

Н. Л. Заярнюк¹, К. Міцкевічене², Р. І. Вільданова³, О. В. Федорова¹,
М. В. Стасевич¹, Ю. О. Ткаченко¹, Т. Й. Дуда¹

¹Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології,

²Каунаський технологічний університет,
кафедра фізичної та неорганічної хімії (Литва),

³Відділення фізико-хімії горючих копалин
Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка НАН України

РОЗЧИНЕННЯ НОВИХ ПОХІДНИХ ОКСАЗОЛІВ І ТІОФЕНІВ В УЛЬТРАМІКРОГЕТЕРОГЕННИХ ОРГАНІЗОВАНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

© Заярнюк Н. Л., Міцкевічене К., Вільданова Р.І., Федорова О. В.,
Стасевич М. В., Ткаченко Ю. О., Дуда Т. Й., 2015

Одержано та досліджено нові водорозчинні форми сірковмісних та азотовмісних гетероциклічних сполук в ультрамікрогенних організованих середовищах. Об'єктами дослідження вибрано нові похідні оксазолів та тіофенів. Як допоміжні речовини застосовано відомі дозволені до застосування у фармації полімери: декстран, полівінілпіролідон, полівініловий спирт; а також поверхнево активні речовини бактеріального походження: рамноліпіди і поверхнево активний рамноліпідний біокомплекс. Підтверджено фізико-хімічними дослідженнями наявність вихідних сполук у мікропсевдофазі. Розпочато дослідження біологічних та фармакологічних властивостей одержаних форм.

Ключові слова: тіофени, оксазоли, міцели, солюбілізація, псевдомікрофаза, поверхнево активні речовини, біологічно активні сполуки

Water-soluble forms of sulfur and nitrogen-containing heterocyclic compounds in ultramicroheterogeneous organized mediums are obtained and investigated. New synthesized derivatives of oxazoles and thiophene were the objects of our study. Dextran, polyvinylpyrrolidone, polyvinyl alcohol, which are polymers, well-known and used in pharmacy as an adjuvant, and surface-active agents of bacterial origin: rhamnolipids and surface-active biocomplexes of rhamnolipids are used as additional ingredients. The presence of parent compounds in pseudomicrophase is confirmed by physical and chemical study. The research of biological and pharmacological properties of the resulting shapes was started.

Key words: thiophene, oxazole, micelles, solubilization, pseudomicrophase, surface-active agents, bioactive compounds

Постановка проблеми і її зв'язок з важливими науковими завданнями. Створення ліків на основі нових перспективних біологічно активних сполук (БАС) – актуальний напрямок сучасної фармації. Одним із завдань такого розроблення є вибір лікарської форми – відповідного середовища для цілеспрямованої дії на фізіологічну систему пацієнта. Водні розчини БАС є спорідненими з біологічними рідинами організму, забезпечують біодоступність ліків, сприяють їх біотрансформації та екскреції. Такі лікарські форми є зручними у застосуванні та економічно вигідними. Проте в

багатьох випадках БАС за своїми фізико-хімічними властивостями не є водорозчинними речовинами, лікарські засоби на їх основі потребують особливих методів виготовлення та застосування допоміжних речовин. Водночас дифільні органічні молекули мають здатність до самоорганізації з утворенням агрегатів молекул або йонів, що дало змогу одержати новий тип розчинників – ультрамікрогетерогенні організовані, зазвичай водні, середовища, які здатні розчиняти нерозчинні у водній фазі речовини [1]. Принципова відмінність мікрогетерогенних організованих середовищ від звичних гомогенних розчинів полягає в тому, що визначальну роль в них відіграє локальний ефект, пов'язаний з розчиненням гідрофільних і гідрофобних молекул у межах міцелярної системи або супрамолекулярного комплексу, що не викликає змін у всьому розчині [1]. Цікавим є створення водорозчинних форм на основі нових фізіологічно активних похідних тіофенів та оксазолів.

Аналіз попередніх досліджень і публікацій. Сірковмісні та азотовмісні гетероциклічні сполуки є важливим класом речовин у фармацевтичній хімії. П'ятичленні гетероциклічні ядра беруть активну участь у біохімічних перетвореннях в організмі, синтезі деяких амінокислот і пептидів, вітамінів, антиоксидантів. Тофени та їхні похідні проявляють різні види біологічної активності, такі як бактерицидна, фунгіцидна, протизапальна, антигіпертензивна, анти-ВІЧ, протипухлинна та інші. Тіофенові цикли є невід'ємними частинами молекул всіх існуючих пеніцилінів. Оксазоли та їх похідні мають бактерицидну, фунгіцидну, протитуберкульозну та протипухлинну активності. Синтетичні сірковмісні та азотовмісні гетероциклічні сполуки та їх похідні порівняно із природними часто володіють більшою біологічною активністю [2–6]. Об'єктами нашого дослідження ми вибрали синтезовані на кафедрі органічної хімії Каунаського технологічного університету (Каунас, Литва) оксазоли: 3-((4,9-діоксо-4,9-дигідронафто [2,3-d] оксазол-2-іл)(феніл) аміно) пропанову кислоту (КМ31); 3-((4,9-діоксо-4,9-дигідронафто [2,3-d]-2-іл) (4-етоксифеніл) аміно) пропанову кислоту (КМ53); 3-((4,9-діоксо-дигідронафто [2,3-d] оксазол-2-іл)(феніл) аміно)-2-метилпропанову кислоту (КМ50); 3-((4,9-діоксо-дигідронафто [2,3-d] оксазол-2-іл)(р-толуол) аміно) пропанову кислоту (КМ49); та тіофени: 3-((5-((5-бромотіофен-2-іл) метилен)-4-оксо-4,5-дигідротіазол-2-іл)(3-хлоро-4-метилфеніл) аміно) пропанову кислоту (КМ56); 3-((3-хлоро-4-метилфеніл)(5-(фуран-2-іл) метилен)-4-оксо-4,5-дигідротіазол-2-іл) аміно) пропанову кислоту (КМ63); 3-((5-бензиліден-4-оксо-4,5-дигідротіазол-2-іл)(3-хлоро-4-метилфеніл) аміно) пропанову кислоту (КМ64); 3-((3-хлоро-4-метилфеніл)(5-(4-нітробензиліден)-4-оксо-4,5-дигідротіазол-2-іл) аміно) пропанову кислоту (КМ61). Перспективність застосування цих сполук у фармації показала перевірка їх біологічної активності *in silico* та *in vitro* [7]. Суттєвим недоліком цих сполук є нерозчинність їх у воді та ускладнене розчинення в органічних розчинниках, що перешкоджає одержанню зручних лікарських форм. Для покращення розчинності таких речовин, транспорту їх в організмі, приготування мазей, гелів та інших ЛФ використовують організовані середовища.

Ультрамікрогетерогенні організовані середовища – оптично ізотропні розчини, в яких в основному об'ємі розчинника присутні нанорозмірні системи, здатні формувати власну мікропсевдофазу. Такі середовища містять міцелярні системи або молекули-рецептори, які утворюють жорсткі тривимірні порожнини [1]. Основними властивостями міцелярних організованих середовищ є здатність розчиняти нерозчинні субстанції, концентрувати у мікрофазі різні за гідрофобністю речовини за рахунок багатофункціональних міжмолекулярних взаємодій. Значна мікрогетерогенність середовища всередині мікропсевдофази виражається у зміні в'язкості, кислотності, діелектричної проникності та інших фізико-хімічних властивостей середовища. Прикладами міцелярних та споріднених їм систем є емульсії (олія/вода, вода/олія) та напівколоїдні розчини [1].

Метою нашої роботи було одержання водорозчинних форм на основі нових біологічно активних похідних тіофенів та оксазолів із збереженням їх активності в ультрамікрогетерогенних організованих середовищах.

Експериментальна частина. Вивчення властивостей сполук КМ31, КМ49, КМ50, КМ53, КМ56, КМ61, КМ63, КМ64 дало змогу вибрати для їх розчинення етилацетат та хлороформ. Це дало можливість методом переведення не водорозчинних БАС у водну фазу вибрати солюбілізацію – мимовільний їх перехід через проникнення всередину міцел поверхнево активної речовини (ПАР) або макромолекулярних клубків полімеру.

Як допоміжні речовини ми використовували відомі дозволені до застосування у фармації полімери: декстран з молекулярною масою 40 000, N-полівінілпіролідон (N-ПВП) з молекулярною масою 10 000, полівініловий спирт (ПВС) з молекулярною масою 30 000, а також ПАР бактеріального походження, одержані за оригінальними методиками у лабораторії Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка НАН України. В роботі застосовували рамноліпіди (РЛ), отримані екстракцією з супернатанту культуральної рідини (СКР) штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 сумішшю Фолча, і поверхнево активний рамноліпідний біокомплекс (БК) (суміш рамноліпідів з полісахаридами), який виділяли з СКР підкисленням 10 % розчином соляної кислоти до рН 3,0 [8,9]. Декстран, ПВС та N-ПВП є водорозчинними полімерами. Декстран традиційно застосовують як полімер-носії БАС. ПВС є здатною до утворення міцелоподібних структур ПАР. N-ПВП має високу комплексоутворювальну здатність. Ці речовини широко використовуються у фармації, зокрема для покращення розчинності БАС та збільшення біодоступності [10]. РЛ та БК мають надзвичайно високу поверхневу активність, критична концентрація міцелоутворення (ККМ) для них становить приблизно $0,06 \cdot 10^{-6}$ г/мл.

Умови проведення солюбілізації вибирали так, щоб отримана сполука зберігала біологічну активність, що підтверджувалось би результатами мікробіологічних досліджень. Для цього враховували рН середовища. Полімер розчиняли у нейтральному середовищі: воді або фізіологічному розчині; хоча стабільність полімерних комплексів краща у кислому середовищі. Після проведення попередніх досліджень для розчинення БАС вибрали такі розчинники: для КМ31, КМ49, КМ50, КМ53, КМ63 – етилацетат та хлороформ, КМ56, КМ61, КМ64- хлороформ. Концентрація БАС в органічному розчиннику становила 0,1 г/мл. Працювали з розчинами декстрану, ПВС та N-ПВП з концентраціями від 0,001 г/мл до 0,1 г/мл. Робочі концентрації РЛ та БК становили від $0,001 \cdot 10^{-6}$ до $0,1 \cdot 10^{-6}$ г/мл.

Результати попередніх досліджень солюбілізації свідчили, що кількість БАС у водній фазі прямо залежить від концентрації її у вихідному розчині в органічному розчиннику, а також збільшується пропорційно до концентрації ПАР і не залежить від об'єму водної фази. Тому при проведенні експерименту ми брали однакові об'єми водного середовища та вихідного розчину БАС. Солюбілізація відбувалась при кімнатній температурі та постійному струшуванні протягом 1 год на приладі WU-4. Розділювали водну та органічну фази відстоюванням.

Оскільки розчини досліджуваних похідних тіофенів та оксазолів мають яскраве забарвлення, перехід речовини у водну фазу спостерігали візуально. З метою підтвердження наявності БАР у ядрі полімерної глобули було проведено фізико-хімічні дослідження: вимірювання поверхневого натягу, зняття УФ-спектрів; кількісне визначення БАР у солюбілізатах. Вимірювання поверхневого натягу проводили методом відриву кільця на тензіометрі K6KRUSS GMBH. УФ-дослідження солюбілізатів проводили на приладі SPECORD M-40 при довжинах хвиль 280–340 нм для УФ області та 430–450 нм для видимої області.

Результати та обговорення. Результати спостережень, наведені в табл. 1, дають можливість стверджувати про наявність БАС у водному середовищі. Чітка межа розділу фаз спостерігалась при концентраціях ПАР, не нижчих за ККМ.

Результати спостережень переходу біологічно активних сполук у водне середовище

№ з/п	Водний розчин ПАР, концентрація (г/мл)	Декстран 0,1	НПВП 0,1	ПВС 0,1	РЛ 0,1·10 ⁻³	БК 0,1·10 ⁻³
	Вихідний розчин БАС, розчинник, концентрація (г/мл)					
	оксазоли					
1	КМ 31 (0,1 г/мл, хлороформ)	-	-	-	-	+ / -
2	КМ 31 (0,1 г/мл, етилацетат)	-	-	-	-	+
3	КМ 49 (0,1 г/мл, хлороформ)	-	+	+	+	+
4	КМ 49 (0,1 г/мл, етилацетат)	+ / -	+	+	+	+
5	КМ 50 (0,1 г/мл, хлороформ)	+	+	+	+	+
6	КМ 50 (0,1 г/мл, етилацетат)	+	+	+	+	+
7	КМ 53 (0,1 г/мл, хлороформ)	-	+	+	+	+
8	КМ 53 (0,1 г/мл, етилацетат)	-	+	+	+	+
	тіофени					
9	КМ 56 0,1 г/мл, хлороформ)	-	-	+	+	+
10	КМ 61 (0,1 г/мл, хлороформ)	+ / -	+	+	+	+
11	КМ 63 (0,1 г/мл, хлороформ)	-	+	+	+	-
12	КМ 64 (0,1 г/мл, хлороформ)	-	-	-	-	-

- солюбілізація не відбулась

± відбувся незначний перехід БАС у водну фазу

+ солюбілізація відбулась

Утворились напівколоїдні розчини, про що свідчить розсіювання світла (наприклад, при переході у водне середовище КМ61) та прозорі розчини, які містять нанорозмірну псевдомікрофазу (наприклад, при переході у водне середовище КМ50).

Солюбілізація БАС з вихідного розчину в етилацетаті відбувається дещо краще, очевидно, через те, що етилацетат частково у дуже малій кількості розчинний у воді (0,006 %).

Результати УФ-спектроскопії, які наведено на рис.1 та 2, підтверджують наявність БАС у водному середовищі та пряму залежність кількості солюбілізованої речовини від її концентрації у вихідному розчині.

Максимум поглинання у вихідному розчині у хлороформі речовини КМ61 спостерігається при 360,0 нм, після солюбілізації у водному середовищі із додаванням БК максимум поглинання спостерігався при 364,7 нм. Батохромний зсув максимуму поглинання на 4,7 нм можна пояснити утворенням речовиною КМ61 нековалентних зв'язків з БК. Максимум поглинання для речовини КМ50, який спостерігається у вихідному розчині в етилацетаті при 333,8 нм, зберігався у солюбілізатах із незначним зсувом, пов'язаним зі зміною середовища.

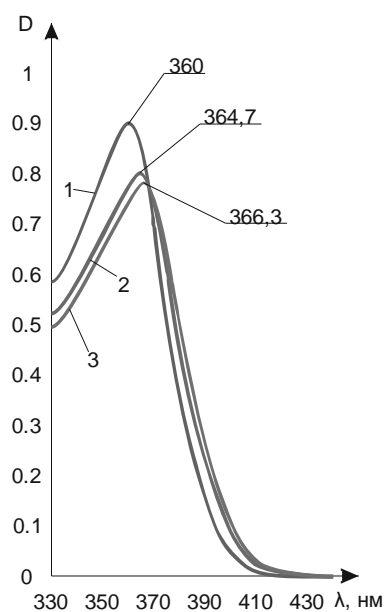


Рис. 1. Спектр поглинання речовини КМ61 у:

- 1 – вихідному розчині;
- 2 – організованому середовищі в присутності БК;
- 3 – організованому середовищі в присутності РЛ

Основною кількісною характеристикою ПАР є здатність зменшувати поверхневий натяг на межі розділу фаз. При солубілізації БАС відбувається зменшення поверхневого натягу водної фази у зв'язку з утворенням міцелоподібних структур. Залежність поверхневого натягу від \ln розведення для КМ61 у середовищі РЛ зображено на рис. 3.

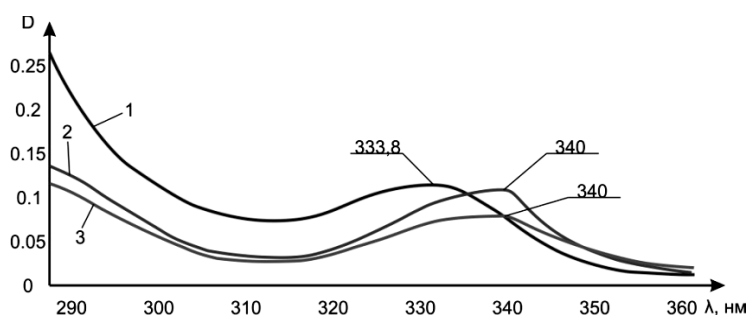


Рис. 2. Спектр поглинання речовини КМ50 у:

- 1 – вихідному розчині;
- 2 – організованому середовищі в присутності ПВС
- 3 – організованому середовищі в присутності РЛ

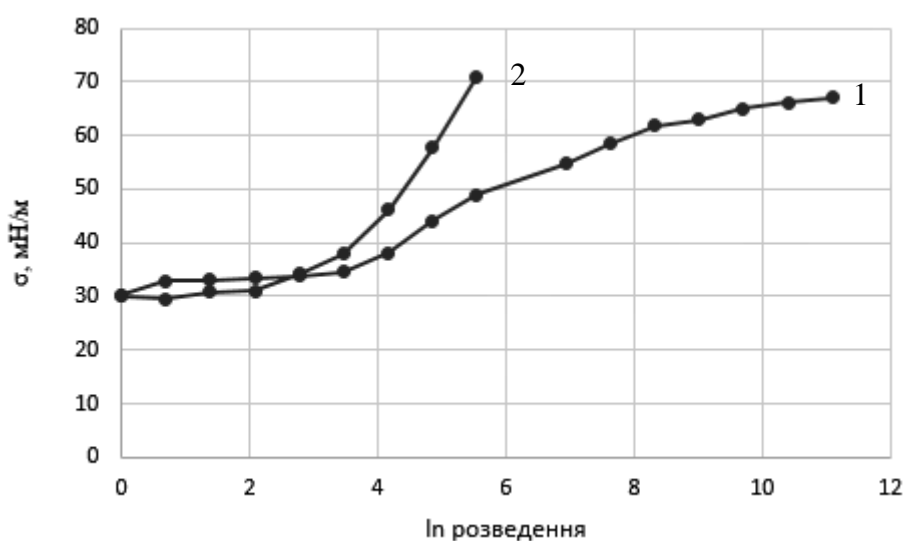


Рис. 3. Ізотерма поверхневого натягу КМ61 у середовищі з БК:
1 – солубілізат; 2 – водний розчин БК

Виміри поверхневого натягу дали можливість зазначити зниження σ зі збільшенням кількості БАС та визначити ККМ для досліджуваних розчинів, які наведено в табл. 2.

Значення критичних концентрацій міцелоутворення

Розчин, поверхневий натяг якого вимірювався	Значення ККМ г/мл
Солнобілізат КМ50 в РЛ	$0,0391 \cdot 10^{-6}$
Солнобілізат КМ61 в РЛ	$0,0156 \cdot 10^{-6}$
Водний розчин РЛ	$0,0625 \cdot 10^{-6}$
Солнобілізат КМ61 в БК	$0,0097 \cdot 10^{-6}$
Водний розчин БК	$0,0600 \cdot 10^{-6}$

При солнобілізації БАС зменшується поверхневий натяг водної фази у зв'язку з утворенням міцелоподібних структур.

Висновки

1. Одержано водорозчинні форми на основі нових біологічно активних похідних тіофенів та оксазолів із збереженням їх активності в ультрамікрогетерогенних організованих середовищах.
2. Вибрано солнобілізацію як зручну та просту методику введення БАС з класу тіофенів та оксазолів у міцелярні системи.
3. Підтверджено наявність вихідних сполук у мікропсевдофазі фізико-хімічними дослідженнями.
4. Встановлено, що біогенні ПАР (рамноліпідний біокомплекс та рамноліпіди) є значно ефективнішими у процесах солнобілізації нерозчинних у воді сполук, ніж синтетичні ПАР.
5. Розпочато дослідження біологічних та фармакологічних властивостей одержаних форм для можливості застосування у фармації.

1. *Водолазкая Н. А. Кислотно-основные равновесия индикаторных красителей в организованных растворах / Н. А. Водолазкая, Н. О. Мчедлов-Петросян. – Х.: ХНУ имени В. Н. Каразина, 2014. – 460 с.* 2. *Rachael A. Hughes and Christopher J. Moody, From Amino Acids to Heteroaromatics—Thiopeptide Antibiotics, Nature's Heterocyclic Peptides, Angew Chem Int Ed, 2007, 46, 7930-7954.* 3. *Mohamed Kaspady, Venugopala Katharigatta Narayanaswamy, Mohana Raju and Gopal Krishna Rao; Synthesis, Antibacterial Activity of 2,4-Disubstituted Oxazoles and Thiazoles as Bioisosteres; Lett. Drug. Des. Discov.; 2009; 6; 21–28.* 4. *Anna C. Giddens, Helena I. M. Boshoff, Scott G. Franzblau, Clifton E. Barry, and Brent R. Copp; Antimycobacterial natural products: synthesis and preliminary biological evaluation of the oxazole-containing alkaloid texaline; Tetrahedron Lett, 2005, 46:7355-7357.* 5. *Nabhubygari Mahaboob Basha, Gopala Lavanya, Adivireddy Padmaja and Venkatapuram Padmavathi; Synthesis and Antioxidant Activities of Acetamidomethylsulfonyl Bis Heterocycles-Oxazolyl/Thiazolyl/Imidazolyl-1,3,4-Oxadiazoles; Arch Pharm Chem Life Sci; 2013; 346; 511-520.* 6. *Guda Mallikarjuna Reddy, Putta Ramachandra Reddy, Venkatapuram Padmavathi and Adivireddy Padmaja; Synthesis and Antioxidant Activity of a New Class of Mono- and Bis-Heterocycles; Arch Pharm Chem Life Sci; 2013; 346; 154–162.* 7. *Mickevičienė K. Synthesis and Antimicrobial Activity of N-Substituted-β-amino Acid Derivatives Containing 2-Hydroxyphenyl, Benzo [b] phenoxazine and Quinoxaline Moieties / K. Mickevičienė, R. Baranauskaitė, K. Kantminienė, M. Stasevych, O. Komarovska-Porokhnyavets, V. Novikov // Molecules 2015, 20, 3170–3189.* 8. *Пат. № 36704 Україна, МПК (2006), A01N 25/30, A01N 59/06, A01N 63/00, C12N 1/20. Біопрепарат для бобових і злакових рослин / Н. Лісова, О. Карпенко, Р. Вільданова, Н. Щеглова, Ю. Козуб, М. Галан, М. Наконечний; патенто-обладатель Лісова Н., Карпенко О. заявл.07.04.2008; зареєстр. 10.11.2008; опубл. Бюл. № 21.* 9. *Щеглова Н. С., Карпенко О. В., Вільданова Р.І., Лісова Н. Ю., Муха О. В. Біопрепарат для злакових культур на основі азотфіксувальних бактерій та біоПАР: матеріали междунар. конф. [“Радостим”] (Київ, 10-13 черв. 2008 р.), 2008. – С. 114.* 10. *Алексеев К. В. Полимеры для фармацевтической технологии: учеб. пос. / К. В. Алексеев, И. А. Грицкова, С. А. Кедик. – М., 2011. – 511 с.*