УДК 547.944:54.058:547.759.3

А.І. Бондар, С.М. Коваленко, О.В. Заремба

Аналіз похідних цис-(3s,16s)-ебурнаменін-14-карбонової кислоти методом високоефективної рідинної хроматографії

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: *індольні алкалоїди, ебурнани, аповінкамінова кислота, ВЕРХ, препаративна хроматографія.*

Розроблено методику аналізу естерів і амідів цис-(3S,16S)-ебурнаменін-14-карбонової кислоти методом високоефективної рідинної хроматографії. Отримані дані використано під час очистки синтезованих похідних методом препаративної високоефективної рідинної хроматографії. Структуру очищених сполук підтверджена даними ^{1}H ЯМР-спектроскопії та мас-спектрометрії.

Анализ производных цис-(3s,16s)-эбурнаменин-14-карбоновой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

А.И. Бондарь, С.Н. Коваленко, О.В. Заремба

Разработана методика анализа сложных эфиров и амидов цис-(3S,16S)-эбурнаменин-14-карбоновой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Полученные данные использованы в процессе очистки синтезированных производных методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Структура очищенных соединений подтверждена данными ^{1}H ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Ключевые слова: *индольные алкалоиды, эбурнаны, аповинкаминовая кислота, ВЭЖХ, препаративная хроматография.*

Analysis of derivatives cis-(3s, 16s)-eburnamenn-14-carboxylic acid by high performance liquid chromatography

A.I. Bondar, S.M. Kovalenko, O.V. Zaremba

The high-performance liquid chromatography method for analysis of cis-(3S,16S)-eburnamenine-14-carboxylic acid esters and amides was developed. The data obtained were used for preparative high-performance liquid chromatography purification of synthesized derivatives. The structure of purified compounds was confirmed by ^{1}H NMR spectroscopy and mass spectrometry.

Key words: *indole alkaloids, eburnanes, apovincaminic acid, HPLC, preparative chromatography*.

Одним із основних методів пошуку нових біологічно активних речовин є синтез аналогів відомих природних агоністів, що перевершують свої прототипи за ефективністю та безпечністю. Прикладом такого підходу до створення лікарських засобів є препарат вазорегулюючої дії вінпоцетин, який синтезовано на основі вінкаміну, алкалоїду барвінка малого [1–3]. Вінпоцетин покращує мозковий кровообіг, характеризується нейропротекторною ноотропною, антигіпоксичною, антиоксидантною дією та широко застосовується для лікування цереброваскулярних порушень [1,3–6]. Основним продуктом метаболізму вінкаміну та вінпоцетину є аповінкамінова кислота (цис-(3S,16S)-ебурнаменін-14-карбонова кислота) [7]. Завдяки наявності вільної карбоксильної групи аповінкамінова кислота є перспективною сполукою для синтезу похідних різних хімічних класів. Встановлено, що синтетичні похідні цис- і транс-(3S,16S)-ебурнаменін-14-карбонової кислоти проявляють різноманітні види активності, впливаючи на тонус судин, кровообіг, метаболічні процеси [1,8–10].

Мета роботи

Для дослідження біологічної активності похідних аповінкамінової кислоти синтезовано алкіл цис-(3S,16S)-ебурнаменин-14-карбоксилати **1.1-1.2** та цис-(3S,16S)-ебурнаменін-14-карбоксаміди **2.1-2.9** (*рис. 1*) за методиками, описаними раніше [11,12]. Синтезовані сполуки містили домішки. Для визначення можливих домішок та очистки отриманих похідних розроблено методику аналізу та препаративної очистки амідів та естерів цис-(3S,16S)-ебурнаменін-14-карбонової кислоти.

Матеріали і методи дослідження

Супутні домішки визначали методом ВЕРХ на хроматографі Varian ProStar у наступній комплектації: 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 – ацетонітрил. Рухома фаза – вода : ацетонітрил : трифтороцтова кислота (50:50:0,1). Режим елюювання ізократичний. Швидкість подання рухомої фази – 1 мл/хв. Час аналізу – від 15 до 25 хв. Довжина хвилі детектування – 270 нм.

Препаративне виділення проводили на хроматографі Varian ProStar у наступній комплектації: градієнтна система високого тиску ProStar 210; спектрофотометричний детектор ProStar 325; вузол ручного вводу з об'ємом дозуючої петлі 1 мл. Колонка – Діасорб-130-C16T (250×15 мм, 7 мкм). Концентрація розчинів для аналізу – приблизно 50 мг/мл, розчинник – 90% ацетонітрил. Рухома фаза – вода : ацетонітрил : трифтороцтова кислота (50:50:0,1). Режим елюювання ізократичний. Швидкість подання рухомої фази – 4,5 мл/хв. Час аналізу – від 20 до 35 хв. Довжина хвилі детектування – 330 нм. Інжекція – еквівалент 25 мг суміші для розділення.

Мас-спектр 4-метоксифеніламіду аповінкамінової кислоти (**2.4**) отримували за допомогою хромато-мас-спектрометричної системи, що складалась з хроматографа Shimadzu LC-10A з автосамплером Gilson 215 (об'єм петлі 5,0 мкл), мас-спектрометра PE Sciex API 165, детектора світлорозсіяння Sedex 75. Колонка Synergy Hydro-RP, 20×2,0 мм, 2,5 мкм. Для аналізу ви-

© А.І. Бондар, С.М. Коваленко, О.В. Заремба, 2013

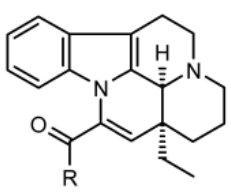
користовували розчин аміду **2.4** концентрацією 1 мг/мл в диметилсульфоксиді. Рухомі фази: А – вода : форміат амонію (100:0,05), В – ацетонітрил : форміат аммонію (100:0,05). Градієнт елюювання: 0,00 хв – 5% В; 0,01–2,90 хв – 5% → 95% В; 2,90–3,50 хв – 95% В; 3,50–3,80 хв – 95% → 5% В; 3,80–4,00 хв – 5% В. Швидкість подання рухомої фази – 0,50 мл/хв. Метод іонізації – електророзпилення в позитивному режимі. Довжина хвилі детектування – 254 нм.

Спектри ^{1}H ЯМР отримані на спектрометрі Varian Mercury VX-200 (робоча частота 200 MHz) в ДМСО-d_6, внутрішній стандарт – тетраметилсилан (ТМС), хімічні зсуви наведено в шкалі δ (м.ч.).

Результати та їх обговорення

Алкіл цис-(3S,16S)-ебурнаменін-14-карбоксилати **1.1-1.2** (*рис. 1*) отримували додаванням відповідного алкілхлориду до аповінкамінової кислоти в середовищі диметилформаміду. Цис-(3S,16S)-ебурнаменін-14-карбоксаміди **2.1-2.9** (*рис. 1*) отримували реакцією хлорангідриду аповінкамінової кислоти з відповідним аміном в діоксані [11,12].

Аналіз складу домішок і добір умов хроматографування проводили на аналітичному хроматографі за умов, описаних вище. За необхідності для кращого розділення суміші корегували вміст ацетонітрилу в рухомій фазі у межах ±7,5%. Встановлено, що отримані сполуки переважно містили домішки вихідних алкілгалогенідів або



Сполука	R
1.1	3-(CF_3)-Ph-NH(C=O)CH_2-O
1.2	4-allil-Bn-O
2.1	3-Cl-Bn-NH
2.2	2-MeO-Ph-NH
2.3	4-(COOEt)-Ph-NH
2.4	4-MeO-Ph-NH
2.5	N-(2-MeO-Ph)-piperazine
2.6	4-(NH_2(C=O))-piperidine
2.7	piperidine
2.8	4-Me-Ph-NH
2.9	3,5-di-MeO-Ph-NH

Рис. 1. Синтезовані похідні аповінкамінової кислоти.

амінів (*рис. 2*, на прикладі сполук **1.1** та **2.4**). Ідентифікацію домішок проводили зіставленням максимумів поглинання речовин, що утворюють піки на хроматограмах (при детектуванні), і максимумів поглинання використаних у синтезі вихідних сполук.

Часи утримування синтезованих сполук складали: **1.1** – 9,6 хв; **1.2** – 12,3 хв; **2.1** – 16,3 хв; **2.2** – 8,2 хв; **2.3** – 7,4 хв; **2.4** – 10,2 хв; **2.5** – 4,1 хв; **2.6** – 3,8 хв; **2.7** – 3,7 хв; **2.8** – 8,7 хв; **2.9** – 9,6 хв.

Для запобігання надмірної інтенсивності піку цільової сполуки на хроматограмі препаративне розділення здійснювали за довжини хвилі 330 нм. Цільові фракції

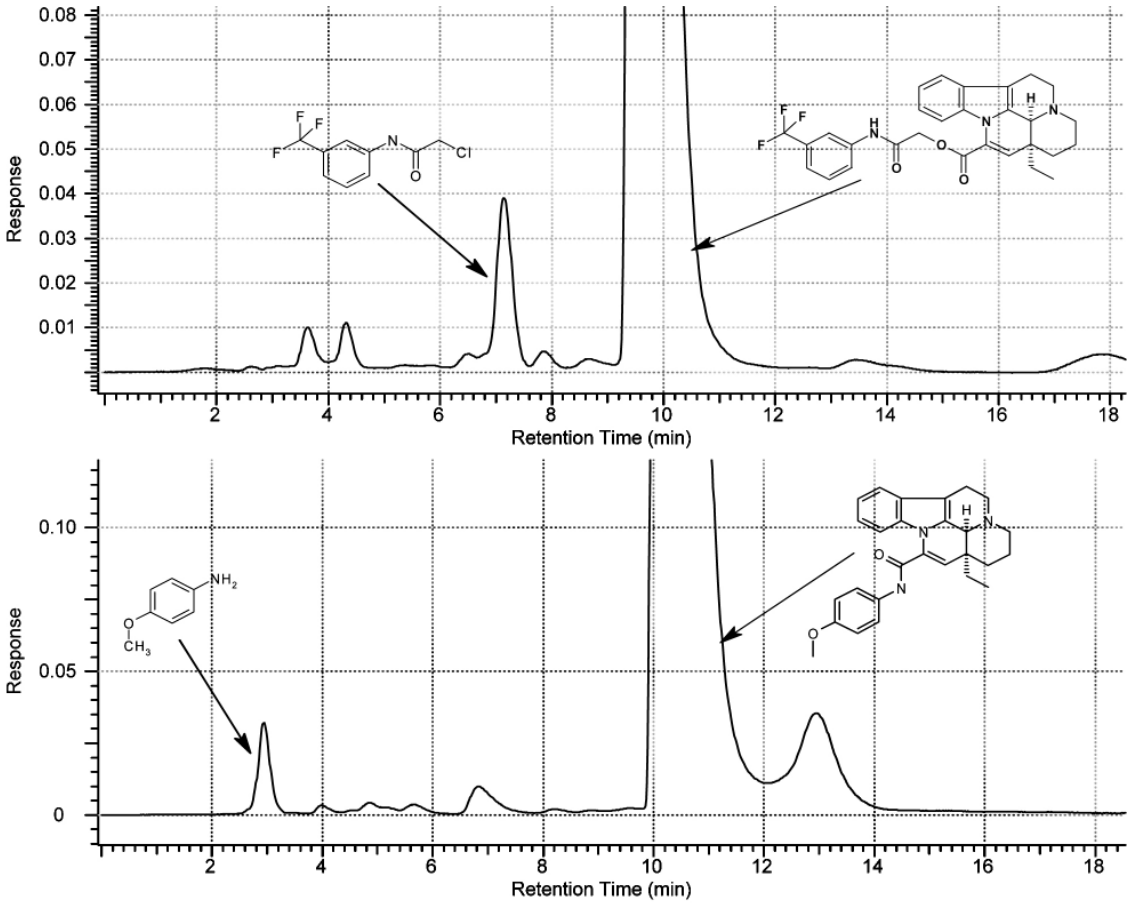


Рис. 2. Масштабовані хроматограми сполук **1.1** (верхня) і **2.4** (нижня).

збирали вручну. Інтервали часу збору фракції для речовин складали: **1.1** – 19,3–21,8 хв; **1.2** – 18,4–20,9 хв; **2.1** – 23,4–25,7 хв; **2.2** – 15,6–17,7 хв; **2.3** – 13,1–15,5 хв; **2.4** – 19,7–22,2 хв; **2.5** – 7,6–8,6 хв; **2.6** – 5,8–7,1 хв; **2.7** – 6,9–8,1 хв; **2.8** – 16,4–19,2 хв; **2.9** – 14,1–16,2 хв. Зібрані цільові фракції об'єднували та концентрували до густої маси на роторному випарнику при 40–50°С та залишковому тиску близько 10^{-2} атм. Отриманий залишок розчиняли в 1–3 мл метанолу та перекристалізовували додаванням 10 мл 5% розчину натрію карбонату. Осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою і висушували.

Для підтвердження структури та чистоти отриманих сполук використовували дані ^{1}Н ЯМР-спектроскопії. У спектрах ^{1}Н ЯМР похідних аповінкамінової кислоти спостерігається характеристичний сигнал протона 3-Н при 4,15 м.ч. у вигляді синглету. Сигнали протонів аліфатичної частини ебурнанового циклу у вигляді груп мультиплетів знаходяться в інтервалі 1–3,6 м.ч. Сигнали протонів ароматичного циклу 9-, 10-, 11-, 12-Н знаходяться в інтервалі 6,9–7,6 м.ч.

Для додаткового підтвердження структури та індивідуальності сполуки **2.4** проведено її аналіз методом рідинної хроматографії-мас-спектрометрії. Мас-спектр досліджуваної сполуки характеризується наявністю молекулярного іону $[M+H]^+$ та іону $[M+NH_3]^+$. У зазначених умовах час утримування 4-метоксифеніламіду аповінкамінової кислоти **2.4** становив 1,55 хв. На хроматограмах, отриманих з мас-спектрометричного детектора (*рис. 3а*), спектрофотометричного детектора (*рис. 3в*), детектора світлорозсіяння (*рис. 3г*) спостерігається лише один пік (за винятком піку розчинника на 0,32 хв). Отримані дані свідчать про високий ступінь чистоти сполуки **2.4**.

^{1}Н ЯМР спектри сполук **1.1-2.9** δ, м.ч.:

2-{[3-(трифторметил)феніл]аміно}-2-оксоетил (3S,16S)-ебурнаменін-14-карбоксилат (1.1): 0,95 т (3Н, CH_3), 1,2-1,55 м (4Н, $2CH_2$), 1,8 м (2Н, CH_2), 2,3-2,5 м (2Н, CH_2), 2,8-2,95 м (2Н, CH_2), 3,1 м (2Н, CH_2), 4,15 с (1Н, 3-СН), 5,0 с (2Н, OCH_2), 6,3 с (1Н, СН), 7,0-7,5 м (8Н, Ar), 10,6 с (1Н, NH);

4-вінілбензил (3S,16S)-ебурнаменін-14-карбоксилат (1.2): 0,95 т (3Н, CH_3), 1,2-1,55 м (4Н, $2CH_2$), 1,8 м (2Н, CH_2), 2,3-2,5 м (2Н, CH_2), 2,8-2,95 м (2Н, CH_2), 3,1 м (2Н, CH_2), 4,15 с (1Н, 3-СН), 5,25 д (1Н, СН), 5,4 с (2Н,

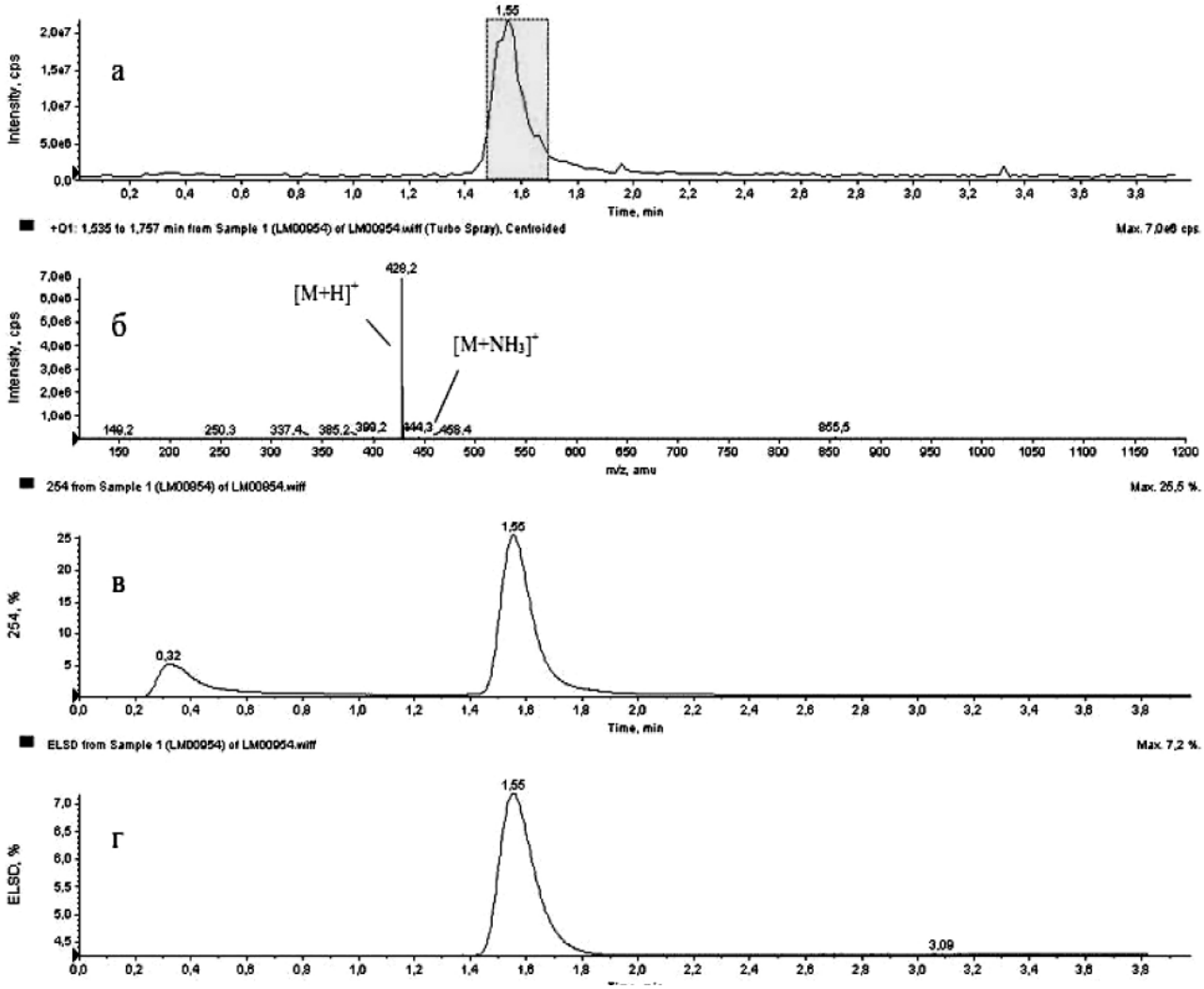


Рис. 3. Хроматограми та дані мас-спектрометричного аналізу сполуки **2.4**.

OCH_2), 5,85 д (1H, CH_2), 6,1 с (1H, CH), 6,75 кв (1H, CH_2), 7,0-7,5 м (8H, Ar);

(3S,16S)-N-(3-хлорбензил)ебурнаменін-14-карбоксамід (2.1): 0,95 т (3H, CH_3), 1,2-1,55 м (4H, $2CH_2$), 1,8 м (2H, CH_2), 2,3-2,5 м (2H, CH_2), 2,8-2,95 м (2H, CH_2), 3,1 м (2H, CH_2), 4,0 с (1H, 3-CH), 4,35-4,5 м (2H, CH_2), 5,5 с (1H, CH), 7,0-7,5 м (8H, Ar), 9,2 т (1H, NH);

(3S,16S)-N-(2-метоксифеніл)ебурнаменін-14-карбоксамід (2.2): 0,95 т (3H, CH_3), 1,2-1,55 м (4H, $2CH_2$), 1,8 м (2H, CH_2), 2,3-2,5 м (2H, CH_2), 2,8-2,95 м (2H, CH_2), 3,1 м (2H, CH_2), 3,8 с (3H, OCH_3), 4,15 с (1H, 3-CH), 5,7 с (1H, CH), 7,0-7,5 м (8H, Ar), 9,7 с (1H, NH);

Етил 4-{[(3S,16S)-ебурнаменін-14-ілкарбоніл]аміно} бензоат (2.3): 0,95 т (3H, CH_3), 1,2-1,3 т (3H, CH_3), 1,3-1,55 м (4H, $2CH_2$), 1,8 м (2H, CH_2), 2,3-2,5 м (2H, CH_2), 2,8-2,95 м (2H, CH_2), 3,1 м (2H, CH_2), 4,05 с (1H, 3-CH), 4,3 кв (2H, OCH_2), 5,7 с (1H, CH), 7,0-7,5 м (4H, Ar), 7,8-8,0 м (4H, Ar), 10,8 с (1H, NH);

(3S,16S)-N-(4-метоксифеніл)ебурнаменін-14-карбоксамід (2.4): 0,95 т (3H, CH_3), 1,2-1,55 м (4H, $2CH_2$), 1,8 м (2H, CH_2), 2,3-2,5 м (2H, CH_2), 2,8-2,95 м (2H, CH_2), 3,1 м (2H, CH_2), 3,7 с (3H, OCH_3), 4,05 с (1H, 3-CH), 5,65 с (1H, CH), 7,0-7,6 м (8H, Ar), 10,4 с (1H, NH);

(3S,16S)-14-{[4-(2-метоксифеніл)піперазин-1-іл]карбоніл}ебурнаменін (2.5): 0,95 т (3H, CH_3), 1,2-1,55 м (4H, $2CH_2$), 1,8 м (2H, CH_2), 2,2-2,3 м (2H, CH_2), 2,5-2,6 м (2H, CH_2), 2,6-2,7 м (2H, CH_2), 2,8-3,2 м (4H, CH_2), 3,4-3,55 м (2H, CH_2), 3,6-3,7 м (2H, CH_2), 3,75 м (3H, OCH_3), 4,15 с (1H, 3-CH), 5,3 с (1H, CH), 6,7-7,5 м (8H, Ar);

1-[(3S,16S)-ебурнаменін-14-ілкарбоніл]піперидин-4-карбоксамід (2.6): 0,95 т (3H, CH_3), 1,2-1,5 м (4H, $2CH_2$), 1,6-1,9 м (4H, CH_2), 2,2-2,3 м (2H, CH_2), 2,5-2,6 м (2H, CH_2), 2,8-2,9 м (2H, CH_2), 2,95 м (1H, CH), 3,1 м (2H, CH_2), 3,35 м (1H, CH), 3,55 м (1H, CH), 3,9 м (1H, CH), 4,15 с (1H, 3-CH), 4,5 м (1H, CH), 5,15 с (1H, CH), 6,75 с (1H, NH_2),7,0-7,2 м (3H, Ar), 7,25 с (1H, NH_2), 7,4 м (1H, Ar);

(3S,16S)-14-(піперидин-1-ілкарбоніл)ебурнаменін (2.7): 0,95 т (3H, CH_3), 1,2-1,55 м (4H, $2CH_2$), 1,6 м (2H, CH_2), 1,8 м (2H, CH_2), 1,9 м (2H, CH_2), 2,3-2,5 м (2H, CH_2), 2,6 м (2H, CH_2), 2,8-2,95 м (2H, CH_2), 3,1 м (2H, CH_2), 3,6 м (4H, CH_2), 4,15 с (1H, 3-CH), 5,15 с (1H, CH), 7,0-7,5 м (4H, Ar);

(3S,16S)-N-(4-метилфеніл)ебурнаменін-14-карбоксамід (2.8): 0,95 т (3H, CH_3), 1,2-1,55 м (4H, $2CH_2$), 1,8 м (2H, CH_2), 2,2 с (3H, CH_3), 2,3-2,5 м (2H, CH_2), 2,8-2,95 м (2H, CH_2), 3,1 м (2H, CH_2), 4,1 с (1H, 3-CH), 5,7 с (1H, CH), 7,0-7,5 м (8H, Ar), 10,4 с (1H, NH);

(3S,16S)-N-(3,5-диметоксифеніл)ебурнаменін-14-карбоксамід (2.9): 0,95 т (3H, CH_3), 1,2-1,55 м (4H, $2CH_2$), 1,8 м (2H, CH_2), 2,3-2,5 м (2H, CH_2), 2,8-2,95 м (2H, CH_2), 3,1 м (2H, CH_2), 3,7 с (6H, OCH_3), 4,15 с (1H, 3-CH), 5,65 с (1H, CH), 6,3 с (1H, Ar), 7,0 с (2H, Ar), 7,2-7,6 м (4H, Ar), 10,5 с (1H, NH);

Висновки

Розроблено методику аналізу похідних цис-(3S,16S)-ебурнаменін-14-карбонової кислоти методом ВЕРХ. 11 синтезованих похідних очищено методом препаративної ВЕРХ. Структуру очищених сполук підтверджено даними ^{1}H ЯМР-спектроскопії та мас-спектрометрії.

Список літератури

1. *Adam Vas.* Eburnamine derivatives and the brain / Vas Adam, Balazs Gulyas // Medicinal Research Reviews. – 2005. – V. 25, №6. – P. 737–757.
2. Analogue-based Drug Discovery II / [Edited by Janos Fischer and C. Robin Ganellin]. – WILEY-VCH, 2010. – 538 p.
3. *Jha M.K.* Vinpocetine: a smart drug and a smart nutrient: a review / M.K. Jha, M.H. Rahman, Hasib Sheikh // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2012. – V. 3, №2. – P. 346–352.
4. *Касаткин Д.С.* Полимодальность эффектов препарата кавинтон: экспериментальные и клинические доказательства / Д.С. Касаткин // Ліки України. – 2010. – №9 (145). – С. 70–73.
5. Role of vinpocetine in cerebrovascular diseases / Sazal Patyar, Ajay Prakash, Manish Modi [et al.] // Pharmacologycal Reports. – 2011. – V. 63. – P. 618–628.
6. Effects of vinpocetine on the redistribution of cerebral blood flow and glucose metabolism in chronic ischemic stroke patients: a PET study / Geza Szilagyia, Zoltan Nagya, Laszlo Balkay [et al.] // Journal of the Neurological Sciences. – 2005. – V. 229–230. – P. 275–284.
7. *Vlase L.* New HPLC–MS method for quantitative determination of apovincaminic acid in human plasma / L. Vlase, S. Imre, S. Leucuta // J. Sep. Sci. – 2006. – V. 29. – P. 385–389.
8. Synthesis and antioxidant activity of novel vinpocetine-vitamin C conjugate / Sheng Huaming, Ye Tingjun, Zheng Jinhong [et al.] // Yaoxue Jinzhan. – 2011. – V. 35 (4). – P. 169–173.
9. Nitrooxy alkyl apovincaminate activates K+ currents in rat neocortical neurons / M. Munakata, K. Noguchi, H. Araki [et. al.] // Jpn. J. Pharmacol. – 2001. – V. 85. – P. 124–132.
10. Synthesis and Evaluation of 2′-Hydroxyethyl trans-Apovincaminate Derivatives as Antioxidant and Cognitive Enhancer Agents / Andras Nemes, Laszlo Czibula, Csaba Szantay [et al.] // J. Med. Chem. – 2008. – Vol. 51, №3. – P. 479–486.
11. *Бондар А.І.* Одержання похідних (3α, 16α)-ебурнаменин-14-карбонової кислоти / А.І. Бондар, проф. С.М. Коваленко, доц. Ю.І. Губін, О.В. Заремба // Актуальні питання створення нових лікарських засобів: мат. Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів та молодих вчених, м. Харків, 20–21 квітня 2012 р. – Х.: НФаУ, 2012. – С. 8–9.
12. *Бондар А.І.* Синтез цис-(3S,16S)-аповінкамін-14-ациламідів / А.І. Бондар, С.М. Коваленко, О.В. Заремба // Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини: Мат. міжнародної науково-практичної конференції. – Львів, 2012. – С. 69.

Відомості про авторів:

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

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

Заремба О.В., м. н. с. каф. органічної хімії НФаУ.

Надійшла в редакцію 20.11.2012 р.