділено цільову фракцію.

Рис. 3. Хроматограми сполуки **1b**. Кольором виділено цільову фракцію.Рис. 4. Хроматограми сполуки **1b**. «Серійне» введення.

Сполука **1a**. 3-{5-(3 α ,7 α ,12 α -тригідроксисхоліл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл}-кумарин. ^1H -ЯМР: 0.56 (s, 3H), 0.70-2.35 (m, стероїдні CH та CH₂), 2.90 (s, 2H), 3.79 (s, 2H), 3.88 (s, 1H), 3.99 (d, 1H), 4.12 (d, 1H), 4.29 (d, 1H), 7.45 (s, 2H), 7.73 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 8.86 (s, 1H).

Сполука **1b**. 3-{5-(3 α ,7 α ,12 α -тригідроксисхоліл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл}-8-OEt-кумарин. ^1H -ЯМР: 0.57 (s, 3H), 0.70-2.35 (m, стероїдні CH та CH₂), 2.91 (s, 2H), 3.58 (s, 1H), 3.79 (s, 1H), 3.99 (d, 1H), 4.05 – 4.25 (m, 3H), 7.41 (tt, 3H), 8.90 (s, 1H).

Сполука **1c**. 3-{5-(3 α ,7 α ,12 α -тригідроксисхоліл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл}-8-OMe-кумарин. ^1H -ЯМР: 0.58 (s, 3H), 0.70-2.35 (m, стероїдні CH та CH₂), 2.89 (s, 2H), 3.59 (s, 1H), 3.78 (s, 1H), 3.91 (s, 1H), 3.99 (d, 1H), 4.13 (d, 1H), 4.29 (d, 1H), 7.41 (tt, 3H), 8.80 (s, 1H).

Сполука **1d**. 3-{5-(3 α ,7 α ,12 α -тригідроксисхоліл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл}-7-OMe-кумарин. ^1H -ЯМР: 0.59 (s, 3H), 0.70-2.35 (m, стероїдні CH та CH₂), 2.88 (s, 2H), 3.17 (s, 1H), 3.60 (s, 1H), 3.78 (s, 1H), 3.99 (d, 1H), 4.14 (d, 1H), 4.29 (d, 1H), 6.95 – 7.15 (m, 2H), 7.86 (d, 1H), 8.76 (s, 1H).

Сполука **1e**. 3-{5-(3 α ,7 α ,12 α -тригідроксисхоліл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл}-7-(Et)₂N-кумарин. ^1H -ЯМР: 0.55 (s, 3H), 0.70-2.35 (m, стероїдні CH та CH₂), 2.81 (s, 2H), 3.13 (s, 1H), 3.60 (s, 1H), 3.79 (s, 1H), 3.99 (d, 1H), 4.14 (d, 1H), 4.29 (d, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.78 (d, 1H), 7.63 (d, 1H), 8.52 (s, 1H).

Сполука **1f**. 3-{5-(3 α ,7 α ,12 α -тригідроксисхоліл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл}-6-Me-кумарин. ^1H -ЯМР: 0.54 (s, 3H), 0.70-2.35 (m, стероїдні CH та CH₂), 2.89 (s, 2H), 3.59 (s, 1H), 3.80 (s, 1H), 3.99 (d, 1H), 4.14 (d, 1H), 4.29 (d, 1H), 7.38 (d, 1H), 7.55 (d, 1H), 7.71 (s, 1H), 8.73 (s, 1H).

Сполука **1g**. 3-{5-(3 α ,7 α ,12 α -тригідроксисхоліл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл}-6-Cl-кумарин. ^1H -ЯМР: 0.58 (s, 3H), 0.70-2.35 (m, стероїдні CH та CH₂), 2.88 (s, 2H), 3.60 (s, 2H), 3.78 (s, 2H), 3.99 (d, 1H), 4.13 (d, 1H), 4.30 (d, 1H), 7.50 (d, 1H), 7.75 (d, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.66 (s, 1H).

Висновки

Розроблено методи препаративної хроматографічної очистки синтезованих 3-(2-холіл-1,3,4-оксадіазоліл)-кумаринів. Структуру сполук підтверджено даними ^1H -ЯМР-спектроскопії, чистоту – хроматографічними методами.

Список літератури

1. *Lakowicz J.R.* Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol. 3: Biochemical Applications / Lakowicz J.R. – Springer, 1992. – 408 p.
2. *Tsien R.Y.* Fluorescence readouts of biochemistry in live cells and organisms // *Molecular Imaging: Principles and Practice*, ed. by R. Weissleder, S.S. Gambhir, B.D. Ross, A. Rehemtulla. – People's Medical Publishing House, 2010. – P. 808–828.
3. *Иванова С.В.* Использование флуоресцентных методов в медицине / С.В. Иванова, Л.Н. Кирпиченко // *Медицинские новости*. – 2008. – №12. – С. 56–61.
4. *Lavis L.D.* Tailoring Fluorescent Molecules for Biological Applications: A dissertation ... Doctor of Philosophy / University of Wisconsin-Madison, 2008. – P. 10–24.
5. *Wagner B.D.* The Use of Coumarins as Environmentally-Sensitive Fluorescent Probes of Heterogeneous Inclusion Systems / B.D. Wagner // *Molecules* 2009. – Vol. 14, Is. 31. – P. 210–237.
6. *Signore G.* A Novel Coumarin Fluorescent Sensor to Probe Polarity Around Biomolecules / G. Signore, R. Nifosi, L. Albertazzi, R. Bizzarri // *Journal of Biomedical Nanotechnology*. – 2009. – Vol. 5, №6. – P. 722–729.
7. *Mukhopadhyay S.* Chemistry and biology of bile acids / S. Mukhopadhyay, U. Maitra // *Current Science*. – 2004. – Vol. 87, №12. – P. 1666–1683.
8. *Monte M.J.* Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology / M. J. Monte, J. J. Marin, A. Antelo, J. Vazquez-Tato // *World Journal of Gastroenterology*. – 2009. – Vol. 15, №7. – P. 804–816.
9. WO 2002012267, IPC C07J 41/00. Method for the production of fluorescein bile acid derivatives / Mills Ch.O., Cox I.D., Hartley D.J., Burley I. – № PCT/GB2001/003559; Filing Date: Aug 8, 2001; Pub. Date: Feb 14, 2002.
10. *Holzinger F.* Fluorescent Bile Acid Derivatives: Relationship Between Chemical Structure and Hepatic and Intestinal Transport in the Rat / F. Holzinger, C.D. Scheingart, H.T. Ton-Nu et al. // *Hepatology*. – 1997 – Vol. 26, №5. – P. 1263–1271.
11. Заявка а 2012 01117 Україна, МПК C07C 35/52, C07C 49/563, C07D 271/10, C07D 311/74, C07D 413/02, C07J 9/00, C07J 75/00. 3-(5-((R)-3-((3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,7,12-Тригідрокси-10,13-диметилгексадекагідро-1H-циклопента[а]фенантрен-17-іл)бутил)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-2H-хромен-2-он та його похідні / С.М. Коваленко, П.В.Ніколаєнко, В.І. Гусаров, О.В. Заремба. – Заявл. 03.02.12 р.

Відомості про авторів:

Гусаров В.І., аспірант каф. управління якістю НФаУ, м. н. с. державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів НФаУ.

Коваленко С.М., д. хім. н., професор, зав. каф. управління якістю НФаУ, зав. державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів НФаУ.

Заремба О.В., н. с. державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів НФаУ.

Гусарова Т.Д., к. фарм. н., провідний фахівець з управління якістю науково-дослідного відділу забезпечення наукових досліджень науково-дослідної частини НФаУ.

Надійшла в редакцію 28.08.2012 р.