МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Гусаров Віктор Ігорович

УДК 54.057:547.29'054'93'78'814

СИНТЕЗ, ВЛАСТИВОСТІ ТА ШЛЯХИ ПРАКТИЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ ФУНКЦІОНАЛІЗОВАНИХ ПОХІДНИХ ХОЛЕВОЇ КИСЛОТИ

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

ХАРКІВ – 2013

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі управління якістю Національного фармацевтичного університету, Міністерство охорони здоров'я України.

Науковий керівник: доктор хімічних наук, професор
Коваленко Сергій Миколайович
Національний фармацевтичний університет, проректор з наукової роботи, завідувач кафедри управління якістю

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, професор
Демченко Анатолій Михайлович
Інститут фармакології та токсикології НАМН України, зав. відділом синтезу фізіологічно-активних сполук

доктор фармацевтичних наук,
старший науковий співробітник
Мартинов Артур Вікторович
Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова, вчений секретар

Захист відбудеться 26 червня 2013 року о 10 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4).

Автореферат розісланий 20 травня 2013 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
професор В. А. Георгіянц

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Інтенсивне вивчення похідних жовчних кислот пов'язане з різноманітною біологічною активністю, що досліджена для цих модифікованих природних сполук. Показано, що такі похідні виявляють антибіотичну, противірусну (в тому числі по відношенню до ВІЛ), цитостатичну, гіпоглікемічну дії тощо. Похідні, модифіковані ізотопними, контрастними, флуоресцентними маркерами використовують як діагностичні засоби. Перспективними для використання в нових технологіях є амфіфільні похідні жовчних кислот, здатні утворювати міцели та гелі. Їх використовують для штучних ліпосом, "молекулярних рецепторів" та супрамолекулярних структур, здатних до самоорганізації.

Найбільш поширеними похідними жовчних кислот є аміди, проте синтетичний потенціал таких сполук ще не вичерпано, тому такі похідні є цікавими об'єктами для подальшого вивчення. Деякі класи похідних жовчних кислот (наприклад, системи, що містять залишок холевої кислоти та 1,2,4- або 1,3,4-оксадіазольний фрагмент) не описані в літературі, проте можуть представляти інтерес для синтезу фізіологічно активних речовин або для вирішення ряду завдань клінічної діагностики. Розробка простого методу виділення холевої кислоти, синтез та дослідження похідних визначають тему даного дослідження як актуальну.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є складовою частиною досліджень у галузі синтезу нових БАР, що проводиться у Національному фармацевтичному університеті та виконана згідно плану науково-дослідних робіт НФаУ за проблеми МОЗ України «Спрямований синтез нових біологічно-активних сполук з заданими фармако-терапевтичними властивостями для створення життєво важливих лікарських засобів нового покоління» (№ держ. реєстрації 0109U005088).

Мета та задачі дослідження. Метою дослідження був синтез функціоналізованих похідних холевої кислоти та визначення шляхів їх практичного використання.

Для досягнення мети необхідно було вирішити такі задачі:

– провести порівняльний аналіз відомостей щодо виділення холевої кислоти (ХК) з жовчі, хімічної модифікації та методів аналізу похідних;

– виділити ХК в індивідуальному стані з жовчі великої рогатої худоби (ВРХ);

– оптимізувати існуючі та запропонувати нові методики синтезу естерів, алкіл-, арил-, гетериламідів ХК;

– розробити зручний синтетичний підхід до отримання похідних ХК, що містять 1,2,4-оксадіазольний фрагмент;

– розробити методику синтезу систем, що містять фрагменти тригідроксихолану, 1,3,4-оксадіазолу та кумарину;

– з використанням ^{1}Н ЯМР-, ІЧ-спектроскопії та мас-спектрометрії підтвердити будову виділених та синтезованих речовин, дослідити фізико-хімічні властивості;

– визначити можливість використання похідних ХК як маркерів для визначення ступеню всмоктування жирних кислот;

– виділити перспективну субстанцію для подальших досліджень та розробити

для неї проект методик контролю якості (МКЯ).

Об'єкт дослідження – синтез та дослідження функціоналізованих похідних холевої кислоти.

Предмет дослідження – методи синтезу, фізико-хімічні та біологічні властивості функціоналізованих похідних ХК – естерів, амідів, 1,2,4-оксадіазолів, 1,3,4-оксадіазолілкумаринів.

Методи дослідження – методи органічного синтезу, хімічні, фізичні та фізико-хімічні методи аналізу органічних сполук (температура плавлення, елементний аналіз, хроматографія в тонкому шарі сорбенту (ТШХ), препаративна колонкова хроматографія на силікагелі, флюоро-, УФ-, ІЧ-, ^{1}Н ЯМР-спектроскопія, мас- та хроматомас-спектрометрія, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), віртуальний скринінг сполук, методи дослідження біологічної активності сполук, статистичні методи обробки даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше синтезовано ряд амідів холевої кислоти з використанням методів, що не описані раніше, через стадію отримання диметилпіразоліду та імідазоліду холевої кислоти.

Вперше розроблено метод отримання похідних 17-(4-(1,2,4-оксадіазол-5-іл)бутан-2-іл)-10,13-диметилгексадекагідро-1*H*-циклопента[*a*]фенантрен-3,7,12-тріолу, який заснований на циклізації-конденсації змішаного ангідриду холевої та етоксимурашиної кислот з амідоксимами (Патент України на корисну модель № 64625 «Похідні (3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-17-((R)-4-(1,2,4-оксадіазол-5-іл)бутан-2-іл)-10,13-диметилгексадекагідро-1*H*-циклопента[*a*]фенантрен-3,7,12-тріолу»).

Вперше запропоновано методи синтезу похідних ХК, що містять кумариновий фрагмент, приєднаний через 1,3,4-оксадіазольний місток, які захищено патентом України на корисну модель (Патент України на корисну модель № 72609 «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-он та його похідні»).

У результаті проведених досліджень одержано та описано 65 нових сполук.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено методики синтезу та очищення (методом ВЕРХ) амідів ХК та похідних, які містять 1,2,4-оксадіазольний фрагмент та похідних із кумариновим фрагментом, приєднаним через 1,3,4-оксадіазольний місток. З використанням синтезованої глікохолевої кислоти створено високоефективну пероральну форму вітаміну K_1 для профілактики гемостатичних захворювань у новонароджених. Запропоновано сполуку 7-(діетиламіно)-3-(5-(1-метил-1-(3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгонан-17-іл)-проп-3-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-кумарин, потенційно придатну для дослідження всмоктування жирних кислот, вивчено її фармакокінетичні та біохімічні показники. Розроблено проект МКЯ на нову синтезовану сполуку.

Результати досліджень впроваджені в науково-дослідну роботу та навчальний процес кафедри фармації Кримського державного медичного університету ім. С.І. Георгієвського, кафедри органічної хімії Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського, кафедри якості, стандартизації та сертифікації

Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації НФаУ.

Особистий внесок здобувача. У наукових працях, опублікованих зі співавторами Коваленко С.М., Зарембою О.В., Євсєєвою Л.В., Гусаровою Т.Д., Ніколаєнко П.В., Губарь С.М., Губіним Ю.І. особисто автором виконано:

- пошук та аналіз даних літератури щодо методів отримання жовчних кислот, синтезу, хімічних властивостей і біологічної дії похідних жовчних кислот;
- синтез естерів, алкіл-, арил-, гетериламідів ХК, похідних, що містять 1,2,4-оксадіазольний фрагмент та систем, що містять фрагменти тригідроксихолану, 1,3,4-оксадіазолу та кумарину;
- проведення УФ-, ІЧ-спектральних, флюорометричних вимірювань;
- розробку методики препаративної очистки синтезованих похідних (амідів та похідних, що модифіковані 1,3,4-оксадіазольним та кумариновим фрагментом) методом ВЕРХ;
- визначення можливості використання похідних ХК як маркерів для визначення ступеня всмоктування жирних кислот (визначення концентрації сполуки-лідера у сироватці крові);
- проведення аналізу зв’язку «структура-біологічна активність» за допомогою програми PASS;
- узагальнення, обробку, аналіз та оформлення результатів синтетичних, фізико-хімічних та фармакокінетичних досліджень;
- розробку проекту методик контролю якості «7-(Діетиламіно)-3-(5-(1-метил-1-(3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгонан-17-іл)-проп-3-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-кумарин, субстанція»;

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня: Всеукраїнському конгресі «Сьогодення та майбутнє фармації», (Харків, 2008); Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання створення нових лікарських засобів», (Харків, 2008); Ювілейній науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фармакогнозія XXI століття. Досягнення та перспективи», (Харків, 2009); Ювілейній науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів «Актуальні проблеми гематології та трансфузійної медицини», (Львів, 2010); VII Національному з’їзді фармацевтів України «Фармація України. Погляд у майбутнє», (Харків, 2010); міжнародній електронній конференції Sciforum Electronic Conferences Series, (2011).

Публікації. За матеріалами роботи опубліковано 5 статей у фахових виданнях, 9 тез доповідей та отримано 2 патенти на корисну модель.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 165 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, огляду літератури, чотирьох розділів експериментальних досліджень, загальних висновків, списку використаних джерел літератури та додатків. Обсяг основного тексту складає 125 сторінок. Робота ілюстрована 78 рисунками та 21 таблицею. Список використаних джерел включає 314 найменувань, з них 58 кирилицею та 256 латиною.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ*

Розділ 1. Загальні відомості, методи виділення та аналізу, хімічні перетворення, застосування жовчних кислот і похідних (огляд літератури). Узагальнено дані щодо виділення ЖК з жовчі, їх хімічної модифікації та методів аналізу похідних ЖК (ТШХ, ВЕРХ, газорідинна хроматографія, одно- і двовимірна ^{1}Н ЯМР-, ^{13}С ЯМР-, ІЧ-Фур'є-, рентген-спектроскопія та ін.). Визначено, що цікавими об'єктами для подальшого вивчення є аміди.

Проведено аналіз літературних відомостей щодо використання ЖК та їх похідних у фармації (протипухлинна, антиретровірусна, антимікробна, протигрибкова та ін. види активності), медицині (системи доставки лікарських речовин, біомаркери) та інших галузях (в генній інженерії, в хіральній та електрокінетичній міцелярній хроматографії, як селективні комплексоутворювачі для органічних і неорганічних іонів тощо). Отримана інформація свідчить про доцільність використання ЖК як остову для синтезу речовин з широким спектром ймовірної біологічної активності. Визначено, що деякі класи похідних жовчних кислот (наприклад, системи, що містять залишок ХК та 1,3,4-оксадіазольний фрагмент) не описані в літературі, хоча можуть представляти інтерес для синтезу фізіологічно активних речовин.

Проаналізовано літературні дані щодо використання похідних жовчних кислот, модифікованих фрагментом, здатним до флуоресценції. Визначено доцільність проведення пошуку нових функціоналізованих похідних ХК з перспективою використання їх в якості флуоресцентних хемосенсорів для вирішення ряду завдань клінічної діагностики (флуоресцентні зонди, біомаркери).

Розділ 2. Одержання напівпродуктів. Холеву кислоту – основну субстанцію для виконання дисертаційного дослідження – виділяли з жовчі ВРХ, що є доступною сировиною для отримання вітчизняної субстанції з високим ступенем чистоти та рентабельності.

Об'єктом дослідження була жовч ВРХ свіжа і жовч суха. Для отримання ХК та дезоксихолевої кислоти були використані різні відомі методики виділення.

Холева кислота ***(2.1)***. Для підтвердження структури виділеної ХК були отримані ^{1}Н ЯМР- (рис. 1), ІЧ- та мас-спектри та визначено температуру плавлення.

^{1}Н ЯМР, δ, м.ч.: 0.56 (s, 3H, 18-CH3), 0.80 (s, 3H, 19-CH3), 0.92 (d, 3H, 21-CH3), 1.35 (m, 12H), 1.68 (m, 6H), 2.12 (m, 4H), 3.12 (s, 1H, 3-CH), 3.57 (s, 1H, 7-CH), 3.72 (s, 1H, 12-CH), 4.09 (d, 1H, 3-OH), 4.12 (d, 1H, 7-OH), 4.32 (d, 1H, 12-OH), 11.85 (s br, 1H, 24-COOH). M/z: 355,4 ; 373,5; 391,2; 426,4; 478,4; 799,5; 817,6; 834,7. ІЧ, см$^{-1}$: 1078 (ν(C–O) гідроксигруп), 1376 ($\delta_s(CH_3)$), 1466 ($\delta_{as}(CH_3)$), 1715 (ν(C=O) карбоксильної групи), 2872 ($\nu_s(CH_3)$), 2938 ($\nu_{as}(CH_3)$), 3524 (ν(OH) карбоксильної групи), 3409 (ν(OH)), Тпл 198-199,5°С.

Додатково для підтвердження структури виділеної сполуки ***2.1***. було отримано двовимірні ЯМР спектри (NOESY), на яких відзначено характерну взаємодію H_3-19/H-5β та відсутність взаємодії H_3-18/H-14α, що вказує на *цис*-приєднання кілець

* Нумерація розділів та сполук за текстом автореферату відповідає нумерації у дисертації.

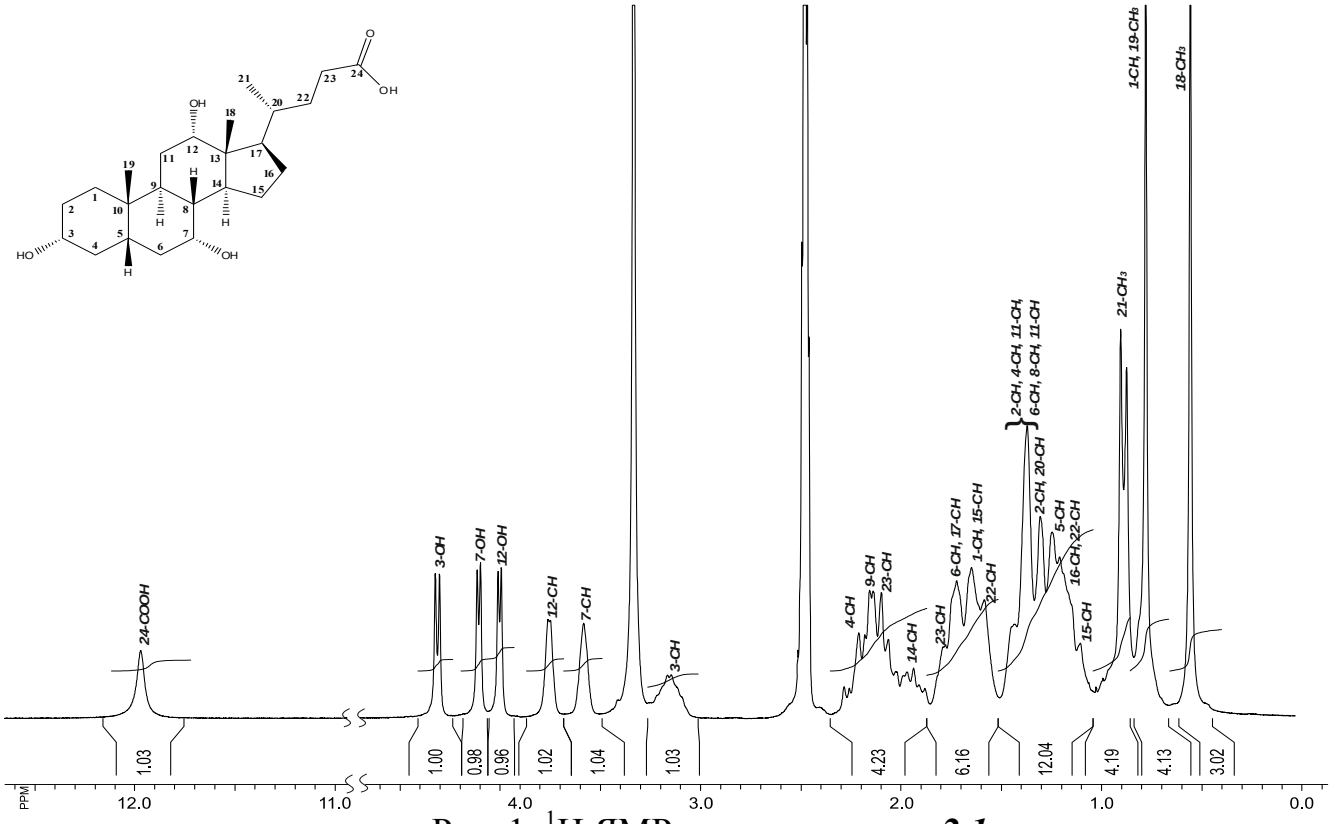


Рис. 1. ^{1}H ЯМР-спектр сполуки ***2.1.***

A/B та *транс*-приєднання кілець C/D. Взаємодія H_3-18/H-8β та H_3-19/H-8β пов'язана з *транс*-приєднанням B/C. Спостерігаються взаємодії H_3-18/H-12β, H_3-21/H-12β, OH-7/H-7α, H-21/H-22α та H_3-21/H-23α.

Таким чином, ***2.1***. ідентифіковано як холеву кислоту.

Дезоксихолева кислота (***2.2***). Для встановлення структури сполуки ***2.2*** було записано ^{1}H ЯМР- та ІЧ-спектри та визначено температуру плавлення.

^{1}H ЯМР, δ, м.ч.: 0.54 (s, 3H, 18-C$\underline{H}_3$), 0.88 (s, 3H, 19-C$\underline{H}_3$), 0.94 (d, 3H, 21-C$\underline{H}_3$), 1.28 (m, 12H), 1.67 (m, 6H), 2.15 (m, 4H), 3.75 (s, 1H, C-12), 4.19 (d, 1H, OH-3), 4.45 (d, 1H, OH-12), 12.03 (s, 1H, COOH-24). ІЧ, см$^{-1}$: 3341 (ν(OH) карбоксильної групи), 2930 ($\nu_{as}(CH_3)$), 2866 ($\nu_s(CH_3)$), 1695 (ν(C=O) карбоксильної групи), 1452 ($\delta_{as}(CH_3)$), 1375 ($\delta_s(CH_3)$), 1041 (ν(C–O) спиртових гідроксигруп), Тпл 177°C.

Таким чином, сполуку ***2.2*** ідентифіковано як дезоксихолеву кислоту *(3α,5β,12α)-3,12-дигідроксихолан-24-ову кислоту*).

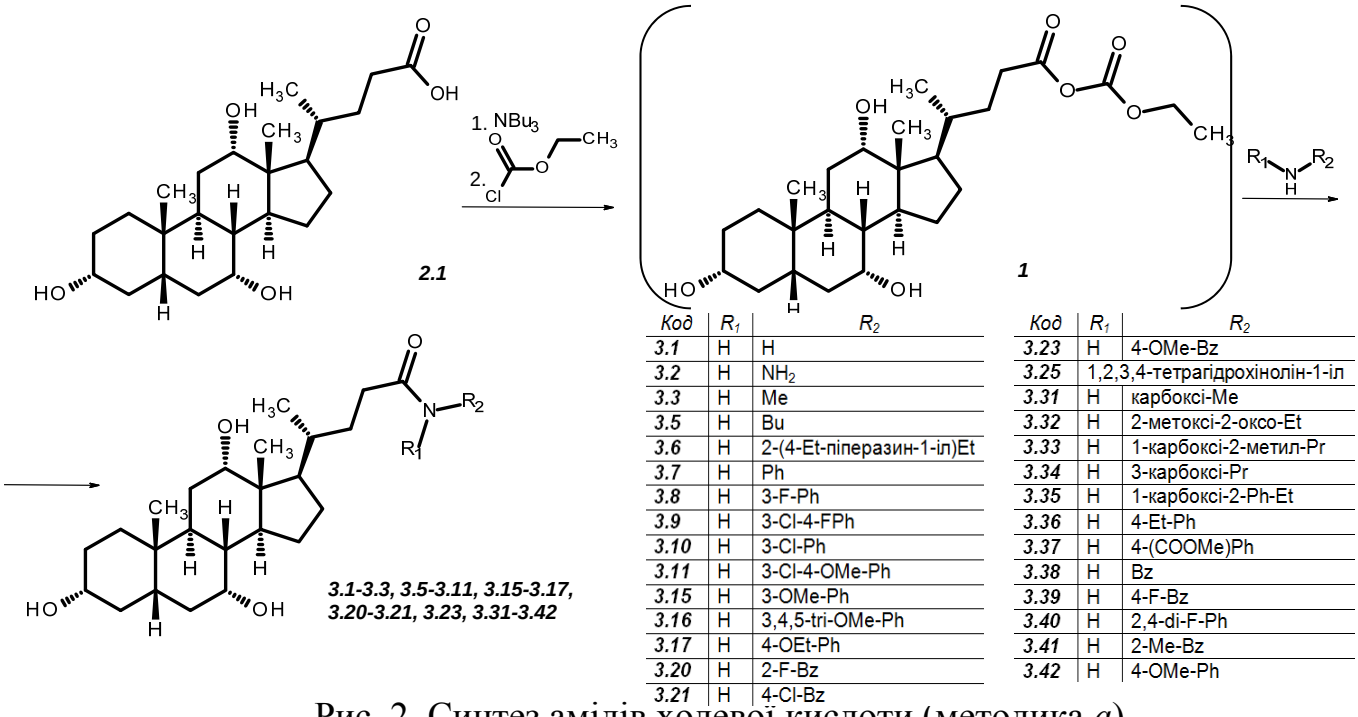
Після кристалізації ХК та дезоксихолевої кислоти залишалися маточні розчини, які після упарювання розчинника було розділено на складові за допомогою колонкової хроматографії (колонка 2,5x100 см, сорбент силікагель, елюент етилацетат), що дало змогу отримати додаткові кількості ХК та дезоксихолевої кислоти. Додатково були виділені жовчні кислоти, що містились у менших кількостях.

Таким чином, було запропоновано методики виділення холевої кислоти, що мають високі виходи та можуть бути масштабовані для промислового напрацювання субстанції на вітчизняних підприємствах.

Розділ 3. Синтез похідних холевої кислоти. Функіоналізацію карбоксильної групи холевої кислоти проводили з отриманням естерів, алкіл-, арил-, гетериламідів декількома методами. Деякі з сполук, отриманих на етапі синтезу амідів,

використані як напівпродукти для утворення похідних ХК, що містили 1,2,4-оксадіазольний фрагмент та поліядерних систем на базі кумаринового ядра, що містили тригідроксихолан, приєднаний через 1,3,4-оксадіазольний місток.

Аміди холевої кислоти. За першою схемою шляхом взаємодії ХК (***2.1***) з етилхлорформіатом у присутності еквімолярної кількості трибутиламіну утворювали змішаний ангідрид ***1***. Продукт не виділяли з реакційного середовища, а вводили в подальшу взаємодію з різними амінами. Таким чином синтезовані аміди ***3.1-3.3, 3.5-3.11, 3.15-3.17, 3.20-3.21, 3.23, 3.31-3.42)*** (рис. 2)**.** Вихід продуктів реакції становив 59-94%.



Код	R_1	R_2
3.1	H	H
3.2	H	NH_2
3.3	H	Me
3.5	H	Bu
3.6	H	2-(4-Et-піперазин-1-іл)Et
3.7	H	Ph
3.8	H	3-F-Ph
3.9	H	3-Cl-4-FPh
3.10	H	3-Cl-Ph
3.11	H	3-Cl-4-OMe-Ph
3.15	H	3-OMe-Ph
3.16	H	3,4,5-tri-OMe-Ph
3.17	H	4-OEt-Ph
3.20	H	2-F-Bz
3.21	H	4-Cl-Bz

Код	R_1	R_2
3.23	H	4-OMe-Bz
3.25	1,2,3,4-тетрагідрохінолін-1-іл	
3.31	H	карбоксі-Me
3.32	H	2-метоксі-2-оксо-Et
3.33	H	1-карбоксі-2-метил-Pr
3.34	H	3-карбоксі-Pr
3.35	H	1-карбоксі-2-Ph-Et
3.36	H	4-Et-Ph
3.37	H	4-(COOMe)Ph
3.38	H	Bz
3.39	H	4-F-Bz
3.40	H	2,4-di-F-Ph
3.41	H	2-Me-Bz
3.42	H	4-OMe-Ph

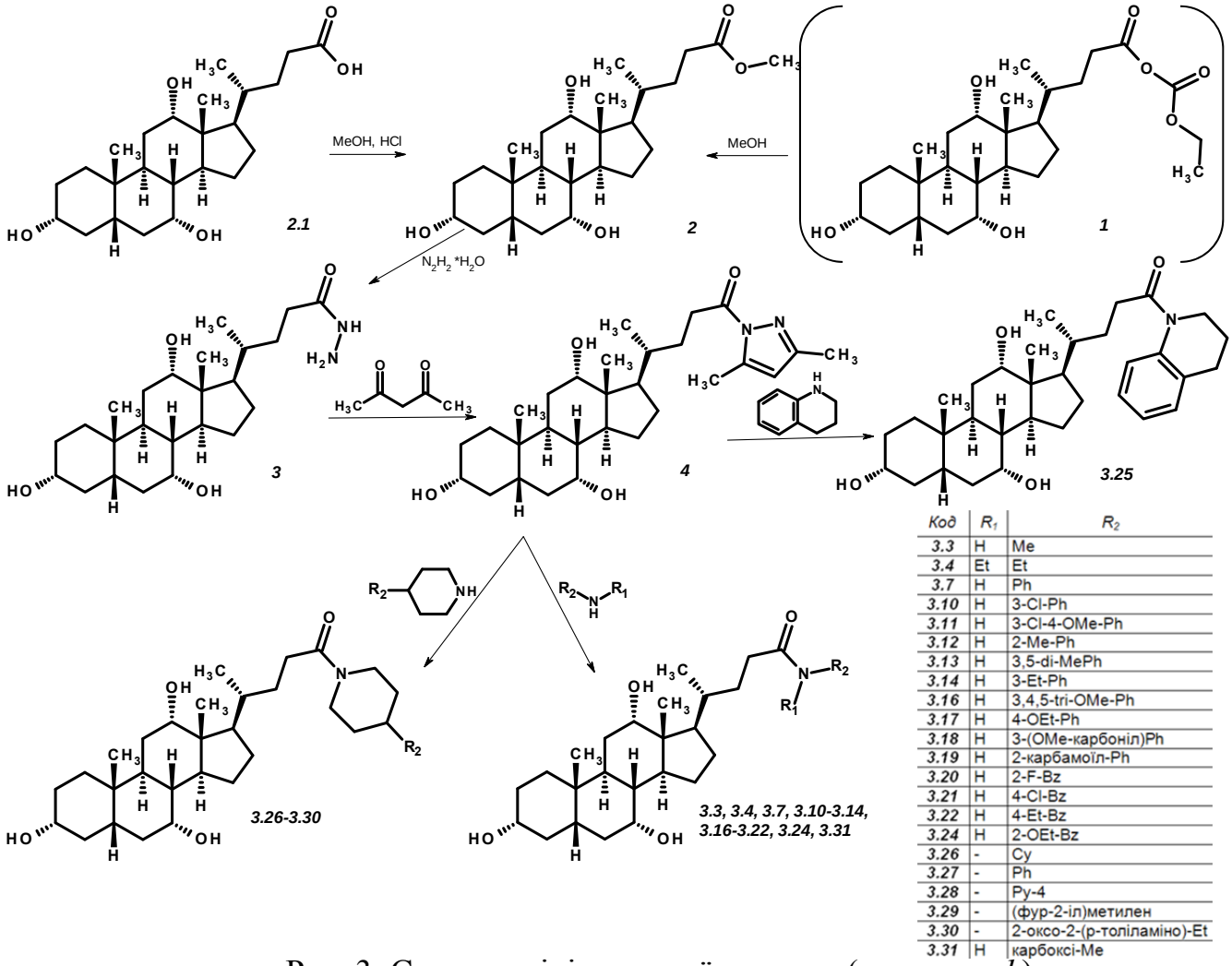
Рис. 2. Синтез амідів холевої кислоти (методика *а*).

Аміди ***3.3, 3.4, 3.7, 3.10-3.14, 3.16-3.22, 3.24, 3.26-3.31*** синтезували за другою схемою – через стадію утворення диметилпіразоліду (***4***) (рис. 3).

Для цього спочатку отримували метиловий естер холевої кислоти ***2***. Естерифікацію проводили або за безпосередньою реакцією холевої кислоти ***2.1*** з насиченим хлороводнем метанолом, або через стадію утворення змішаного ангідриду холевої та етиксимурашиної кислот ***1.*** Естер, що утворився, кип'ятили з гідразину гідратом, одержували гідразид ***3,*** який обробляли 2,4-пентандіоном, що призводило до утворення диметилпіразоліду ***4.*** Утворений диметилпіразолід або виділяли, або безпосередньо вводили у реакцію з амінами з утворенням відповідних амідів. Вихід становив 79-96% та перевищував виходи аналогічних амідів за методикою *а*.

Синтезовані сполуки – це білі або білі з жовтуватим відтінком кристалічні речовини з чіткими температурами плавлення, мало розчинні у воді, розчинні у спиртах та більшості органічних розчинників. Результати елементного аналізу добре корелюють з розрахунковими значеннями. У спектрах ^{1}H ЯМР спостерігаються характерні сигнали протонів груп CH_3 (С-18, С-19 та С-21) при δ 0.51-0.62 м.ч., 0.76-0.80 м.ч. та 0.90-0.99 м.ч. відповідно, сигнали протонів гідроксильних груп при δ 4.08-4.12 м.ч., 4.00-4.01 м.ч. та 4.30-4.34 м.ч. Сигнали протонів стеранового

фрагменту спостерігаються у вигляді мультиплетів при δ 1.05-1.60 м.ч. та 1.60-2.55 м.ч. Сигнал протону -NH амідного фрагменту – при δ 7.20-10.09 м.ч.



Код	R_1	R_2
3.3	H	Me
3.4	Et	Et
3.7	H	Ph
3.10	H	3-Cl-Ph
3.11	H	3-Cl-4-OMe-Ph
3.12	H	2-Me-Ph
3.13	H	3,5-di-MePh
3.14	H	3-Et-Ph
3.16	H	3,4,5-tri-OMe-Ph
3.17	H	4-OEt-Ph
3.18	H	3-(OMe-карбоніл)Ph
3.19	H	2-карбамоїл-Ph
3.20	H	2-F-Bz
3.21	H	4-Cl-Bz
3.22	H	4-Et-Bz
3.24	H	2-OEt-Bz
3.26	-	Cy
3.27	-	Ph
3.28	-	Py-4
3.29	-	(фур-2-іл)метилен
3.30	-	2-оксо-2-(р-толіламіно)-Et
3.31	H	карбоксі-Me

Рис. 3. Синтез амідів холевої кислоти (методика *b*).

Мас-спектри отриманих сполук характеризуються наявністю молекулярного іону $[M+H]^+$. Для більшості сполук зафіксовано також іони $[M-H_2O+H]^+$, $[M-2H_2O+H]^+$, $[M-3H_2O+H]^+$ (рис. 4, на прикладі сполуки ***3.10***), що утворюються внаслідок легкої елімінації гідроксильних груп холевої кислоти під час аналізу.

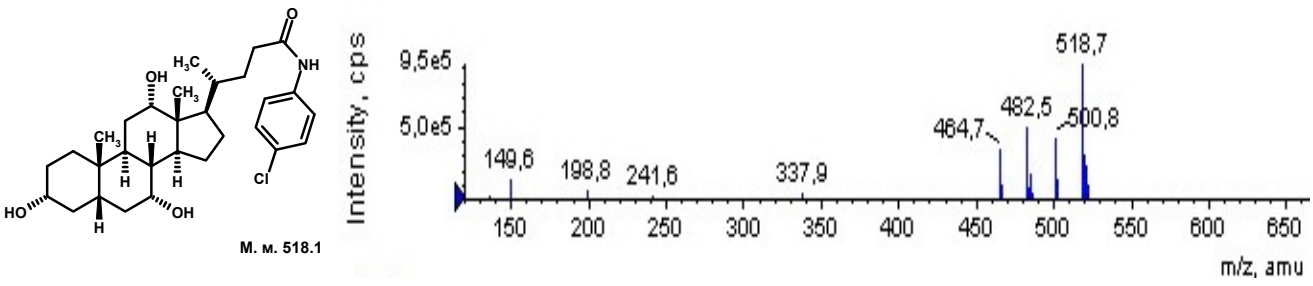


Рис. 4. Мас-спектр сполуки ***3.10***.

Серед синтезованих амідів з точки зору медичного і фармацевтичного використання цікавою виявляється глікохолева кислота (ГКХ, ***3.31***), яка використовується як емульгатор в фармацевтичних препаратах, наприклад, вітаміну K_1 (фітоменадіону). Вітамін K_1 бере участь в утворенні протромбіну і сприяє

нормальному згортанню крові. У західноєвропейських країнах, США і Канаді на даний час діє метод попередження класичної і пізньої форм кровоточивості новонароджених, який полягає в призначенні після народження одноразово (або повторно) дози вітаміну $К_1$ внутрішньом'язово або перорально.

Запропонована нами методика синтезу ГКХ відрізняється простотою та економічністю та може бути запропонована для напрацювання сполуки у промислових масштабах. З використанням синтезованої нами ГКХ на базі Державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів НФаУ отримано наногетерогенну систему – міцелярний водний розчин вітаміну $К_1$; розроблено склад лікарської форми вітаміну $К_1$; розроблено технологію отримання лікарської форми; вивчено міцелярні форми вітаміну $К_1$ з різним складом і кількістю ліпіду, з різним співвідношенням вітаміну $К_1$ та солюбілізаторів (фосфоліпідів та солей глікохолевої кислоти) та вивчено стабільність лікарської форми фітоменадіону впродовж одного року. Для препарату проведено вивчення токсичності та доклінічне вивчення фармакологічної активності. Розроблена технологія забезпечує отримання ліпосомальної форми вітаміну $К_1$. Технологічний процес забезпечує мінімальне руйнування лабільної субстанції. Розроблені методи аналізу забезпечують контроль якості активної субстанції та лікарської форми вітаміну $К_1$ в процесі виготовлення та в процесі зберігання.

Для синтезу ***3.31*** крім етилхлорформіату були використані й інші активатори карбоксильної групи. Цікаву особливість було відмічено при використанні як активатора карбоксильної групи карбодиімідазолу (КДІ) – крім карбоксильної групи КДІ реагував з однією з гідроксильних груп ХК з утворенням карбоімідазолілглікохолевої кислоти ***3.43.*** Лужний гідроліз сполуки ***3.43*** з високим виходом приводив до ГХК ***3.31*** (рис. 5).

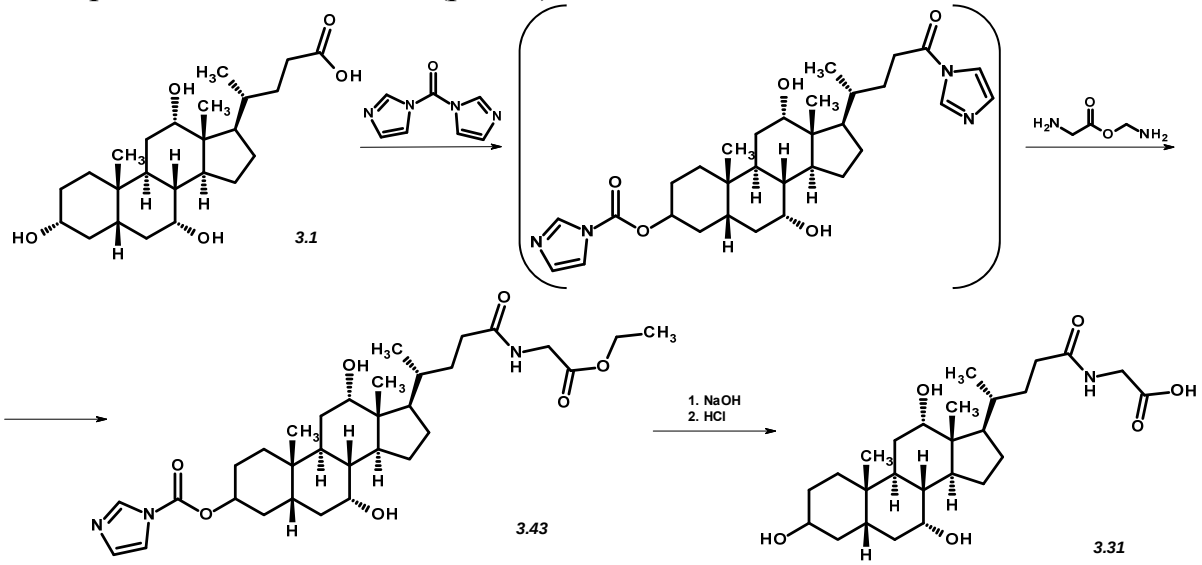


Рис. 5. Синтез аміду ***3.31*** з використанням КДІ.

Структура виділеного імідазоліду ***3.43*** підтверджена даними ^{1}Н ЯМР-спектроскопії та мас-спектрометрії.

Деякі синтезовані нами аміди холевої кислоти, отримані переважно на стадії підбору умов синтезу, були забруднені вихідними продуктами. Для сполук,

очистити які перекристалізацією не вдалося, був використаний препаративний варіант ВЕРХ. Попередньо на аналітичному хроматографі було визначено, що синтезовані аміди містять домішки ХК та вихідного аміну (рис. 6а, колонка Microsorb 100-5 C18, 250x4,6 мм, 5 мкм; рухома фаза – 80% ацетонітрил; швидкість рухомої фази 1 мл/хв.). Отримані дані було використано для підбору умов препаративного хроматографування та виділення амідів ХК з високим ступенем чистоти (рис. 6б, колонка Диасорб-130-C16T, 250x15 мм, 7 мкм; рухома фаза – 80% ацетонітрил; швидкість рухомої фази 4 мл/хв.).

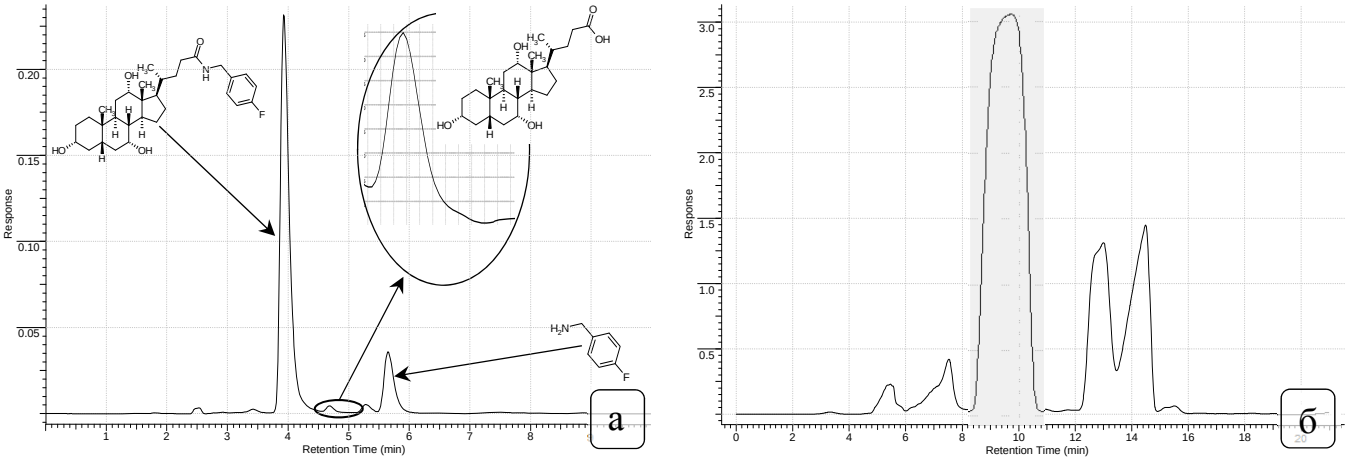


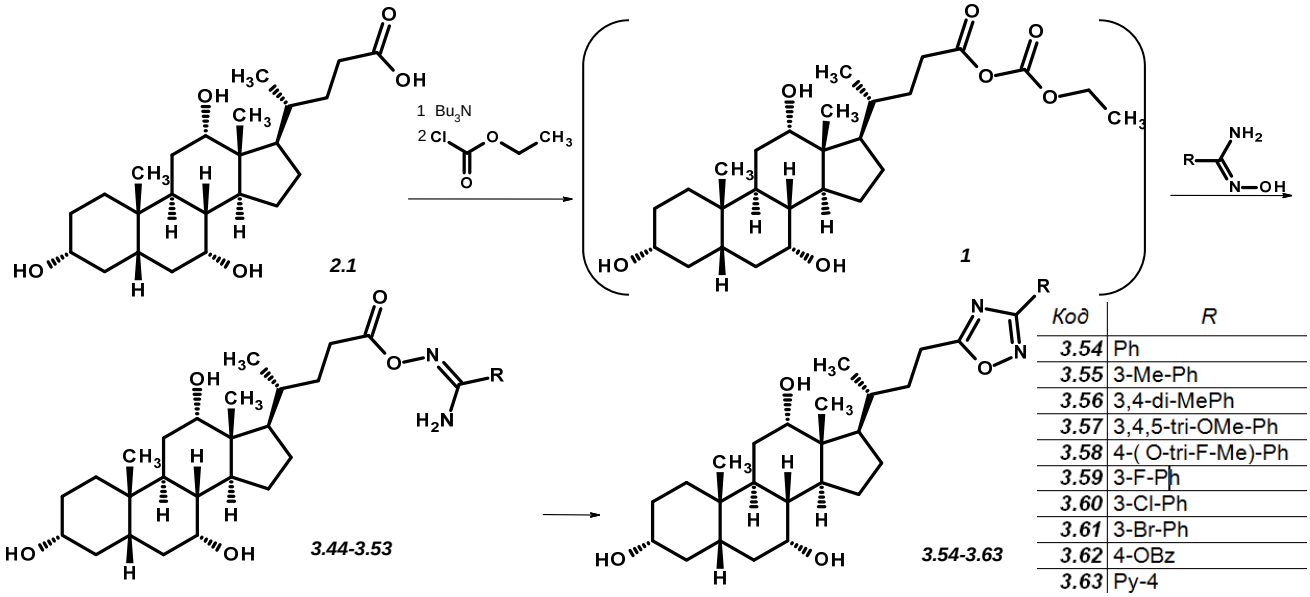
Рис. 6. Хроматограми сполуки ***3.39***.

Синтез 1,2,4-оксадіазолів, що містять 3,7,12-тригідроксихолановий фрагмент. Серед сполук, що містять 1,2,4-оксадіазольний фрагмент відомо чимало таких, що виявляють біологічну активність, тому цікавим напрямком для хімічної модифікації ЖК та пошуку на їх основі високоефективних та малотоксичних лікарських засобів є синтез 1,2,4-оксадіазолів, що містять 3,7,12-тригідроксихолановий фрагмент, або 17-(4-(1,2,4-оксадіазол-5-іл)бутан-2-іл)-10,13-диметилгексадекагідро-1*H*-циклопента[a]фенантрен-3,7,12-тріолів.

Змішаний ангідрид холевої та етоксимурашиної кислот **2** синтезували *in situ* в диметилформаміді в присутності еквімолярної кількості трибутиламіну, далі обробляли відповідним заміщеним амідоксимом і витримували реакційне середовище при (50-60)°С протягом 5 годин. Циклізацію у відповідний ізоксадіазол ***3.54-3.63*** проводили при нагріванні при 60°С протягом 1 години при додаванні 1,8-діазабіцикло[5.4.0]ундец-7-ену (рис. 7). Після закінчення реакції розчин розбавляли водою. Отримані речовини очищали перекристалізацією або колонковою хроматографією. Вихід становив 68-93% від теоретичного.

Вивчено фізико-хімічні характеристики, а також спектральні дані сполук ***3.54-3.63.*** Синтезовані сполуки є білими або білими з жовтуватим відтінком кристалічними речовинами з чіткими температурами плавлення, нерозчинні у воді, розчинні у спиртах та більшості органічних розчинників. У спектрах ^{1}H ЯМР (рис. 8, на прикладі сполуки ***3.55***) спостерігаються характерні сигнали протонів метильних груп залишку холевої кислоти (С-18, С-19 та С-21) при δ 0.51-0.62 м.ч., 0.76-0.80 м.ч. та 0.90-0.99 м.ч. відповідно, сигнали груп ОН-3, ОН-7 та ОН-12 – при δ 4.08-4.12 м.ч., 4.00-4.01 м.ч. та 4.30-4.34 м.ч. відповідно. Сигнали аліфатичних

протонів стеранового фрагменту спостерігаються у вигляді мультиплетів при δ 1.05-2.55 м.ч. Відсутність сигналів амідних протонів амідоксиму свідчить про замикання циклу. Спостерігаються очікувані сигнали замісників, для сполуки ***3.55*** – два дублети ароматичної системи (7.88 м.ч.,7.40 м.ч.) та метильної групи (2.36 м.ч.).



Код	R
3.54	Ph
3.55	3-Me-Ph
3.56	3,4-di-MePh
3.57	3,4,5-tri-OMe-Ph
3.58	4-(O-tri-F-Me)-Ph
3.59	3-F-Ph
3.60	3-Cl-Ph
3.61	3-Br-Ph
3.62	4-OBz
3.63	Py-4

Рис. 7. Синтез оксадіазолів ***3.54-3.63***.

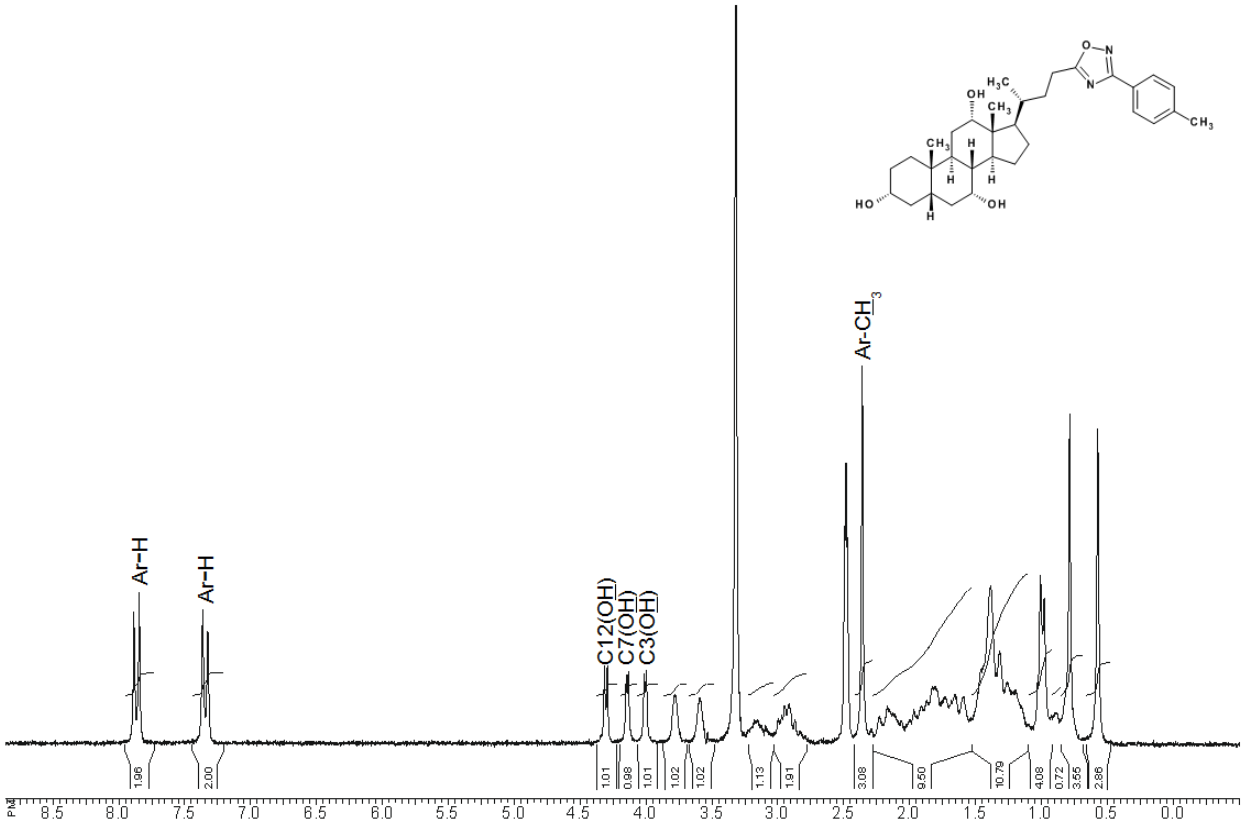


Рис. 8. ^{1}H ЯМР-спектр сполуки ***3.55***.

Мас-спектри отриманих сполук характеризуються наявністю молекулярного іону $[M+H]^+$. Також спостерігаються іони $[M-H_2O+H]^+$, $[M-2H_2O+H]^+$, $[M-3H_2O+H]^+$ (рис. 9, на прикладі сполуки ***3.55***) – результат дегідроксилювання під час аналізу.

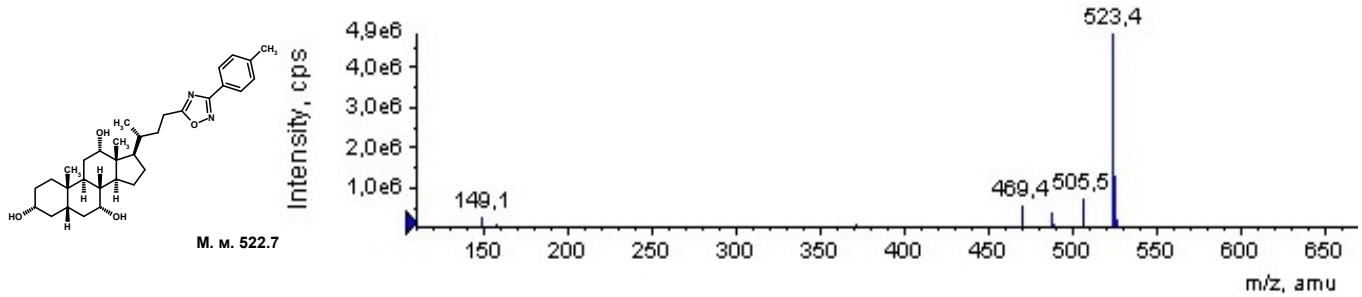


Рис. 9. Мас-спектр сполуки ***3.55***.

Крім описаних вище 1,2,4-оксадіазолів, було отримано ряд ізомерних сполук, в яких 3,7,12-тригідроксихолановий фрагмент приєднано у 3 положенні оксадіазольного циклу. Синтез здійснювали в декілька стадій. На першій стадії проводили захист гідроксильних груп холевої кислоти шляхом кип'ятіння у мурашиній кислоті з каталітичною кількістю перхлоратної кислоти. Отримували триформілхолеву кислоту ***5***, з якої за описаною раніше методикою шляхом взаємодії з етилхлорформіатом з подальшою обробкою амоніаком отримували амід триформілхолевої кислоти ***6***. Далі амід обробляли сумішшю трифтороцтового ангідриду та піридину (1:1), утворений нітрил *7* обробляли гідроксиламіном з утворенням N'-гідроксіімідаміду ***8***, з якого за реакцією з відповідними хлорангідридами чи імідазолідами карбонових кислот шляхом закриття циклу та з подальшим видаленням захисних груп під дією метилату натрію в метанолі отримували ізомерні 1,2,4-оксадіазоли ***3.85-3.90***. Отримані речовини очищали колонковою хроматографією. Загальна схема отримання наведена на рис. 10. Вихід становив 10-20% від теоретичного у перерахунку на холеву кислоту.

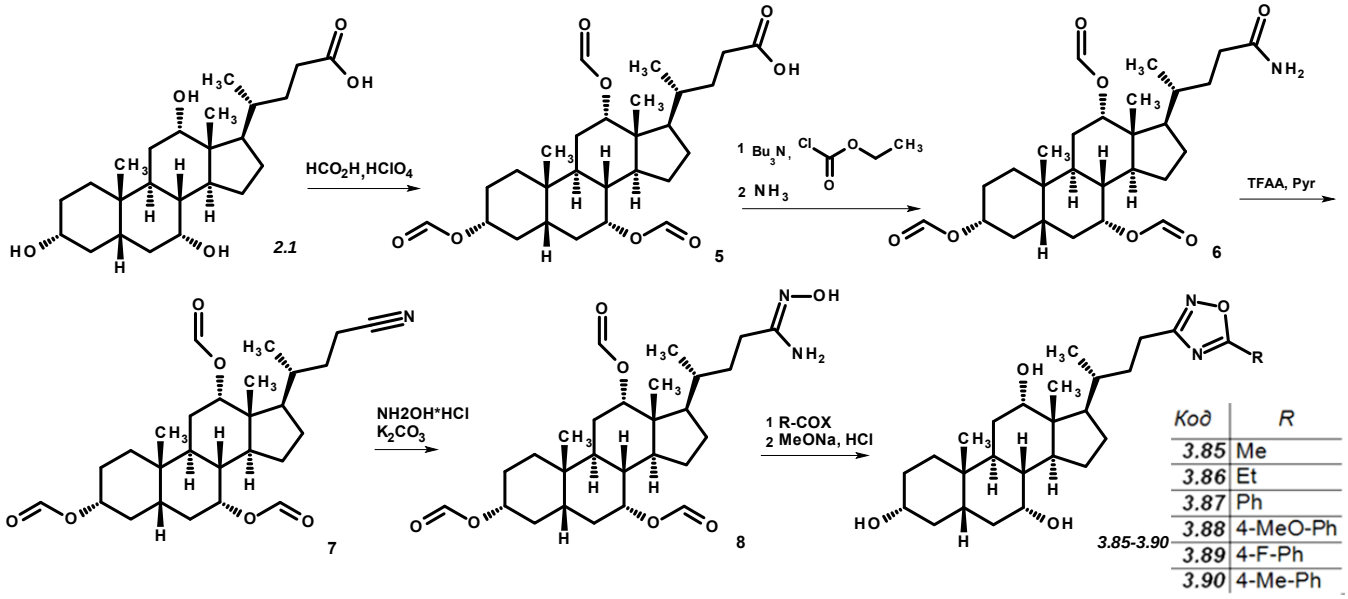


Рис. 10. Синтез оксадіазолів ***3.85-3.90***.

Синтезовані сполуки є білими або білими з жовтуватим відтінком кристалічними речовинами, нерозчинні у воді, розчинні у спиртах та більшості органічних розчинників. Спектри ^{1}H ЯМР містять сигнали протонів залишку холевої кислоти (18-CH_3, 19-CH_3, 21-CH_3 при δ 0.51-0.62 м.ч., 0.76-0.80 м.ч. та 0.90-0.99 м.ч. відповідно, OH-3, OH-7 та OH-12 – при δ 4.08-4.12 м.ч., 4.00-4.01 м.ч. та 4.30-4.34

м.ч. відповідно, протони стеранового фрагменту у вигляді мультиплетів при δ 1.05-2.55 м.ч.) Відсутність сигналів амідних протонів та наявність протонів фрагментів від похідних карбонових кислот свідчить про замикання циклу.

Синтез та вивчення 1,3,4-оксадіазолілкумаринів, що містять 3,7,12-тригідроксихолановий фрагмент. Нами було запропоновано синтетичні підходи до створення сполук з кумариновим остовом, що містять залишок ХК, приєднаний через 1,3,4-оксадіазольний місток. Було зроблено припущення, що три аксіальні гідроксильні групи у атомів вуглецю С3, С7 і С12 в ХК мають бути незаміщеними у зв'язку з тим, що саме вони беруть участь при сольватації різних молекул або фрагментів молекул. Карбоксильна група, в свою чергу, може бути модифікована флуоресцентним фрагментом. Як індикаторний фрагмент сенсора був вибраний залишок 2-оксо-3-(1,3,4-оксадіазоліл)-кумарину.

Для введення в молекулу ХК кумаринового фрагмента нами був вибраний «рециклізаційний» метод, що розроблено на кафедрі ограничної хімії Національного фармацевтичного університету. Синтез проводили в декілька стадій з використанням гідразиду холевої кислоти ***3*** та 2-іміно-2*H*-хромен-3-карбоксамідів ***3.64-3.70***.

На першій стадії за описаною раніше методикою отримували метиловий естер холевої кислоти. З виділеного естеру з кількісним виходом шляхом нагрівання в 1,4-діоксані з гідразину гідратом був отриманий гідразид холевої кислоти. На наступній стадії проводили синтез 3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгексадекагідро-1*H*-циклопента[а]фенантрен-17-іл)пентаноїл)гідразоно)-2*H*-хромен-3-карбоксамідів ***3.71-3.77*** за реакцією гідразиду холевої кислоти з відповідним 2-іміно-2*H*-хромен-3-карбоксамідами ***3.64-3.70*** (рис. 11)**.**

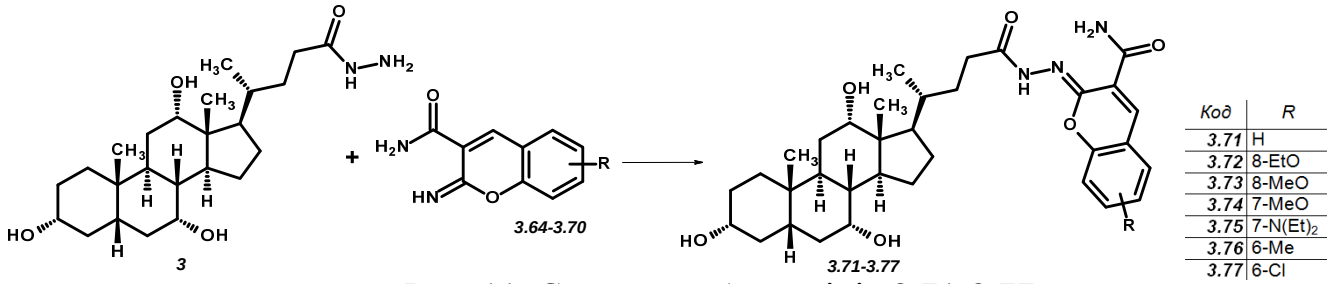
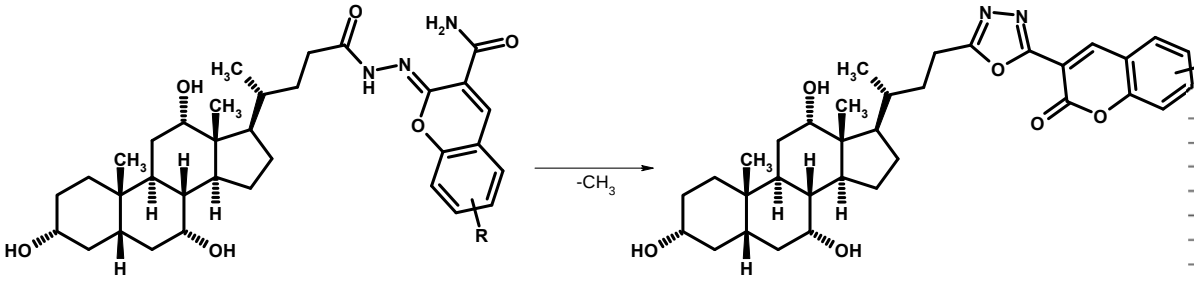


Рис. 11. Синтез карбоксамідів **3.71-3.77**.

Отримані «гідразони» ***3.71-3.77*** ідентифікували за даними елементного аналізу та ^{1}H ЯМР-спектроскопії. Так, ^{1}H ЯМР-спектр сполуки ***3.73*** містив сигнали ароматичних протонів в області 7,0-7,3 м.ч. (м), сигнал кумаринового протону 4-CH при 8,15 м.ч.(с). На спектрі також видно характеристичні сигнали NH (10,45 м.ч.(с)) і NH_2 (7,9 і 9,1 м.ч. (с)), і OCH_3-групи (3,9 м.ч.(с)).

Закриття 1,3,4-оксадіазольного циклу проводили при нагріванні 2-холілгідразо-2*H*-хромен-3-карбоксамідів в евтектичній суміші дифенілоксиду і дифенілу при температурі 230°С з утворенням 3-(5-(3-(3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгексадекагідро-1*H*-циклопента[*a*]фенантрен-17-іл)бутил)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-2*H*-хромен-2-ону та похідних ***3.78-3.84*** (рис. 12). Вихід складав 20-31% відносно холевої кислоти.



Код	R
3.78	H
3.79	8-EtO
3.80	8-MeO
3.81	7-MeO
3.82	7-N(Et)2
3.83	6-Me
3.84	6-Cl

Рис. 12. Синтез кумаринів ***3.78-3.84***.

Синтезовані сполуки є білими (***3.84***), жовтими або помаранчевими кристалічними речовинами з чіткими температурами плавлення, легко розчинні у диметилсульфоксиді, розчинні в метанолі та етанолі, дуже мало розчинні або нерозчинні у воді. На ^{1}H ЯМР спектрах сполук ***3.78-3.84*** (рис. 13, на прикладі сполуки ***3.80***) відсутні сигнали NH (10,45 м.ч.(s)) і NH_2 (7,9 і 9,1 м.ч. (s)), що вказує на завершеність процесу рециклізації. Зміщення сигналів кумаринового (8,75 м.ч.) і ароматичних протонів (7,4 м.д) в слабке поле свідчить про сильніший акцепторний вплив 1,3,4-оксадіазолу на кумаринове ядро в розчинах ДМСО-d_6, ніж карбоксамідної групи. У спектрах ^{1}H ЯМР також спостерігаються характерні сигнали протонів залишку холевої кислоти: метильних груп (С-18, С-19 та С-21) при δ 0.54-0.57 м.ч., 0.74-0.78 м.ч. та 0.96-1.00 м.ч. відповідно; груп ОН-3, ОН-7 та ОН-12 при δ 4.08-4.14 м.ч., 3,99 м.ч. та 4.28-4.32 м.ч. відповідно; аліфатичних протонів стеранового фрагменту у вигляді мультиплетів при δ 1.05-2.55 м.ч.

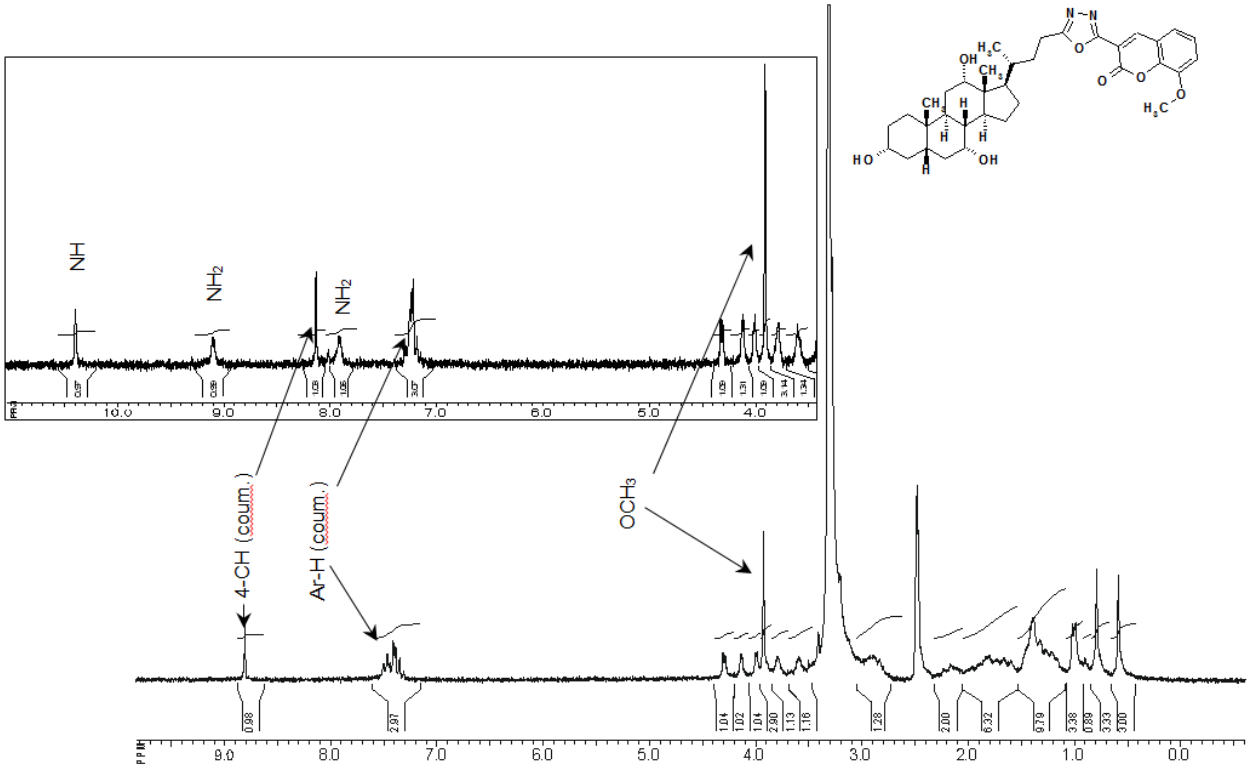


Рис. 13. ^{1}H ЯМР-спектр оксадіазолілкумарину ***3.80*** та фрагмент ^{1}H ЯМР-спектру відповідного йому карбоксаміду ***3.73***.

Мас-спектри характеризуються наявністю молекулярного іону $[M+H]^+$. Також спостерігаються іони $[M-H_2O+H]^+$, $[M-2H_2O+H]^+$, $[M-3H_2O+H]^+$ (рис. 14, на прикладі сполуки ***3.83***) – результат дегідроксилювання під час аналізу.

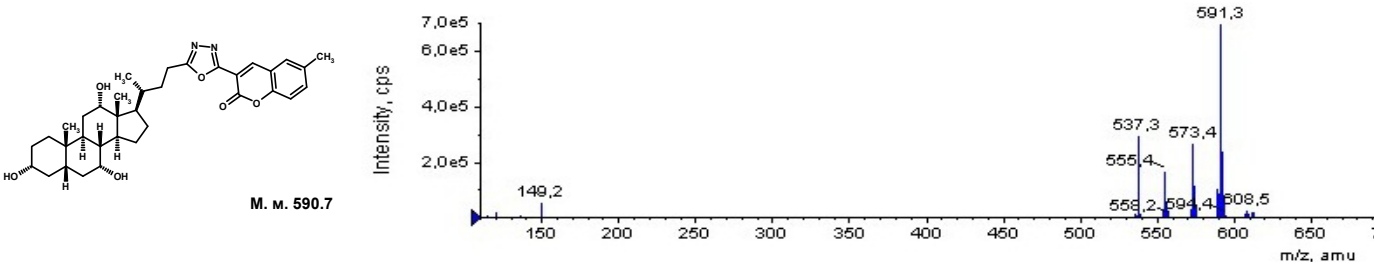


Рис. 14. Мас-спектр сполуки ***3.83.***

Очистку синтезованих 3-(5-(3-(3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгексадекагідро-1*H*-циклопента[*a*]фенантрен-17-іл)бутил)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-2*H*-хромен-2-онів ***3.78-3.84*** проводили методом препаративної ВЕРХ.

Для вивчення можливості використання отриманих 3-(5-(3-(3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгексадекагідро-1*H*-циклопента[*a*]фенантрен-17-іл)бутил)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-2*H*-хромен-2-онів ***3.78-3.84*** в якості флуоресцентних міток, нами було отримано спектри поглинання та флуоресценції. Дані, отримані в результаті аналізу, наведено в таблиці 1. Загальний перерозподіл довжин хвиль та квантових виходів флуоресценції корелює зі значеннями цих характеристик для сполук з арильними замісниками замість залишку холевої кислоти. Для незаміщених *o*-гідрокси-2-(кумариніл-3)-5-феніл-1,3,4-оксадіазолів, аналогічних сполукам ***3.78, 3.82, 3.83***, стоксові зсуви та квантові виходи флуоресценції дорівнюють 7156 $см^{-1}$ (3%), 2470 $см^{-1}$ (42%) та 4900 $см^{-1}$ (9%) відповідно. Слід зауважити, що наявність замісників у положенні 6 та 8 суттєво знижує квантовий вихід, та зсуває частоту флуоресценції у більш довгохвильову область, в той же час, донорні замісники у положенні 6, порівняно з незаміщеним зразком, сприяють зниженню зсуву Стокса та підвищенню квантового виходу. Також слід зазначити, що найбільший квантовий вихід та найменший Стоксовий зсув отримані для похідного з діетиламіновим замісником у положенні 7 (***3.82***). На рис. 15 наведено відповідні спектри поглинання та флуоресценції.

Таблиця 1

Визначення флуоресцентних властивостей кумаринів *3.78-3.84*

Код	R	λ_{abs},$см^{-1}$ (nm)		λ_{fl},$см^{-1}$ (nm)		$\Delta\lambda_{st}$,$см^{-1}$		φ(%)	
		EtOH	CH_3CN	EtOH	CH_3CN	EtOH	CH_3CN	EtOH	CH_3CN
3.78	H	29400 (340,1)	29840 (335,1)	23780 (420,5)	**23760 (420,9)**	5620	6080	9,51	12,8
3.79	8-EtO	30860 (324,0)	31240 (320,1)	19780 (505,6)	**20060 (498,5)**	11080	11180	2,22	2,52
3.80	8-MeO	30760 (325,1)	31220 (320,3)	19880 (503,0)	**20200 (495,0)**	10880	11020	2,74	2,72
3.81	7-MeO	28080 (356,1)	28760 (347,7)	23160 (431,8)	**23200 (431,0)**	4920	5560	32,3	38,8
3.82	**7-$N(Et)_2$**	23260 (429,9)	23520 (425,2)	20560 (486,4)	**20740 (482,2)**	2700	2780	54,5	57,6
3.83	6-Me	28500 (350,9)	28800 (347,2)	22980 (435,2)	**23040 (434,0)**	5520	5760	5,18	7,99
3.84	6-Cl	28860 (346,5)	28920 (345,8)	23080 (433,3)	**23300 (429,2)**	5780	5620	3,57	4,78

Отримані сполуки-лідери можуть бути використані як чутливі флуоресцентні хемосенсори в дослідженнях фізіології активного транспорту клітин для експресного визначення ступеню всмоктування жирних кислот, а також в дослідженнях комплексоутворення з важкими металами та пептидними токсинами.

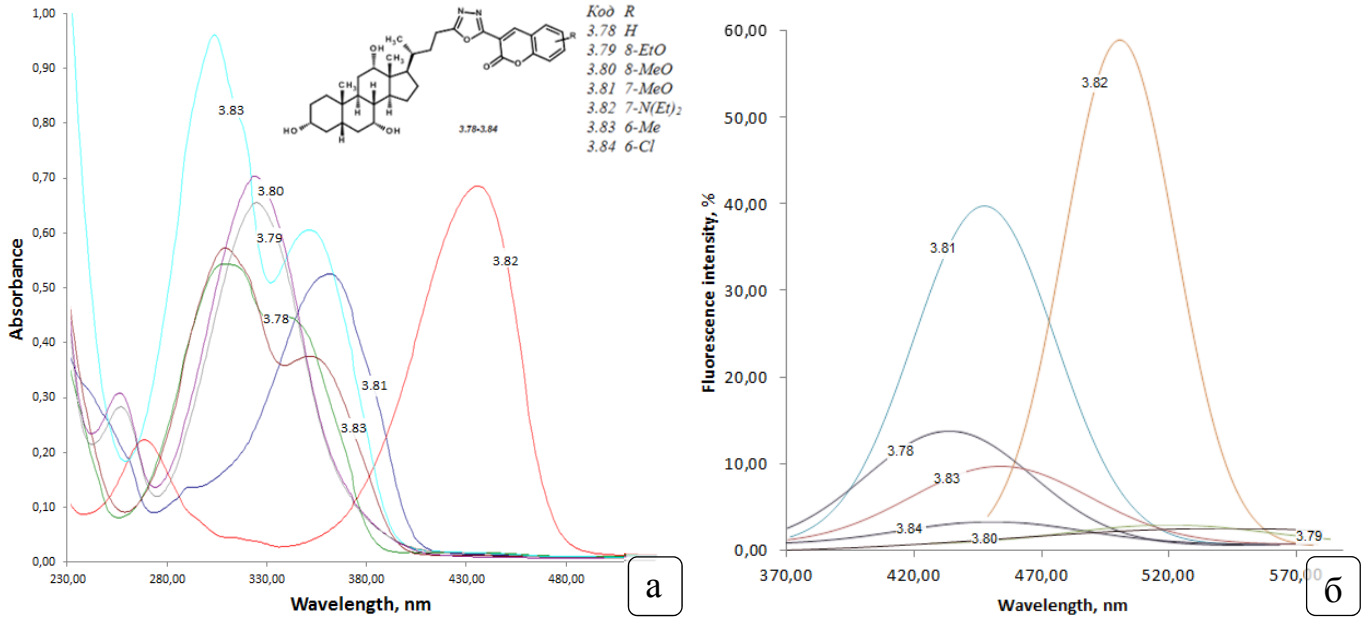


Рис. 15. Електронні спектри поглинання (а) та спектри флуоресценції (б) сполук ***3.78-3.84.***

Розділ 4. Вивчення біологічної активності похідних холевої кислоти. Для сполуки, що виявила найбільш інтенсивні флуоресцентні властивості, а саме 7-(діетиламіно)-3-(5-(1-метил-1-(3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгонан-17-іл)-проп-3-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-кумарину ***3.82*** була проведена оцінка можливості використання як маркера ступеню всмоктування жирних кислот.

Для синтезованих амідів та оксадіазолів холевої кислоти було проведено прогнозування біологічної активності для попередньої логіко-структурної оцінки можливої біологічної дії та визначення напрямку подальших досліджень.

Використання флуоресцентних похідних холевої кислоти для вивчення всмоктування жирних кислот. Вивчення можливості використання сполуки ***3.82*** як маркера ступеню всмоктування жирних кислот проводили на базі кафедри біохімії Національного фармацевтичного університету під керівництвом проф. Загайко А. Л.

Вміст вільних жирних кислот у сироватці крові визначали колориметрично, а концентрацію сполуки у сироватці контролювали флюориметрично за розробленою нами методикою. Досліди проведено на щурах, яких було розподілено на 4 групи – інтактна, контрольна (тварини, які отримували оливкову олію), та 2 групи, в яких тварини отримували сполуку у різних дозах у формі водного та олійного розчинів.

За результатами проведених досліджень було визначено, що концентрація 7-(діетиламіно)-3-(5-(1-метил-1-(3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгонан-17-іл)-проп-3-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-кумарину ***3.82*** у сироватці крові має дозозалежний характер. Ступінь всмоктування сполуки залежить від розчинника, та більший при використанні олійних розчинів, ніж водних. Експериментально доведено, що при введенні з олією флуоресцентного похідного ступінь всмоктування корелює з вмістом вільних жирних кислот у сироватці. Таким чином, сполука ***3.82*** може були запропонована для подальших випробовувань як маркер ступеню всмоктування жирних кислот.

Проведення первинного біологічного скринінгу амідів та оксадіазолів холевої кислоти. Найбільш поширеними серед прогнозованих фармакологічних ефектів з Ра більшим за 0,70 для синтезованих амідів є антагоніст холестерину, холеретична, гіпохолестеринемічна, гепатопротекторна. Слід відзначити, що декілька сполук потенційно виявили зовсім не очікувані від амідів холевої кислоти ефекти, а саме, можливість кардіопротекторної дії та ефект антагоністу мелатоніну.

Розділ 4. Розробка проекту Методик контролю якості на субстанцію 7-(діетиламіно)-3-(5-(1-метил-1-(3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгонан-17-іл)-проп-3-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-кумарин. Для флуоресцентного похідного холевої кислоти, яке запропоновано для використання як маркера ступеню всмоктування жирних кислот, розроблено проект МКЯ. Роботу виконано на базі Державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів НФаУ. Відповідно до вимог ДФУ та з урахуванням специфіки подальшого використання субстанції до проекту МКЯ пропонується включення наступних показників: опис, ідентифікація, розчинність, супровідні домішки, вода, сульфатна зола, залишкові кількості органічних розчинників, мікробіологічна чистота, кількісне визначення. На підставі вимог, що висуваються ДФУ, та з урахуванням експериментальних результатів специфікацію до проекту МКЯ на субстанцію наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Специфікація до МКЯ на 7-(діетиламіно)-3-(5-(1-метил-1-(3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгонан-17-іл)-проп-3-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-кумарин, субстанція

Показники	Допустимі межі	Методи контролю
1	**2**	**3**
Опис	Кристалічний порошок помаранчевого кольору	За п. 1 МКЯ, ДФУ*, *5.11.*
Розчинність	Легко розчинний у *диметилсульфоксиді Р*, розчинний в *метанолі Р* та етанолі (96%), дуже мало розчинний у *воді Р*	За п. 2 МКЯ, ДФУ*, *1.4, 5.11*
Ідентифікація	1. УФ-спектр поглинання *розчину Р* субстанції в області від 230 до 600 нм повинен мати максимуми при 267±2 нм та 431±2 нм. Питомий показник поглинання при довжині хвилі 431±2 нм має знаходитися у межах від 475 до 485 (у перерахунку на безводну речовину). 2. Інфрачервоний спектр субстанції, одержаний в дисках з *калію броміду Р* має відповідати ІЧ-спектру, що наведений в МКЯ. 3. Жовтувато-зелена флуоресценція *розчину Р* субстанції в УФ-світлі.	За п. 3. 1 МКЯ, ДФУ*, *2.2.25* За п. 3. 2 МКЯ, ДФУ*, *2.2.24* За п. 3. 3 МКЯ, якісна реакці
Супровідні домішки	Домішка А не більше 0,5 %; домішка Б не більше 0,5 %; домішка В не більше 0,5 %; домішка Г не більше 0,5 %; інші домішки не більше 0,2 %; сума усіх домішок не більше 1,0 %.	За п. 4 МКЯ, ДФУ*, *2.2.29*, метод ВЕРХ.

Продовження таблиці 2.

1	2	3
Вода	Не більше 0,5 %	За п. 5 МКЯ, ДФУ*, 2.5.12, напівмікрометод
Сульфатна зола	Не більше 0.1 %	За п. 6 МКЯ, ДФУ*, *2.4.14.*
Залишкові кількості органічних розчинників	Етанол: не більше 5000 ppm;	За п. 7 МКЯ, ДФУ*, *2.2.28*
Мікробіологічна чистота	В 1 г субстанції допускається наявність не більше 10^3 бактерій і не більше 10^2грибів. Не допускається наявність в 1 г субстанції бактерій род. *Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.	За п. 10 МКЯ, ДФУ*, *2.6.12, 2.6.13*
Кількісне визначення	Не менше 99.0 % і не більше 101.0 % ($C_{38}H_{53}N_3O_6$) у перерахунку на безводну речовину.	За п. 11 МКЯ, ДФУ*, *2.2.20*

ДФУ* – діюче видання Державної Фармакопеї України

Згідно нормативної документації, всі аналітичні методики і випробування, які входять до МКЯ, мають бути валідовані. Валідації підлягають: випробування на ідентифікацію; випробування на граничний вміст домішок; кількісні випробування для визначення діючої речовини. З урахуванням того, що субстанція тільки планується для використання, валідацію проводили у обмеженому обсязі. Не проводили валідаційні випробування для визначення сульфатної золи (не потребує валідації), методики визначення залишкових кількостей органічних розчинників та мікробіологічної чистоти (виконані згідно рекомендацій ДФУ).

Валідацію визначення супровідних домішок методом ВЕРХ проводили з урахуванням обов'язкових валідаційних характеристик випробування на граничний вміст для контролю домішок – визначали специфічність та межу виявлення. Визначено, що в умовах методики визначенню домішок не заважають ні розчинник і рухома фаза, ні основна речовина (методика специфічна), а межа виявлення складає близько 2,5 мкг/мл, що задовольняє критеріям прийнятності (не перевищує 0,16% від концентрації випробовуваної речовини, або 32% від нормованого вмісту індивідуальної домішки).

При валідації кількісного визначення методом неводного тирування оцінювали характеристики методу, вимоги та результати дослідження за якими наведено нижче.

Прогноз повної невизначеності аналізу Δ_{As}. Для допусків вмісту ±1,0 % $\Delta_{As(max)}$ становить 1,0 %. Враховували невизначеність пробопідготовки Δ_{SP} та невизначеність кінцевої аналітичної операції Δ_{FAO}. Прогнозована невизначеність пробопідготовки виявилася значущою та становила 0,41. Прогнозована величина повної невизначеності аналізу становила 0,41. Таким чином, повна прогнозована невизначеність (Δ_{As}) аналітичної методики кількісного визначення субстанції не

перевищує максимально допустимої повної відносної невизначеності результатів аналізу.

Специфічність аналітичної методики перевіряли шляхом титрування холостого розчину. Визначено, що об'єм титранту, що витрачається на титрування холостого розчину, становить 1 краплю (≤0,05 мл), отже, методика характеризується достатньою специфічністю.

Вивчення *лінійності* проводили одночасно з *правильністю* і *прецизійністю (збіжністю)* на 9-ти незалежних розчинах. Використовували по 3 розчини 3 концентрацій (80%, 100% та 120%). Параметри *лінійної залежності* (графік будували в нормалізованих координатах), визначені методом найменших квадратів ($|a|$ =1,09, $\frac{s_0}{b} \leq \frac{\Delta_{A_S}(\%)}{t(95\%,n-2)}$, $r =$ 0,9998) та задовольняють критеріям прийнятності ($|a| \leq 1{,}60$, $\frac{0{,}53}{0{,}9881} \leq \frac{1{,}0}{0{,}895}$, $r \geq 0{,}99926$).

Систематична похибка δ методики в діапазоні концентрацій від 80 до 120 % склала 0,08%. *Правильність* підтверджується виконанням критеріїв статистичної (δ%≤0,23) і практичної (δ%≤0,32) незначущості систематичної похибки методики.

Результати порівняння значення відносного довірчого інтервалу величини Z з критичним значення для збіжності результатів (0,70 ≤ 1,0 %) свідчить про задовільну *прецизійність* методики.

Таким чином, всі параметри відповідають необхідним критеріям прийнятності. Метод може бути використаний для кількісного визначення субстанції методом неводного титрування згідно проекту МКЯ.

Висновки

У дисертаційній роботі наведене теоретичне узагальнення та практичне вирішення наукової задачі, що полягає в синтезі функціоналізованих похідних холевої кислоти (алкіл-, арил-, гетериламіди; системи, що містять залишок 3,7,12-тригідроксихолану та 1,2,4-оксадіазольний, або 1,3,4-оксадіазольний та кумариновий фрагменти). Розроблено препаративні методи отримання 65 нових сполук, для яких встановлено будову, вивчено фізико-хімічні параметри.

1. Відтворено та модифіковано схему виділення ЖК з жовчі великої рогатої худоби. За допомогою комбінації стандартних підходів до виділення ЖК з колонковою адсорбційною хроматографію та хроматографією низького тиску розроблено препаративні методики виділення та отримано в індивідуальному стані холеву та дезоксихолеву кислоти.

2. Здійснено синтез естерів, алкіл-, арил-, гетериламідів холевої кислоти з використанням як відомого раніше методу (через стадію отримання інтермедіату холевої кислоти з етилхлорформіатом), так і методу, не описаного для жовчних кислот (через стадію отримання диметилпіразоліду холевої кислоти). Розроблено методику препаративної хроматографічної очистки синтезованих амідів холевої кислоти методом ВЕРХ. Визначено, що при використанні як активатора карбоксильної групи карбодиімідазолу відбувається одночасне активування карбоксильної на однієї з гідроксильних груп, що має практичний інтерес і може бути використане в дослідженнях при функціоналізації гідроксигрупи при С-3 холевої кислоти.

3. З використанням синтезованої глікохолевої кислоти отримано наногетерогенну систему – міцелярний водний розчин вітаміну K_1 – та створено вітчизняну, високоефективну пероральну форму вітаміну K_1 для профілактики гемостатичних захворювань у новонароджених, для якої вивчено специфічну фармакологічну активность на статевозрілих та новонароджених тваринах.

4. Запропоновано підходи до отримання похідних 17-(4-(1,2,4-оксадіазол-5-іл)бутан-2-іл)-10,13-диметилгексадекагідро-1*H*-циклопента[a]фенантрен-3,7,12-тріолів (заснований на циклізації-конденсації змішаного ангідриду холевої та етоксимурашиної кислот з амідоксимами) та ізомерних сполук, в яких 3,7,12-тригідроксихолановий фрагмент приєднано у 3 положенні оксадіазольного циклу (заснований на циклізації-конденсації N'-гідроксіімідамідного похідного холевої кислоти з хлорангідридами чи імідазолідами карбонових кислот).

5. Розроблено метод синтезу та вперше одержано поліядерні системи на базі кумаринового ядра, що містили тригідроксихолан, приєднаний через 1,3,4-оксадіазольний місток. Синтез проводили в декілька стадій з рециклізацією продукту реакції гідразиду холевої кислоти та 2-іміно-2*H*-хромен-3-карбоксамідів. Для визначення можливості використання отриманих похідних в якості флуоресцентних міток, вивчено їх спектральні властивості. Розроблено методику препаративної хроматографічної очистки синтезованих сполук методом ВЕРХ.

6. Запропоновано та досліджено можливість використання як маркеру ступеню всмоктування жирних кислот флуоресцентного похідного холевої кислоти. Виявлено, що концентрація 7-(діетиламіно)-3-(5-(1-метил-1-(3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгонан-17-іл)-проп-3-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-кумарину у сироватці крові має дозозалежний характер. Ступінь всмоктування сполуки залежить від розчинника, та більший при використанні олійних розчинів, ніж водних. Експериментально доведено, що при введенні з олією флуоресцентного похідного холевої кислоти ступінь всмоктування не залежить від вмісту вільних жирних кислот у сироватці.

7. Для флуоресцентного похідного холевої кислоти, яке запропоновано для використання як маркер ступеню всмоктування жирних кислот, розроблено проект МКЯ на субстанцію 7-(діетиламіно)-3-(5-(1-метил-1-(3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгонан-17-іл)-проп-3-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-кумарин. Проведено валідацію аналітичних методик: супровідні домішки (методом ВЕРХ) та кількісне визначення (методом неводного титрування).

Список опублікованих праць за темою дисертації

1. Гусаров В. І. Виділення жовчних кислот з жовчі великої рогатої худоби / В. І. Гусаров, С. М. Коваленко, Л. В. Євсєєва // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2012. – №2(9). – С. 41–43. *(Особисто дисертантом зроблено: проведення експериментальних досліджень, узагальнення результатів, написання статті).*

2. Препаративна очистка синтетичних кумаринів, що містять залишок холевої кислоти / В. І. Гусаров, С. М. Коваленко, О. В. Заремба, Т. Д. Гусарова // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2012. – №3(10). – С. 42–45.

(Особисто дисертантом зроблено: проведення експериментальних досліджень та узагальнення результатів, написання статті).

3. Гусаров В. І. Синтез та фізико-хімічні властивості амідів холевої кислоти / В. І. Гусаров, С. М. Коваленко, О. В. Заремба // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2012. – Т. 10, № 4 (40). – С. 54–58. *(Особисто дисертантом зроблено: проведення експериментальних досліджень та узагальнення результатів, написання статті).*

4. Аналіз амідів холевої кислоти методом високоефективної рідинної хроматографії / В. І. Гусаров, С. М. Коваленко, О. В. Заремба, Т. Д. Гусарова // Запорожский медицинский журнал. – 2012. – №6(75). – С. 63–65. *(Особисто дисертантом зроблено: проведення експериментальних досліджень та узагальнення результатів, написання статті).*

5. Гусаров В. І. Валідація методики кількісного визначення субстанції 7-(диетиламіно)-3-(5-(1-метил-1-(3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгонан-17-іл)-проп-3-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-кумарину / В. І. Гусаров, С. М. Коваленко, Т. Д. Гусарова // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2012. – №6(26). – С. 20–24.

6. Пат. 64625 Україна на корис. модель, МПК(2012.01) C07D 271/06, C07C 35/00. Похідні (3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-17-((R)-4-(1,2,4-оксадіазол-5-іл)бутан-2-іл)-10,13-диметилгексадекагідро-1Н-циклопента[а]фенантрен-3,7,12-тріолу / Коваленко С. М., Ніколаєнко П. В., Гусаров В. І., Заремба О. В.; заявник та патентовласник Національний фармацевтичний університет. – №u201105229; заявл. 26.04.11; опубл. 10.11.11, Бюл. №21. *(Особисто дисертантом зроблено: планування і здійснення експерименту, аналіз одержаних результатів та підготовка заявки на патент).*

7. Пат. 72609 Україна на корис. модель, МПК (2012.01) C07D 413/02, C07J 9/00. 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-он та його похідні / Коваленко С. М., Ніколаєнко П. В., Гусаров В. І., Заремба О. В.; заявник та патентовласник Національний фармацевтичний університет. – №u201201125; заявл. 03.02.12; опубл. 27.08.12, Бюл. №16. (*Особисто дисертантом зроблено: планування і здійснення експерименту, аналіз одержаних результатів та підготовка заявки на патент*).

8. Гусаров В. Виділення та очистка жовчних кислот / В. Гусаров, Л. Євсєєва // Актуальні питання створення нових лікарських засобів : матеріали всеукр. наук.-практ. конф. студ. та молодих вчен., 17–18 трав. 2007 р. – Х., 2007. – С. 7. *(Особисто дисертантом зроблено: проведення експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка тез).*

9. Євсєєва Л. В. Розробка та валідація методик аналітичного контролю домішок методом ТШХ на прикладі жовчних кислот / Л. В.Євсєєва, Ю. І. Губін, В. І. Гусаров // Управління якістю в фармації : матеріали ІІ наук.-практ. конф., 27 трав. 2007 р. – Х., 2007. – С. 85. *(Особисто дисертантом зроблено: участь у проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці тез).*

10. Гусаров В. І. Синтез амідів холевої кислоти на основі піперидину та

піперазину / В. І. Гусаров, О. В. Заремба, С. М. Коваленко // Сьогодення та майбутнє фармації : матеріали всеукр. конгр., 16–19 квіт. 2008 р. – Х., 2008. – С. 44 *(Особисто дисертантом зроблено: проведення експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка тез).*

11. Гусаров В. І. Синтез амідів холевої кислоти / В. І. Гусаров, О. В. Заремба, Л. В. Євсєєва // Актуальні питання створення нових лікарських засобів : матеріали всеукр. наук.-практ. конф. студ. та молодих вчен., 16–17 квіт. 2008 р. – Х., 2008. – С. 8. *(Особисто дисертантом зроблено: проведення експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка тез).*

12. Очистка синтетических амидов холевой кислоты методом препаративной жидкостной хроматографии / В. И. Гусаров, О. В. Заремба, С. Н. Губарь, С. Н. Коваленко // Фармакогнозія XXI століття. Досягнення та перспективи : матеріали ювіл. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 26 берез. 2009 р. – Х., 2009. – С. 45 *(Особисто дисертантом зроблено: проведення експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка тез).*

13. Розробка лікарської форми вітаміну K_1 для новонароджених / Л. В. Євсєєва, С. М. Коваленко, Ю. І. Губін, С. М. Губарь, В. І. Гусаров // Актуальні проблеми гематології та трансфузійної медицини : матеріали ювіл. наук.-практ. конф. з міжнар. уч. 27–28 травня 2010 р. – Львів, 2010. – С. 75–77 *(Особисто дисертантом зроблено: участь у проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці тез).*

14. Гусаров В. Використання амідів холевої кислоти в медицині та фармації / В. Гусаров, С. Коваленко // Фармація України. Погляд у майбутнє : матеріали VII Нац. з'їзду фармацевтів України, 15–17 верес. 2010 р. – Х., 2010. – Т. 1. – С. 37 *(Особисто дисертантом зроблено: пошук та узагальнення літературних даних, підготовка тез).*

15. Rapid way to fluorescent cholic-based chemosensor precursors : (In Proceedings of the 15th Int. Electron. Conf. Synth. Org. Chem., 1–30 November 2011; Sciforum Electronic Conferences Series, 2011) [електроний ресурс] / P. Nikolaienko, O. Zaremba, V. Gusarov, S. Kovalenko. – режим доступу : http://www.usc.es/congresos/ecsoc/15/hall_b_BMNPC/b014/index.pdf *(Особисто дисертантом зроблено: участь у проведенні експериментальних досліджень та узагальненні результатів, участь у підготовці тез).*

АНОТАЦІЯ

Гусаров В. І. Синтез, властивості та шляхи практичного використання функціоналізованих похідних холевої кислоти. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2013.

Робота присвячена синтезу похідних холевої кислоти з функціоналізованою карбоксильною групою (естерів, алкіл-, арил-, гетериламідів ХК), похідних 17-(4-(1,2,4-оксадіазол-5-іл)бутан-2-іл)-10,13-диметилгексадекагідро-1*H*-циклопента[*a*]фенантрен-3,7,12-тріолів та ізомерних сполук, в яких 3,7,12-тригідроксихолановий фрагмент приєднано у 3 положенні оксадіазольного циклу, та поліядерних систем на

базі кумаринового ядра, що містять тригідроксихолан, приєднаний через 1,3,4-оксадіазольний місток. Структуру виділених сполук підтверджено даними елементного аналізу, ^{1}Н ЯМР-, ІЧ-спектроскопії та мас-спектрометрії, а їх індивідуальність – методами тонкошарової хроматографії, високоефективної рідинної хроматографії та хроматомас-спектрометрії.

З використанням синтезованої глікохолевої кислоти отримано міцелярний водний розчин вітаміну $К_1$ та створено вітчизняну, високоефективну пероральну форму вітаміну $К_1$ для профілактики гемостатичних захворювань у новонароджених.

Запропоновано та досліджено можливість використання як маркеру ступеню всмоктування жирних кислот флуоресцентного похідного холевої кислоти – 7-(діетиламіно)-3-(5-(1-метил-1-(3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгонан-17-іл)-проп-3-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-кумарину. Для цієї сполуки розроблено проект методів контролю якості (МКЯ). Проведено валідацію аналітичних методик: супровідні домішки (методом ВЕРХ) та кількісне визначення (методом неводного титрування).

Ключові слова: синтез, похідні холевої кислоти, аміди, фітоменадіон, 1,2,4-оксадіазоли, кумарини, флуоресценція, біологічно активні речовини.

АННОТАЦИЯ

Гусаров В. И. Синтез, свойства и пути практического применения функционализированных производных холевой кислоты. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. – Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2013.

Работа посвящена синтезу производных холевой кислоты с функционализированной карбоксильной группой (эфиров, алкил-, арил-, гетериламидов холевой кислоты), производных, содержащих 1,2,4-оксадиазольный и тригидроксихолановый фрагменты и полиядерных систем на базе кумаринового ядра, содержащих тригидроксихолан, присоединенный через 1,3,4-оксадиазольный мостик.

Амиды холевой кислоты получены модификацией известного метода (через стадию образования интермедиата с этилхлорформиатом), и метода, не описанного для желчных кислот ранее (через стадию образования диметилпиразолида холевой кислоты). При использовании в качестве активатора карбоксильной группы карбодиимидазола происходит одновременная активация карбоксильной и одной из гидроксильных групп, что имеет практический интерес и может быть использовано в исследованиях при функционализации гидроксигруппы при при С-3 холевой кислоты.

Среди синтезированных амидов с точки зрения медицинского и фармацевтического использования интересна гликохолева кислота (ГХК), которая используется как эмульгатор в фармацевтических препаратах. Предложенная нами методика синтеза ГКХ отличается простотой и экономичностью и может быть предложена для наработки соединения в промышленных масштабах. С использованием синтезированной нами ГКХ получен мицеллярный водный раствор

витамина K_1 (фитоменадиона), участвующего в образовании протромбина и способствующего нормальному свертыванию крови, создана отечественная, высокоэффективная пероральная форма витамина K_1 для профилактики гемостатических заболеваний у новорожденных, для которой изучена специфическая фармакологическая активность на половозрелых и новорожденных животных.

Для получения производных 17-(4-(1,2,4-оксадиазол-5-ил)бутан-2-ил)-10,13-диметилгексадекагидро-1*H*-циклопента[*a*]фенантрен-3,7,12-тріолов разработан метод, основаный на циклизации-конденсации смешанного ангидрида холевой и этоксимуравьинной кислот с амидоксимами. Изомерные 1,2,4-оксадиазолы, в которых 3,7,12-тригидроксихолановый фрагмент присоединен в 3 положении оксадиазольного цикла, были получены при помощи циклизации-конденсации N'-гидроксиимидамидного производного холевой кислоты с хлорангидридами и имидазолидами карбоновых кислот. Предложены синтетические подходы к созданию соединений на базе кумаринового ядра, содержащие остаток ХК, присоединенный через 1,3,4-оксадиазольний мостик.

Структуры выделенных соединений подтверждены данными элементного анализа, ^{1}Н ЯМР-, ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии, а их индивидуальность – методами тонкослойной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и хроматомасс-спектрометрии.

Для изучения возможности использования полученных производных в качестве флуоресцентных меток, были получены электронные спектры поглощения и спектры флуоресценции. Самый большой квантовый выход флуоресценции и наименьшее Стоксово смещение имеет производное 7-(диэтиламино)-3-(5-(1-метил-1-(3,7,12-тригидрокси-10,13-диметилгонан-17-ил)-проп-3-ил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-кумарин. Биологические испытания показали, что степень всасывания соединения зависит от растворителя, и больше при использовании масляных растворов, чем водных. Экспериментально доказано, что при введении с маслом флуоресцентного производного холевой кислоты степень всасывания не зависит от содержания свободных жирных кислот в сыворотке. Соединение предложено в качестве маркера степени всасывания жирных кислот.

В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Украины для флуоресцентного производного холевой кислоты, рекомендуемого в качестве маркера степени всасывания жирных кислот, был разработан проект методов контроля качества на субстанцию. Контроль проводили по таким показателям, как «Описание», «Растворимость», «Идентификация», «Сопутствующие примеси», «Вода», «Сульфатная зола», «Остаточные количества органических растворителей», «Микробиологическая чистота», «Количественное определение». Для подтверждения соответствия методики определения сопутствующих примесей методом ВЭЖХ и количественного определения методом неводного титрования критериям приемлемости, была проведена валидация аналитических методик.

Ключевые слова: синтез, производные холевой кислоты, амиды, фитоменадион, 1,2,4-оксадиазолы, кумарины, флуоресценция, биологически активные вещества.

SUMMARY

Gusarov V. I. Synthesis, properties and application of functionalized cholic acid derivatives. – Manuscript.

Thesis for the Ph. D. of Pharmacy, speciality 15.00.02 – Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy. – National university of pharmacy, Ministry of Healthcare of Ukraine, Kharkiv, 2013.

The aim of this work was synthesis of cholic acid with functionalized carboxyl group (esters, alkyl-, aryl-, heterylamides), 17-(4-(1,2,4-oxadiazol-5-yl)butan-2-yl)-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,7,12-trioles and their isomers, and R-3-(5-(1-methyl-1-(3,7,12-trihydroxy-10,13-dimethylgonan-17-yl)-prop-3-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-coumarins. Synthesized glycocholic acid was used for water-soluble form of vitamin K_1 obtaining. Structure of synthesized compounds was confirmed by elemental analysis, 1H NMR, IR spectroscopy and mass spectrometry, and their purity – by TLC, HPLC and LC-MS.

The using of fluorescent cholic acid derivative 7-(diethylamino)-3-(5-(1-methyl-1-(3,7,12-trihydroxy-10,13-dimethylgonan-17-yl)-prop-3-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-2H-chromen-2-one as a marker of fatty acids absorption was proposed and investigated. Quality control methods for this compound have been drafted. Such analytical methods as related substances determination (by HPLC) and assay (using non-aqueous titration) were validated.

Key words: synthesis, derivatives of cholic acid, amides, phytomenadione, 1,2,4-oxadiazoles, coumarins, fluorescence, biologically active substances.

Підписано до друку 16.05.2013. Формат 60х84/16
Папір офсетний. Гарнітура Times ET. Друк ризографія.
Умов. друк. арк. 0,9. Наклад 100 прим. Замов. №

Надруковано ФОП «Азамаєва В. П.»
Свідоцтво про державну реєстрацію В02 №229277 від 06.06.2001 р.
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до державного реєстру видавців, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції
серія ХК №134 від 23.02.05 р.
м. Харків, вул. Познанська 6, к. 84, тел. 362-01-52