

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

## АНАЛІЗ АМІДІВ ХОЛЕВОЇ КИСЛОТИ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

**Ключові слова:** холева кислота, аміди, ВЕРХ, препаративна хроматографія.

**Ключевые слова:** холевая кислота, амиды, ВЭЖХ, препаративная хроматография.

**Key words:** cholic acid, amides, HPLC, preparative chromatography.

Розроблено методику препаративної очистки синтезованих амідів холевої кислоти методом ВЕРХ. Структуру сполук підтверджено даними <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопії та мас-спектрометрії, чистоту – хроматографічними методами.

Разработана методика препаративной очистки синтезированных амидов холевой кислоты методом ВЭЖХ. Структура соединений подтверждена данными <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии, чистота – хроматографическими методами.

The method of preparative purification of the obtained amides of cholic acid by HPLC was developed. The structure of the compounds was confirmed by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and mass spectrometry. Purity of compounds was confirmed by chromatography.

Напівсинтетичні сполуки, утворені на базі природних молекул, широко використовують у хімії та медицині. До популярних матриць належить холева кислота, що є основним компонентом жовчі людини і багатьох тварин. Наявність у її структурі гідроксильних і карбоксильної груп дає змогу легкої функціоналізації для надання потрібних властивостей. Поширеними природними та синтетичними похідними холевої кислоти є аміди. Ці сполуки використовують в аналітичній та органічній хімії [1–3], біохімії [4], медичній і фармацевтичній практиці [5–7].

Раніше запропоновано методики синтезу амідів холевої кислоти [8,9], деякі з них містили домішки. Для подальшого використання актуальним питанням було отримання сполук на рівні стандартних зразків.

### МЕТА РОБОТИ

Розробка методики препаративної очистки отриманих амідів холевої кислоти.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Визначення складу домішок у синтезованих амидах проводили на хроматографі Varian ProStar (насоси ProStar 210; діодно-матричний детектор ProStar 330; автосамплер ProStar 400 з об'ємом дозуючої петлі 20 мкл), колонка Microsorb 100-5 C18, 250×4,6 мм, 5 мкм. Концентрація розчинів для аналізу – 1 мг/мл, розчинник – 90% ацетонітрил. Рухома фаза – 80% ацетонітрил. Режим елюювання ізократичний. Швидкість подання рухомої фази – 1 мл/хв. Час аналізу – 10 хв. Довжина хвилі детектування – 235 нм (відповідає максимуму поглинання холевої кислоти [10]).

Препаративне виділення проводили на хроматографі Varian ProStar (насоси ProStar 210; спектрофотометричний детектор ProStar 325; вузол ручного вводу з об'ємом дозуючої петлі 1 мл), колонка Диасорб-130-С16Т, 250×15 мм, 7 мкм. Концентрація розчинів для аналізу – приблизно 200 мг/мл, розчинник – суміш ацетонітрил – метанол (1:1). Рухома фаза – 80% ацетонітрил. Режим елюювання ізократичний. Швидкість подання рухомої фази – 5,5 мл/хв. Час аналізу – 25 хв. Довжина хвилі детектування – 254 нм. Інжекція – еквівалент 100 мг суміші для розділення.

Чистоту виділених сполук контролювали за допомогою

хромато-мас-спектрометричної системи, що складалась з хроматографа Shimadzu LC-10А з автосамплером Gilson 215, мас-спектрометра PE Sciex API 165, детектора світлорозсіяння Sedex 75. Колонка SynergyHydro-RP, 20×2.0 мм, 2,5 мкм. Для аналізу використовували розчини амідів з концентрацією 1 мг/мл в диметилсульфоксиді. Рухомі фази: А – 5 мМ амонію форміат у воді, В – 5 мМ амонію форміат в ацетонітрилі. Градієнт елюювання: 0,00 хв – 5% В; 0,01–2,90 хв – 5% → 95% В; 2,90–3,50 хв – 95% В; 3,50–3,80 хв – 95% → 5% В; 3,80–4,00 хв – 5% В. Швидкість подання рухомої фази – 0,50 мл/хв. Метод іонізації – електророзпилення в позитивному режимі. Довжина хвилі детектування – 254 нм.

Спектри <sup>1</sup>H ЯМР отримано на спектрометрі Varian WXR-400 (робоча частота 400 MHz) в ДМСО-d<sub>6</sub>, внутрішній стандарт – ТМС.

Температури плавлення визначали відповідно до вимог ДФУ.

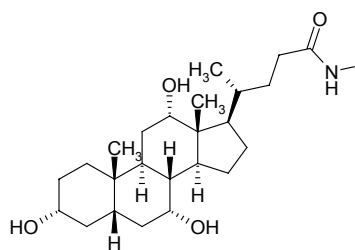
### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аміди холевої кислоти, очищення яких проводили за допомогою методу препаративної ВЕРХ, наведено на *рис. 1*. Підбір умов хроматографування (для подальшого масштабування у препаративному варіанті) проводили на аналітичному хроматографі за умов, описаних вище.

Визначено, що синтезовані аміди містять домішки холевої кислоти та вихідного аміну (*рис. 2*, на прикладі сполуки **1d**). Висновок зроблено на основі зіставлення максимумів поглинання речовин, що утворюють піки на хроматограмах (при детектуванні), і максимумів поглинання використаних у синтезі амінів. Час утримування для амідів холевої кислоти складало: **1a** – 5,31 хв; **1b** – 4,80 хв; **1c** – 4,02 хв; **1d** – 3,93 хв; **1e** – 4,46 хв; **1f** – 4,18 хв; **1g** – 4,06 хв.

Отримані дані використано для добору умов препаративного хроматографування. При використанні у якості рухомої фази 80% ацетонітрилу препаративні хроматограми подібні до аналітичних, тільки зі збільшеним часом утримування (*рис. 3*, на прикладі сполуки **1d**). Час утримування для фракцій амідів холевої кислоти: **1a** – 14,7–16,5 хв; **1b** – 11,0–12,9 хв; **1c** – 8,3–10,1 хв; **1d** – 8,2–10,3 хв; **1e** – 9,0–10,4 хв; **1f** – 8,8–11,0 хв; **1g** – 8,4–10,5 хв.

Фракції збирали вручну. Однакові фракції після декількох



Код	R
1a -	4-Et-Ph
1b -	4-(COOMe)Ph
1c -	Bz
1d -	4-F-Bz
1e -	2,4-di-F-Ph
1f -	2-Me-Bz
1g -	4-OMe-Ph

Рис. 1. Аміди холестерої кислоти

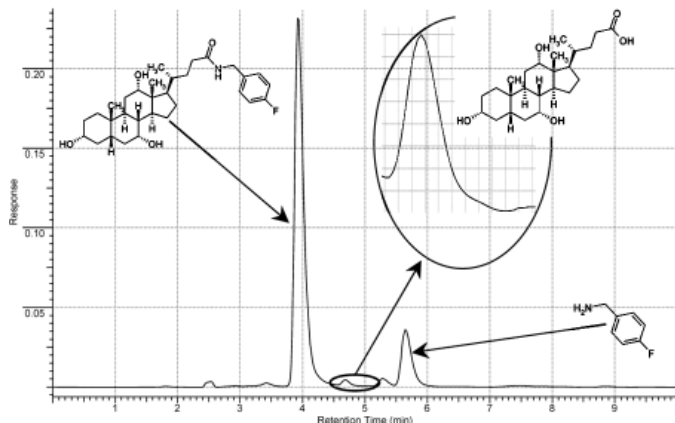


Рис. 2. Хроматограма сполуки 1d.

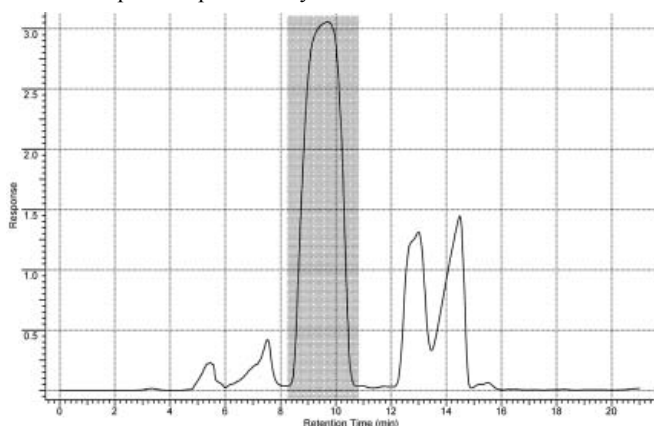


Рис. 3. Хроматограма сполуки 1d. Кольором виділено цільову фракцію.

інжекцій об'єднували і концентрували на роторному випарнику при 35–50°C та залишковому тиску близько 10<sup>-2</sup> атм та перекристалізували з ацетонітрилу. Вихід амідів складав від 76 до 89% від маси суміші, що очищували.

Зразки ідентифікували за допомогою методу <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопії. Перевірку чистоти виділених сполук проводили на хромато-мас-спектрометрі. З використанням зазначених вище умов аналізу часи утримання для амідів холестерої кислоти складалі: **1a** – 2,42 хв; **1b** – 2,27 хв; **1c** – 2,05 хв; **1d** – 2,02 хв; **1e** – 2,16 хв; **1f** – 2,09 хв; **1g** – 2,06 хв. На хроматограмах, отриманих зі спектрофотометричного детектора (рис. 4а), детектора світлорозсіяння (рис. 4б) та мас-спектрометричного детектора (рис. 4в, на прикладі сполуки **1a**) спостерігали лише один пік (на 0,39 хв пік не враховують, належить розчиннику). Мас-спектри отриманих сполук (рис. 4г, на прикладі сполуки **1a**) характеризуються наявністю молекулярного іону [M+H]<sup>+</sup>.

Для більшості сполук зафіксовано також іони [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, [M-2H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, [M-3H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, що утворюються внаслідок описаної в спеціалізованій літературі [11] легкої елімінації гідроксильних груп холестерої кислоти під час аналізу. На мас-спектрах наявні також димерні квазі-іони [2M+H]<sup>+</sup>, що утворюються в результаті приєднання молекулярного іону [M+H]<sup>+</sup> до непроторованої молекули, та іонні кластери [2M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (утворені за рахунок взаємодії з компонентом рухомої фази). Отримані дані свідчать про високий ступінь чистоти отриманих речовин.

Результати <sup>1</sup>H-ЯМР та температури плавлення для очищених амідів холестерої кислоти наведено нижче.

(3α,5β,7α,12α)-N-(4-етилфеніл)-3,7,12-тригідроксистерол-24-амід {1a}. T<sub>пл</sub> = 130°C; <sup>1</sup>H-ЯМР, δ, м.д.: 0.59 (s, 3H, C-18), 0.80 (s, 3H, C-18), 0.94 (d, 3H, C-21), 1.32 (m, 12H), 1.72 (m, 6H), 1.95 (m, 1H), 2.20 (m, 4H), 3.61 (m, 1H, C-3), 3.77 (m, 1H, C-12), 4.01 (d, 1H, OH-7), 4.10 (d, 1H, OH-3), 4.31 (d, 1H, OH-12), 7.09 (d, 2H, Ar), 7.48 (d, 2H, Ar), 9.77 (s, 1H, NH).

Метил-4-[[3α,5β,7α,12α)-3,7,12-тригідрокси-24-оксистерол-24-іл]аміно]бензоат {1b}. T<sub>пл</sub> = 248-250°C; <sup>1</sup>H-ЯМР, δ, м.д.: 0.59 (s, 3H, C-18), 0.78 (s, 3H, C-19), 0.95 (d, 3H, C-21), 1.31 (m, 14H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.70 (m, 6H), 2.03 (m, 5H), 3.59 (m, 1H, C-3), 3.75 (m, 1H, C-12), 4.00 (d, 1H, OH-7), 4.12 (d, 1H, OH-3), 4.30 (m, 3H, OH-12, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7.65 (d, 2H, Ar), 7.90 (d, 2H, Ar); 10.18 (s, 1H, NH).

(3α,5β,7α,12α)-N-бензил-3,7,12-тригідрокси-N-метилстерол-24-амід {1c}. T<sub>пл</sub> = 130°C; <sup>1</sup>H-ЯМР, δ, м.д.: 0.55 (d, 3H, C-18), 0.80 (m, 4H, ), 0.95 (d, 3H, C-21), 1.29 (m, 10H), 1.70 (m, 5H), 1.92 (m, 1H), 2.25 (m, 4H), 2.77 (s, 1H), 3.17 (m, 1H), 3.60 (m, 1H, C-3), 3.75 (m, 1H, C-12), 4.00 (d, 1H, OH-7), 4.08 (m, 1H, OH-3), 4.18 (d, 2H, NCH<sub>2</sub>-), 4.30 (d, 1H, OH-12), 4.45 (s, 1H, OH-12), 7.07 - 7.48 (m, 5H, Ar), 8.22 (t, 1H, NH).

(3α,5β,7α,12α)-N-(4-фторбензил)-3,7,12-тригідроксистерол-24-амід {1d}. T<sub>пл</sub> = 238°C; <sup>1</sup>H-ЯМР, δ, м.д.: 0.57 (s, 3H, C-18(H<sub>3</sub>)), 0.82 (s, 3H, C-18(H<sub>3</sub>)), 0.93 (d, 3H, C-21(H<sub>3</sub>)), 1.29 (m, 12H), 1.68 (m, 6H), 2.12 (m, 6H), 3.20 (m, 1H), 3.60 (m, 1H, C-3), 3.77 (m, 5H, OH-3, 7, 12), 7.10 (m, 2H, Ar), 7.25 (m, 2H, Ar), 8.31 (t, 1H, NH).

(3α,5β,7α,12α)-N-(2,4-дифторфеніл)-3,7,12-тригідроксистерол-24-амід {1e}. T<sub>пл</sub> = 243°C; <sup>1</sup>H-ЯМР, δ, м.д.: 0.55 (s, 3H, C-18), 0.76 (s, 3H, C-19), 0.92 (d, 3H, C-21), 1.42 (m, 12H), 1.84 (m, 6H), 2.25 (m, 6H), 3.31 (m, 1H, C-3), 3.60 (m, 1H, C-7), 3.80 (m, 1H, C-12), 4.01 (s, 1H, OH-7), 4.12 (d, 1H, OH-3), 4.31 (d, 1H, OH-12), 7.03 (t, 1H, Ar), 7.28 (m, 1H, Ar), 7.76 (m, 1H, Ar), 9.67 (s, 1H, NH).

(3α,5β,7α,12α)-N-(2-метилбензил)-3,7,12-тригідроксистерол-24-амід {1f}. T<sub>пл</sub> = 152-154°C; <sup>1</sup>H-ЯМР, δ, м.д.: 0.58 (s, 3H, C-18(H<sub>3</sub>)), 0.82 (s, 3H, C-18(H<sub>3</sub>)), 0.93 (d, 3H, C-21(H<sub>3</sub>)), 1.29 (m, 12H), 1.68 (m, 6H), 2.12 (m, 6H), 3.20 (m, 1H), 3.60 (m, 1H, C-3), 3.77 (m, 5H, OH-3, 7, 12), 7.13 (m, 4H, Ar), 8.14 (t, 1H, NH).

(3α,5β,7α,12α)-3,7,12-тригідрокси-N-(4-метоксифеніл)стерол-24-амід {1g}. T<sub>пл</sub> = 231°C; <sup>1</sup>H-ЯМР, δ, м.д.: 0.58 (s, 3H, C-18), 0.80 (s, 3H, C-19), 0.99 (d, 3H, C-21), 1.32 (m, 12H), 1.75 (m, 6H), 1.98 (m, 1H), 2.21 (m, 4H), 3.61 (m, 1H, C-3), 3.69 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.80 (m, 1H, C-12), 4.00 (d, 1H, OH-7),

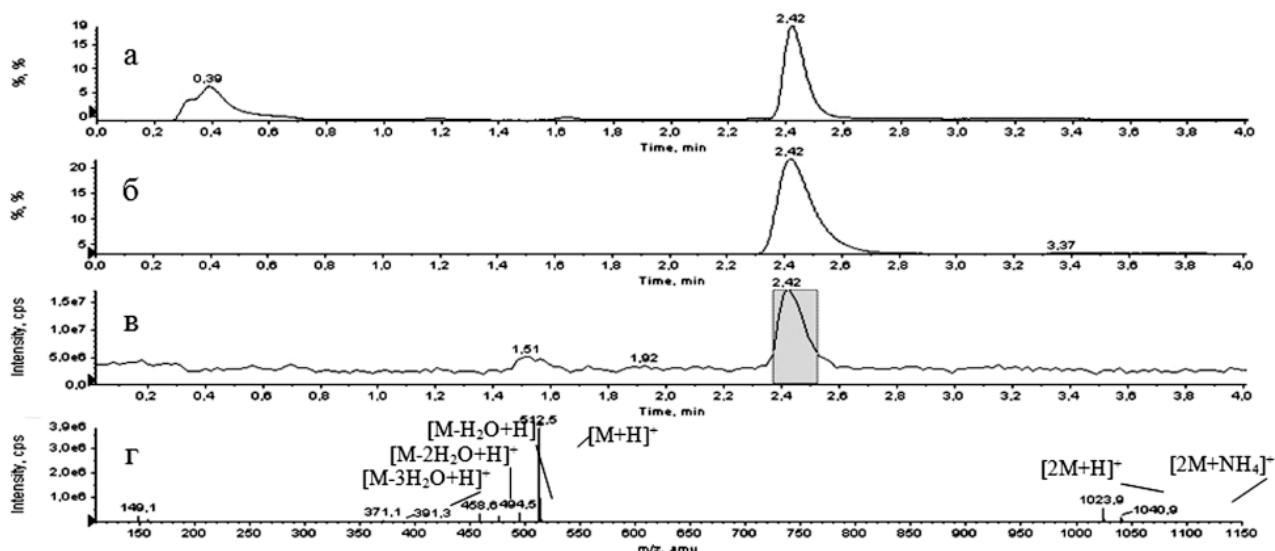


Рис. 4. Дані хроматомас-спектрометричного аналізу сполуки 1а.

4.07 (d, 1H, OH-3), 4.31 (d, 1H, OH-12), 6.82 (d, 2H, Ar), 7.46 (d, 2H, Ar), 9.69 (s, 1H, NH).

### ВИСНОВКИ

Розроблено методику препаративної хроматографічної очистки синтезованих амідів холевої кислоти методом ВЕРХ. Структуру сполук підтверджено даними <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопії та мас-спектрометрії, чистоту – хроматографічними методами.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Zhao Y. Tuning the sensitivity of a foldamer-based mercury sensor by its folding energy / Y. Zhao, Z. Zhong // Journal of the American Chemical Society. – 2006. – Vol. 128, №31. – P. 9988–9989.
2. HoShim J. Ion-selective electrodes based on molecular tweezer-type neutral carriers / J. HoShim, I.S. Jeong, M.H. Lee // Talanta. – 2004. – Vol. 63, №1. – P. 61–71.
3. Iuliano A. Effect of the presence of a free hydroxyl group on the enantiodiscrimination properties of cholic acid based CSPs bearing 2-naphthylcarbamate and 3,5-dinitrophenylcarbamate moieties in the HPLC resolution of racemic compounds / A. Iuliano, A. Ruffini // Tetrahedron: Asymmetry. – 2005. – Vol. 16, №23. – P. 3820–3828.
4. Oh S.W. Blending effects on adsorption and micellization of different membrane protein solubilizers. II. A thermodynamic study on a mixed system of CHAPS with a bile salt in pH 7.4 phosphate buffer solution / S.W. Oh, J.S. Na, J.S. Ko // Colloids and Surfaces B. Biointerfaces. – 2008. – Vol. 62, №1. – P. 112–124.
5. Narayanan S. CpG oligonucleotides with modified termini and nicked dumbbell structure show enhanced immunostimulatory activity / S. Narayanan, A.H. Dalpke, K. Siegmund // Journal of Medicinal Chemistry. – 2003. – Vol. 46, №23. – P. 5031–5044.
6. Jing B. Persulfated molecular umbrellas as anti-HIV and anti-HSV agents / B. Jing, V. Janout, B.C. Herold // Journal of the American Chemical Society. – 2004. – Vol. 126, №49. – P. 15930–15931.
7. Kobuke Y. Transmembrane ion channels constructed of cholic acid derivatives / Y. Kobuke, T. Nagatani // The Journal of Organic Chemistry. – 2001. – Vol. 66, № 15. – P. 5094–5101.
8. Гусаров В.І. Синтез амідів холевої кислоти на основі піперидину та піперазину / Гусаров В.І., Заремба О.В., Коваленко С.М. // Всеукраїнський конгрес «Сьогодення та майбутнє фармації»: Тези доповідей – Харків, 2008. – С. 44.
9. Гусаров В.І. Синтез амідів холевої кислоти / Гусаров В.І., Заремба О.В., Євсєєва Л.В. // Актуальні питання створення нових лікарських засобів: Мат. всеукраїнської науково-практичної конференції студентів та молодих вчених – Харків, 2008. – С. 8.
10. Schefer L. Resolving Self-Assembly of Bile Acids at the Molecular Length Scale / L. Schefer, A. Sánchez-Ferrer, J. Adamcik, R. Mezzenga // Langmuir. – 2012. – Vol. 28, №14. – P. 5999–6005.
11. Mano N. Ionization of unconjugated, glycine- and taurine-conjugated bile acids by electrospray ionization mass spectrometry / N. Mano, M. Mori, M. Ando // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2006. – Vol. 40, №5. – P. 1231–1234.

### 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. співробітник 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.

Поступила в редакцію 04.10.2012 г.