

УДК 615.273.53; 547.587.51

АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ КЕТО-КЕТАЛЬНЫХ ИЗОМЕРОВ ВАРФАРИНА СПЕКТРАЛЬНЫМИ МЕТОДАМИ

А.З. Абышев¹, К.Б. Нгуен^{1*}, Л.Н. Зинчук¹

Резюме. В результате проведенных исследований было показано, что соотношение изомеров при интегрировании в ДМСО- d_6 : (S,R)-варфарин – (S,S)-варфарин – варфарин с открытой цепью составляют 70:28:2%; в $CDCl_3$ – 45:40:15%. В ИК-спектрах варфарина наблюдаются специфические полосы поглощения в областях 3271–3277 cm^{-1} , 1681–1682 cm^{-1} , 1103–1076 cm^{-1} , соответствующие ν_{OH} , $\nu_{CH=CH}$: ν_{as} C–O–C. Молекулярный пик варфарина после силирования имеет m/z 380, соответствующий массе триметилсилил-варфарина. Таким образом, показана возможность применения ИК-, ЯМР-спектроскопии и хромато-масс-спектрометрии для подтверждения подлинности производных варфарина.

Ключевые слова: варфарин, кето-кетальные изомеры, ИК-, ЯМР-спектроскопия, ГХ-МС.

ANALYSIS OF STRUCTURAL FEATURES OF THE KETO-KETAL ISOMERS OF WARFARIN BY SPECTRAL METHODS

A.Z. Abyshev¹, K.B. Nguyen¹, L.N. Zinchuk¹

Abstract. As a result of the studies was shown that the relative ratios of isomers by integration in DMSO- d_6 : (S, R)-warfarin – (S, S)-warfarin – open chain warfarin are 70%: 28%: 2%; in $CDCl_3$ are 45%: 40%: 15%. In the IR spectra of warfarin specific absorption bands are observed in the regions 3271–3277 cm^{-1} , 1681–1682 cm^{-1} , 1103–1076 cm^{-1} , corresponding to: ν_{OH} , $\nu_{CH=CH}$: ν_{as} C–O–C. The molecular peak of warfarin after silylation has m/z 380 corresponding to the mass of trimethylsilyl-warfarin. Thus, the possibility of using IR, NMR spectroscopy and chromatography-mass spectrometry to confirm the authenticity of warfarin derivatives has been demonstrated.

Keywords: warfarin, keto-ketal isomers, IR, NMR spectroscopy, GC-MS.

¹ – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

¹ – St. Petersburg Chemical and Pharmaceutical Academy, Ministry of Healthcare, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: nguyencongbang.ru@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Варфарин (4-гидрокси-3-(3-оксо-1-фенил-бутил)-2Н-1-бензопиран-2-он) представляет собой антикоагулянтное лекарственное средство, обычно используемое для профилактики и лечения венозных тромбозов и тромбоэмболизов. Варфарин снижает коагуляцию крови путем ингибирования активного сайта зависимой от витамина К эпоксидредуктазы (VKOR) [1]. Несмотря на давнее и широкое использование варфарина в качестве лекарственного средства, механизм его действия до сих пор не совсем ясен. Возможным фактором, влияющим на известную сложность оптимизации дозы, которая была связана с биодоступностью варфарина [2], может быть сложность варфарина на молекулярном уровне [3, 4]. Важным моментом, который будет способствовать более глубокому пониманию функции варфарина как лекарственного средства, является идентификация точной молекулярной структуры биологически активной формы варфарина.

Варфарин может теоретически существовать в 40 различных таутомерных формах (рисунок 1). Варфарин демонстрирует прототропную таутомерию, внутримолекулярное движение водорода от одного атома к другому, а также таутомерию с кольцевой цепью, где движение протона сопровождается открытием или закрытием кольца [3, 4].

Все формы варфарина с открытой цепью проявляют кето-енольную таутомерию как в β -кетолактонном фрагменте, так и в кетогруппе боковой цепи. Каждая из этих частей может существовать в любой из трех таутомерных форм. Однако поскольку β -кетолактонный фрагмент имеет хиральный центр, на самом деле существует два возможных диастереомера, что приводит к четырем различным возможностям. При использовании кетогруппы боковой цепи одна форма енола, содержащая концевую метильную группу, имеет два возможных изомера: E- и Z-конфигурации. Это создает четыре различные

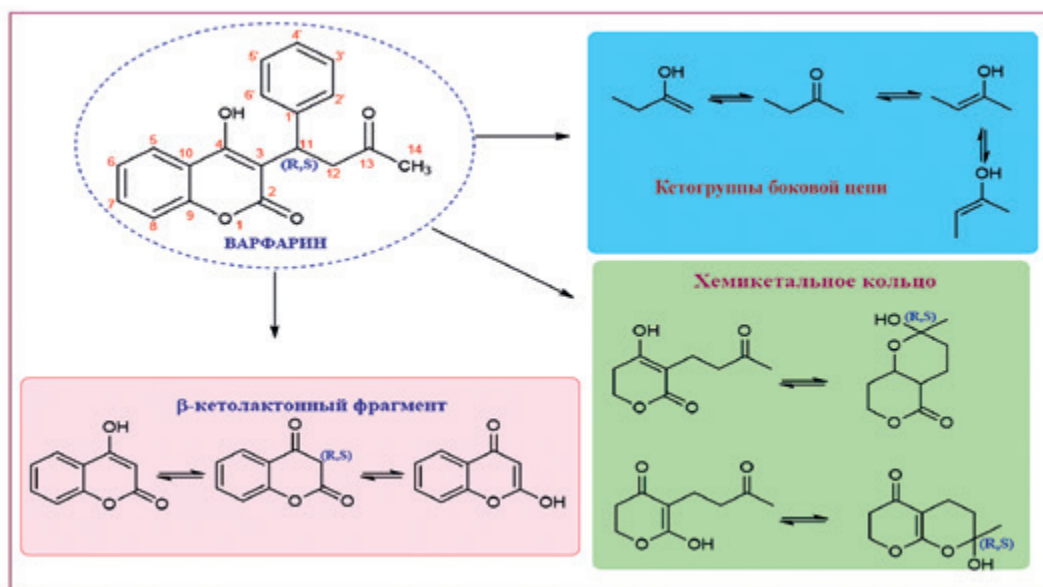


Рисунок 1. Таутомеризация подструктур варфарина, комбинация которых составляет 40 различных таутомерных форм варфарина

формы для таутомеризации кетонов боковой цепи. Комбинация обоих фрагментов дает 16 различных таутомеров с открытой цепью (рисунок 1) [3].

Форма с открытой цепью близка к образованию циклического гемикетала 4-гидроксикумарина или циклического гемикетала 2-гидроксихромона. Закрытие кольца создает новый центр асимметрии, поэтому для каждого закрытия могут образовываться два возможных диастереомера – в общей сложности четыре различных таутомеров кольца (рисунки 1, 2) [2–5].

В качестве одного из наиболее эффективных антикоагулянтов варфарин был введен для клинического применения состав препаратов Варфарин®, Янтовен®, Униварфин®, Кумадин®, Мареван® в виде рацемата [6]. Однако активность и метаболизм обеих энантиомерных форм неодинаковы. Было доказано, что (S)-варфарин в четыре раза более активен, чем (R)-варфарин, и, по-видимому, доминирует в реакции антикоагулянтов на терапию [5, 7]. Период полураспада (S)-варфарина в два-четыре раза меньше, чем у R-варфарина, так что менее активный энантиомер

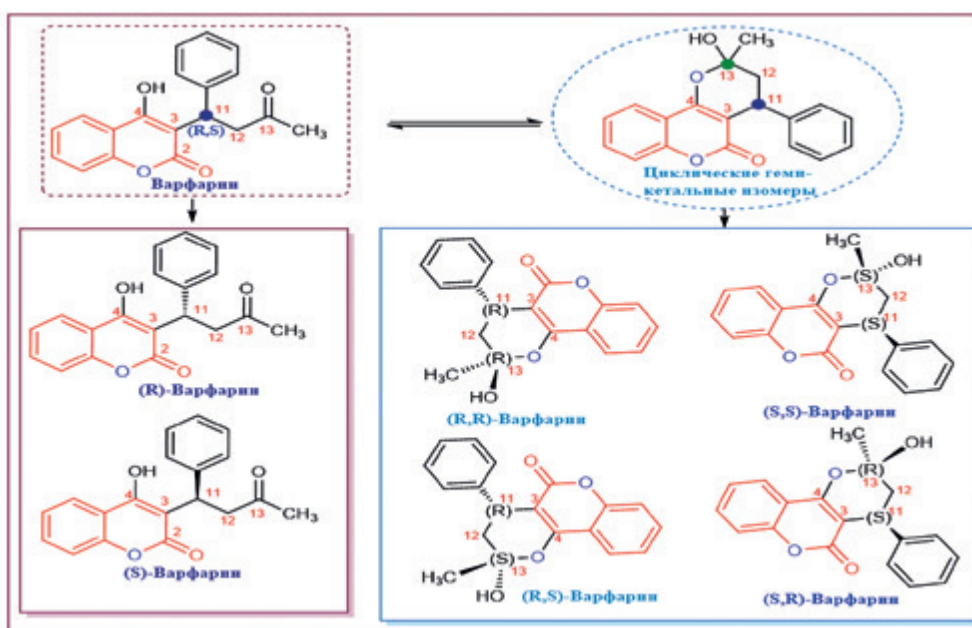


Рисунок 2. Кето-кетальные изомерия варфарина

накапливается и, возможно, способствует антикоагулянтному ответу [8]. Поэтому при химической модификации структуры варфарина в различных условиях очень важно определение принадлежности (конфигурации) полученного искомого соединения к ряду R- или S-изомеров современными физико-химическими методами.

Целью нашей работы явился анализ структурных особенностей кето-кетальных изомеров варфарина спектральными методами (ИК-, ЯМР-спектроскопия и хромато-масс-спектрометрия).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали варфарин (CAS № 81-81-2, Aldrich Chemical, США); регистрировались ИК-спектры веществ в виде паст в вазелиновом масле, дисков с KBr на фурье-спектрофотометре инфракрасном ФСМ-1201 (ЗАО «СПБ Инструментс», Россия).

^1H -ЯМР- и ^{13}C -ЯМР-спектры были получены с помощью спектрометра Bruker Avance III 400 MHz (Bruker, США) с ТМС (тетраметилсилан- SiMe_4) в качестве внутреннего стандарта, и химические сдвиги регистрировали в м.д. по δ -шкале с использованием $\text{DMSO}-d_6$ или CDCl_3 в качестве растворителя.

ГХ-МС-хроматограммы были сняты на газовом хроматографе Agilent 7820 GC System (Agilent Technologies, США), оснащённом масс-селективным квадрупольным детектором Agilent Series MSD (Agilent Technologies, США), на неполярной капиллярной колонке Agilent 19091S-433 HP-5MS (Agilent Technologies, США). Анализ проводили после силирования с помощью N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида, со-

державшего 1% триметилхлоросилана (Sigma-Aldrich, США), в сухом термоблоке при 110 °C в течение 15 мин.

ИК- и ЯМР-спектры были обработаны с помощью программы FSpec 4.0 (ООО «Мониторинг», Россия) и ACD/SpecManager 10.0 (Advanced Chemistry Development, Inc., Канада).

ГХ-МС-хроматограммы были обработаны программой UniChrom 5.0 (New Analytical Systems Ltd., Белоруссия) и ACD/SpecManager 10.0 (Advanced Chemistry Development, Inc., Канада).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 3 представлены ^{13}C -ЯМР-спектры варфарина (в $\text{DMSO}-d_6$). Из данных спектров видно явное дублирование пиков с очень похожими химическими сдвигами, а соответствующие пары интенсивностей имеют одинаковое соотношение (1:2,5) для всех пиков. Это указывает на то, что образец варфарина содержит по меньшей мере два таутомера, которые очень похожи друг на друга, потому что их химические сдвиги по углеродным атомам одинаковы.

Последний сигнал в высокочастотном диапазоне появляется при 161,18 м.д. Отсутствует сигнал для карбонильного углерода из $\text{CH}_2\text{-CO-CH}_3$ -фрагмента открытой формы, который ожидался при ~200 м.д. Это подтверждает, что таутомеры должны быть закрытыми. Следует отметить, что дублирование пиков происходит из-за присутствия диастереомера циклического гемикетала 4-гидроксикумарина. Кроме того, имеется множество пиков, интенсивность которых близка к базовой линии при 30,37 м.д. (C-14), 49,39 м.д. (C-13), 108,15 м.д. (C-12) и 195,62 м.д. (C=O из $\text{CH}_2\text{-CO-CH}_3$ -фрагмента), соответствующих другому таутомеру варфарина – второстепенному компоненту с открытой цепью (в относительном соотношении (S,R)-варфарин – (S,S)-варфарин – варфарин с открытой цепью 70:28:2% при интегрировании).

Анализ спектров ^{13}C -ЯМР варфарина в растворе CDCl_3 показывает, что в растворе, кроме диастереомера циклического гемикетала 4-гидроксикумарина, также присутствует форма с открытой цепью (в относительном соотношении (S,R)-варфарин – (S,S)-варфарин – варфарин с открытой цепью 45:40:15% при интегрировании) (рисунок 4). Полное отнесение сигналов в спектрах ^{13}C -ЯМР варфарина приведено в таблице 1.

Для интерпретации спектра ПМР (рисунки 5, 6) мы сосредоточились на неароматических водородах, которые наиболее полезны для дифференциации таутомеров. Необходимо отметить, что водород в положении H-14 метильной группы проявляется в виде синглета при $\delta \sim 1,58\text{--}1,70$ м.д., более интенсивный сигнал обусловлен изомером (S,R)-варфарина, а сигнал меньшей интенсивности – изомером (S,S)-варфарина и варфарина с открытой цепью (в растворе CDCl_3).



Газовый хроматограф Agilent Technologies 7820 GC System, оснащенный масс-селективным квадрупольным детектором Agilent Series MSD

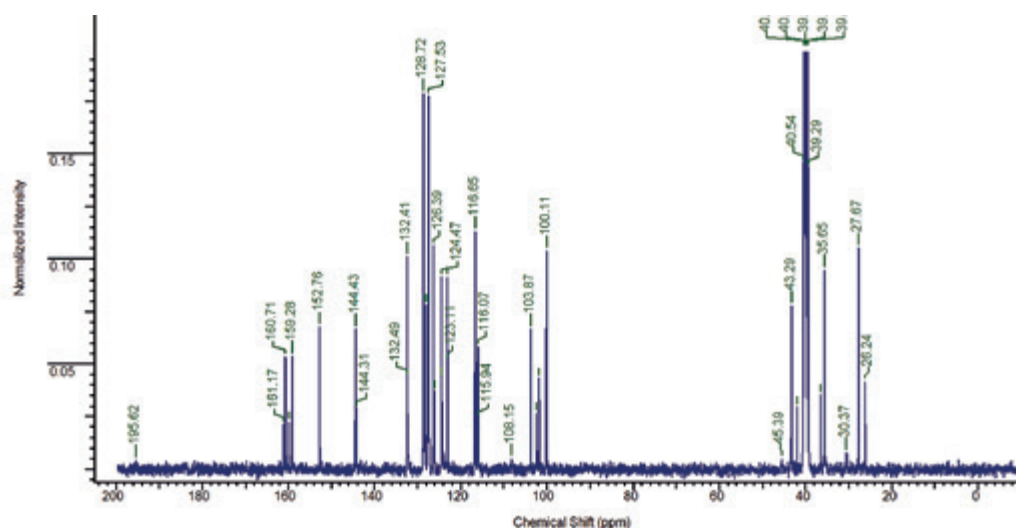


Рисунок 3. Спектр ^{13}C -ЯМР варфарина (ДМСО- d_6 , 100 МГц)

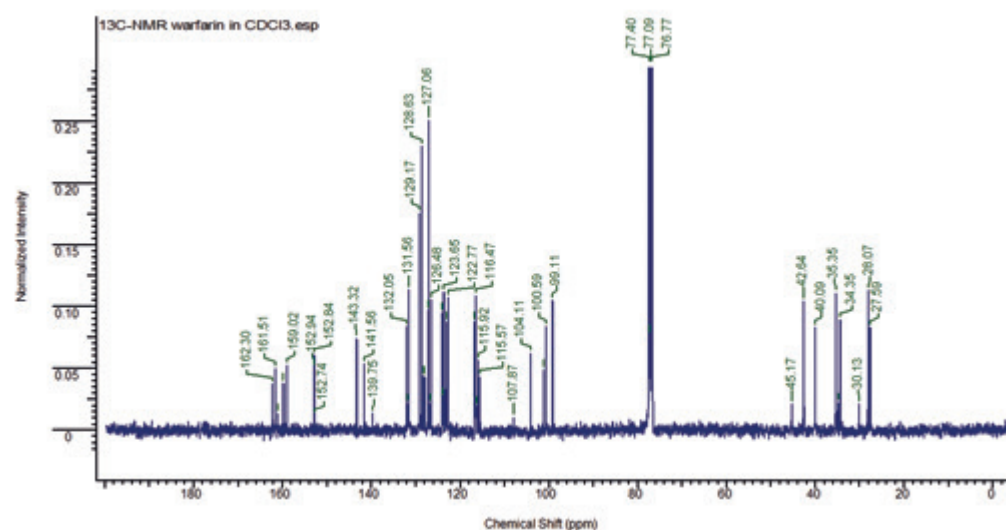


Рисунок 4. Спектр ^{13}C -ЯМР варфарина (CDCl_3 , 100 МГц)

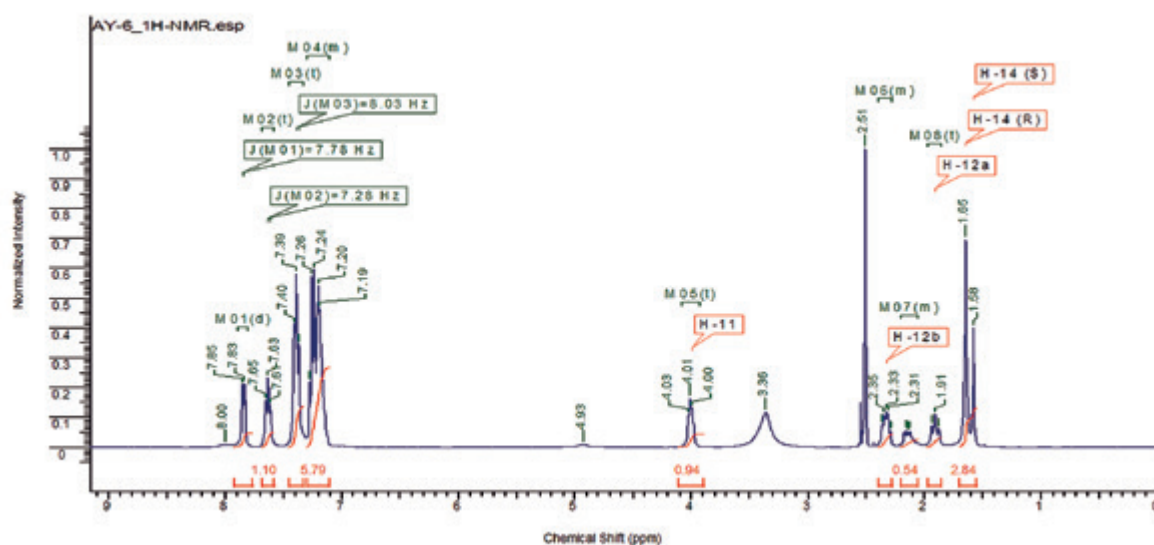


Рисунок 5. Спектр ^1H -ЯМР варфарина (ДМСО- d_6 , 400 МГц)

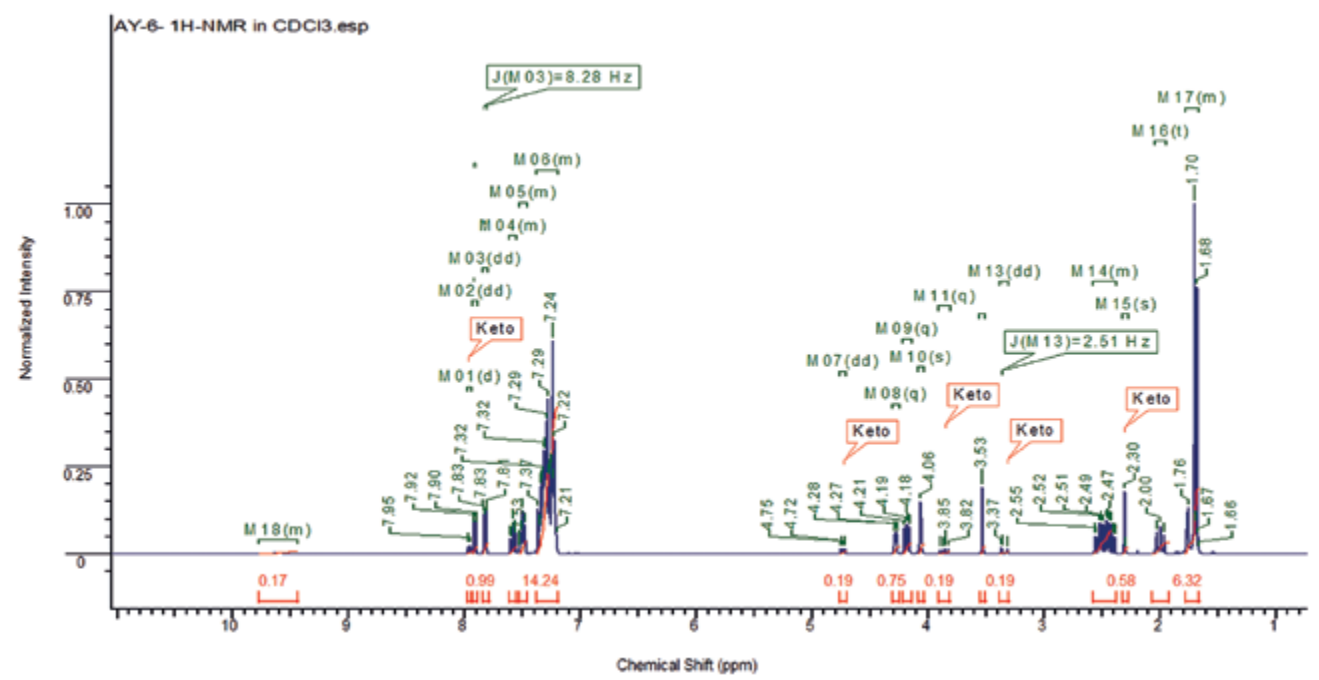


Рисунок 6. Спектр ¹H-ЯМР варфарина (CDCl₃, 400 МГц)

Таблица 1.

Отнесение сигналов в спектрах ЯМР кето-кетальных изомеров варфарина

Кето-кетальные изомеры варфарина		 (S,S)-Варфарин		 (S,R)-Варфарин		 Варфарин	
Положение	Тип углеродов	¹³ C- ЯМР δ (м.д., 100 МГц)					
		DMSO-d ₆	CDCl ₃	DMSO-d ₆	CDCl ₃	DMSO-d ₆	CDCl ₃
C-14	CH ₃	26,24	27,59	27,67	28,07	30,07	30,13
C-11	CH	36,49	34,35	35,65	35,35	–	34,83
C-12	CH ₂	41,98	40,09	43,29	42,64	45,39	45,17
C-13	C	101,85	100,59	100,11	99,11	195,62	–
C-3	C	102,39	101,20	103,87	104,11	108,15	107,87
C-8	CH	115,94	115,57	116,07	115,92	–	–
C-10	C	116,72	116,65	116,65	116,47	–	116,20
C-5	CH	123,11	123,09	123,17	122,77	–	–
C-6	CH	124,53	123,98	124,47	123,65	–	123,89
C-4′	CH	126,11	126,48	126,39	127,01	–	126,70
C-3′, C-5′	CH	127,76	127,16	127,53	127,06	–	127,99
C-2′, C-6′	CH	128,34	129,17	128,72	128,63	–	128,19
C-7	CH	132,49	132,05	132,41	131,56	–	131,82
C-1′	C	144,43	141,56	144,31	143,32	–	139,75
C-9	C	152,76	152,74	152,76	152,84	–	152,94
C-2	C	159,88	159,02	159,28	159,82	–	–
C-4	C	161,17	162,30	160,71	161,51	–	161,09
¹ H- NMR δ (м.д., 400 МГц)							
H-14	CH ₃	1,58 (с)	1,68 (с)	1,66 (с)	1,70 (с)	–	1,76 (с)
H-12 _а	CH ₂	2,22 (уш.с.)	2,01(т)	1,90 (уш.с.)	2,30 (м.)	2,14	3,34 (дд)
H-12 _б	CH ₂	2,33 (уш.с.)	2,40–2,56 (м.)	2,35 (уш.с.)	2,40–2,56 (м.)		3,87 (кв.)
H-11	CH	4,01 (уш.с.)	4,28 (м.)	4,01 (уш.с.)	4,18 (м.)	4,94	4,74 (дд)

Сигнал Н-12_a и Н-12_b CH₂-группы для циклических гемикетальных изомеров варфарина имеет δ~1,90–2,30 м.д. и δ~2,33–2,56 м.д. соответственно в виде уширенного триплета или мультиплета; для варфарина с открытой цепью – δ~3,34 м.д. и δ~3,87 м.д. соответственно в виде дублета или квадруплета.

Сигнал Н-11 СН-группы имеет δ=4,01 м.д. в виде уширенного триплета для двух изомеров. Сигналы Н-11 для варфарина с открытой цепью проявляются очень малой интенсивностью при δ~4,94 м.д. (в DMSO-d₆) и 4,74 м.д. (в CDCl₃) соответственно. Отнесение сигналов неароматических водородов в спектрах ¹Н-ЯМР кето-кетальных изомеров варфарина приведено в таблице 1.

Результаты анализа ИК-спектров (рисунки 7–8) показывают, что варфарин существует в виде циклических гемикетальных изомеров и открытой цепи. В ИК-спектрах присутствует полосы поглощения в об-

ласти 3271–3277 см⁻¹, характерные для спиртовой гидроксильной группы; полоса поглощения при 1681–1682 см⁻¹, характерная для С=О-пирана кумаринового ядра; полоса поглощения СН=СН α-пиранов при 1608–1618 см⁻¹; полоса поглощения СН₃-группы при 2955–2957 см⁻¹; полосы поглощения при 1103,32 и 1076,31 см⁻¹, характерные для кетальной группы С-О-С.

Полное отнесение полос поглощения в ИК-спектрах варфарина приведено в таблице 2.

Масс-спектр варфарина в нашей работе был получен после силирования с помощью бис(триметилсилил)трифторацетамида в пиридине в течение 15 мин. Молекулярный пик данного соединения имеет *m/z* 380 (рисунок 9), соответствующий массе триметилсилил-варфарина. Наиболее важные пути фрагментации структуры данного соединения показаны на рисунке 10.

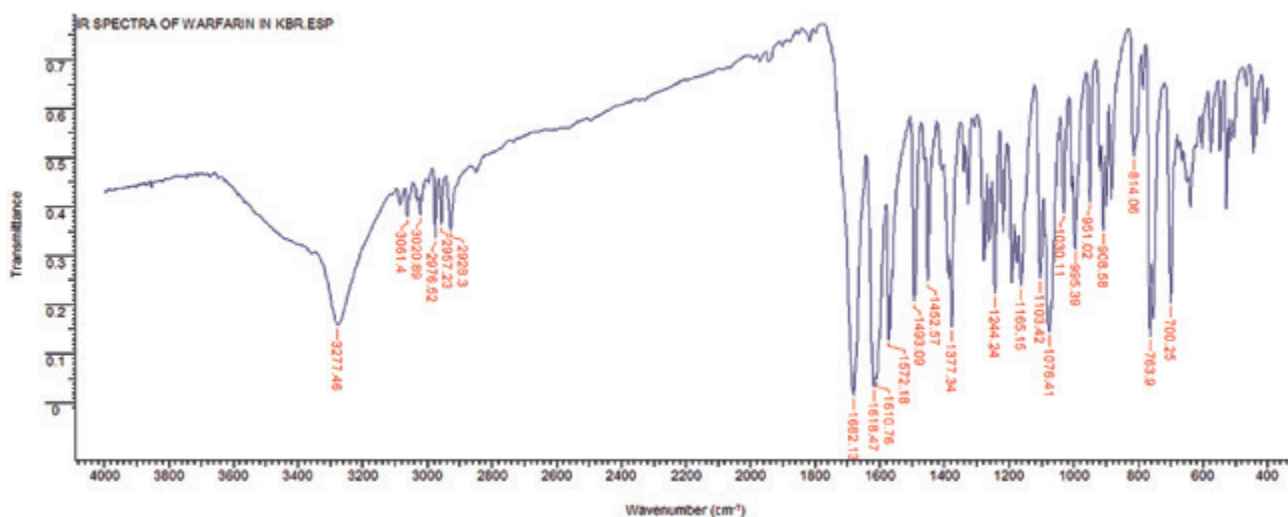


Рисунок 7. ИК-спектр варфарина в KBr в области 4000–400 см⁻¹

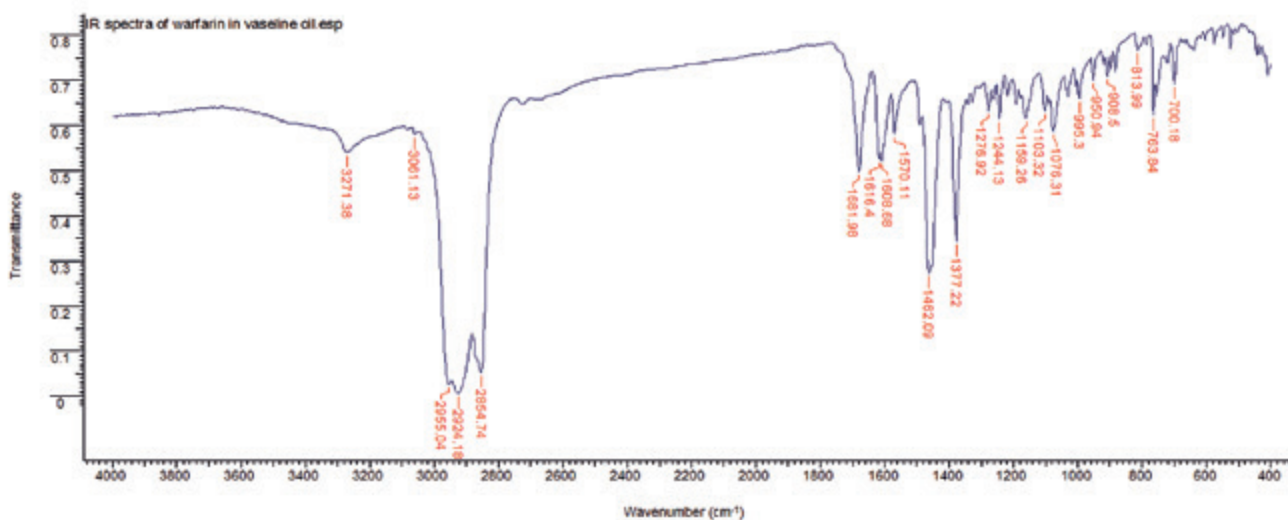


Рисунок 8. ИК-спектр варфарина в вазелиновом масле в области 4000–400 см⁻¹

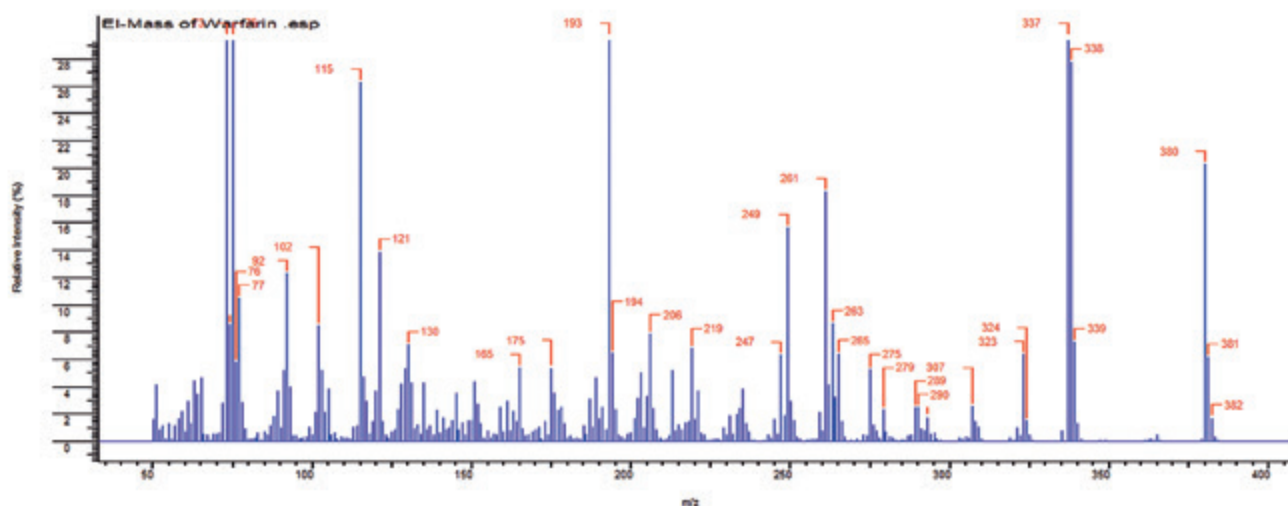


Рисунок 9. ЭИ-масс-спектр варфарина

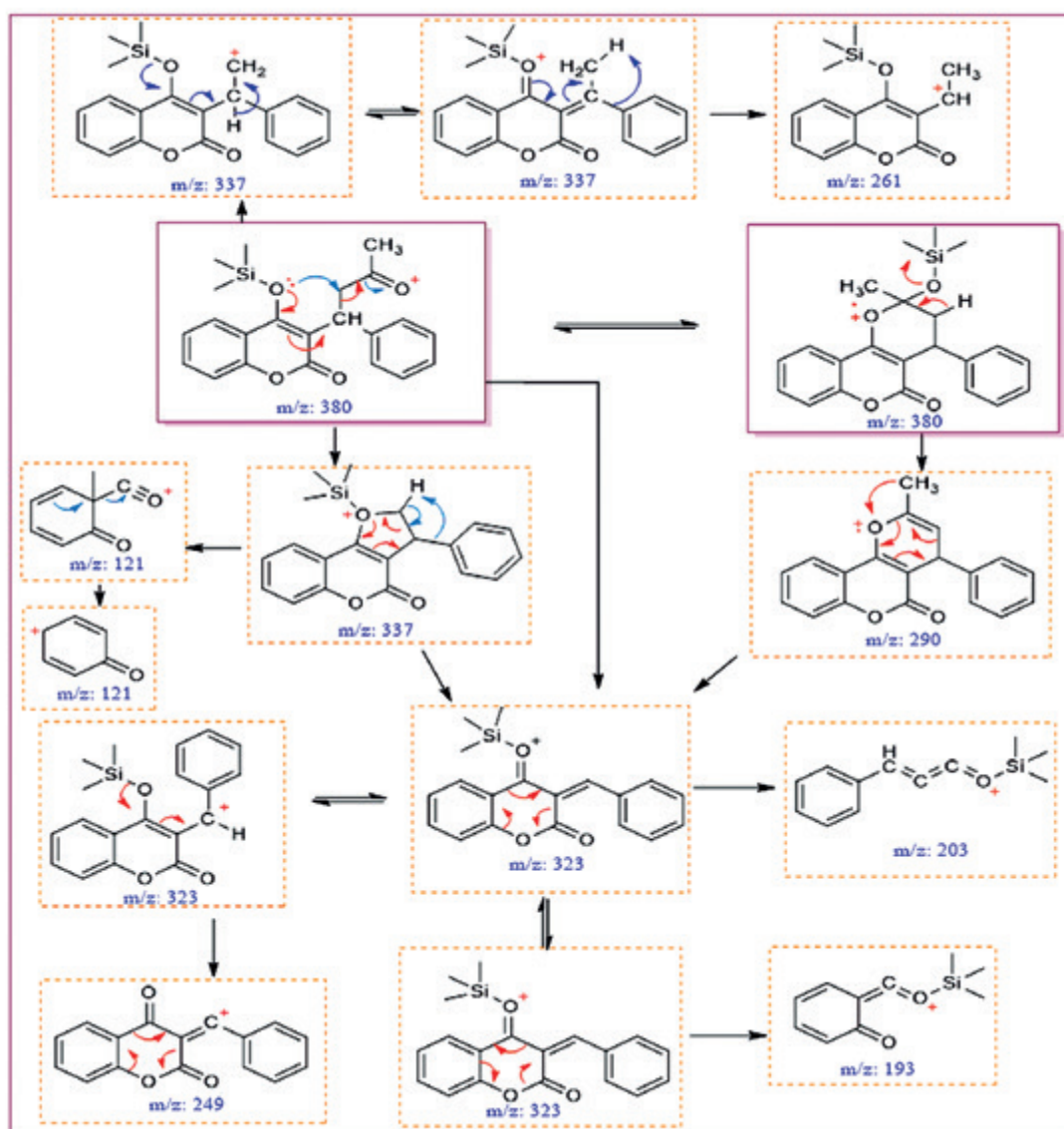


Рисунок 10. Основные фрагменты в ЭИ-масс-спектре варфарина после силирования

Таблица 2.

Отнесение полосы поглощения в ИК-спектрах варфарина

Волновое число (см ⁻¹)		Функциональная группа, тип колебания
KBr	В вазелиновом масле	
3277,46 (с.)	3271,38 (ср.)	O-H, валентное
3061,4 (ср.)	3061,13 (сл.)	CH=CH бензольного цикла, валентное
2976,52 (ср.)		CH ₃ , асимметричное, валентное
2957,23 (ср.)	2955,04 (оч.с.)	CH ₃ , симметричное, валентное
2928,3 (ср.)	2924,21 (оч.с.), 2852,84	sp ² CH ₂ , валентное
1682,13 (оч.с.)	1681,98 (ср.)	C=O α-пирона (в кумариновом ядре), валентное
1618,47 (оч.с.), 1610,76 (оч.с.)	1616,4 (ср.), 1608,68 (ср.)	CH=CH α-пирона, валентное
1572,18 (с.)	1570,11 (сл.)	CH=CH бензольного цикла в кумариновом ядре, валентное
1493,09 (с.)		CH, валентное
1452,57 (с.)	1462,09 (с.)	sp ² CH ₂ , симметричное деформационное
1377,34 (с.), 1327,19 (ср.)	1377,22 (ср.)	CH ₃ , симметричное деформационное
1278,96 (с.), 1244,24 (с.), 1192,15 (с.)	1276,92 (сл.), 1244,13 (сл.)	C=O-O (связь «карбонил – кислород» в α-пиронах), валентное
1165,15 (с.)	1159,26 (сл.)	C-O (связь «спиртовой углерод – кислород» в α-пиронах), валентное
1103,42 (с.), 1076,41 (с.), 1030,11 (ср.)	1103,32 (сл.), 1076,31 (сл.)	C-O-C, кеталь, асимметричное, валентное
995,39 (с.), 908,58 (ср.), 814,06 (ср.)	995,3 (сл.), 908,5 (сл.), 813,99 (оч.сл.)	CH=CH, деформационное
763,9 (с.), 754,26 (с.), 700,25 (с.)	763,84 (сл.), 700,18 (сл.)	sp ³ CH ₂ , деформационное (качение)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, по результатам данной работы было установлено, что варфарин существует в динамическом равновесии между различными изомерными формами; распределение и типы изомеров, присутствующих в растворе, зависят от полярности и pH растворителя. Также показано, что варфарин в растворе состоит из трех взаимоконвертируемых таутомерных структур, две из которых представляют собой циклические диастереомерные гемикетали – (S,S)-варфарин и (S,R)-варфарин, третий,

второстепенный, компонент представляет собой промежуточную форму с открытой цепью; соотношение изомеров при интегрировании в DMSO-d₆ (S,R)-варфарин – (S,S)-варфарин – варфарин с открытой цепью составляют 70:28:2%; в CDCl₃ – 45:40:15%. В ИК-спектрах варфарина наблюдаются специфические полосы поглощения в областях 3271–3277 см⁻¹, 1681–1682 см⁻¹, 1103–1076 см⁻¹, соответствующие νOH, νCH=CH: ν_{as} C-O-C. Молекулярный пик варфарина после силирования имеет m/z 380, соответствующий массе триметилсилил-варфарина.

Поэтому в настоящее время для идентификации (определения подлинности) таутомеров варфарина наиболее объективными методами являются именно спектральные методы, в частности ИК- и ЯМР-спектроскопия и хромато-масс-спектрометрия.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.З. Абышев, Э.М. Агаев, Р.А. Абышев. Природные и синтетические кумарины и флавоноиды. – Баку: Наука и образование, 2014. 482 с.
2. M. Wadelius et al. Common VKORC1 and GGX polymorphisms associated with warfarin dose // The pharmacogenomics journal. 2005. V. 5. № 4. P. 262–270.
3. L. Guasch, M.L. Peach, M.C. Nicklaus. Tautomerism of warfarin: combined chemoinformatics, quantum chemical, and NMR investigation // The Journal of organic chemistry. 2015. V. 80. № 20. P. 9900–9909.
4. E.J. Valente et al. Structure of warfarin in solution // Journal of medicinal chemistry. 1977. V. 20. № 11. P. 1489–1493.
5. D.A. Barnette et al. Stereospecific Metabolism of R- and S-Warfarin by Human Hepatic Cytosolic Reductases // Drug Metabolism and Disposition. 2017. V. 45. № 9. P. 1000–1007.
6. Martindale: The Complete Drug Reference. 36th Edition / Ed. by S.C. Sweetman. – London: Pharmaceutical Press, 2009. 3694 p.
7. M. He et al. Structural forms of phenprocoumon and warfarin that are metabolized at the active site of CYP2C9 // Archives of biochemistry and biophysics. 1999. V. 372. № 1. P. 16–28.
8. M.J. Fasco, L.M. Principe. R- and S-Warfarin inhibition of vitamin K and vitamin K 2, 3-epoxide reductase activities in the rat // Journal of Biological Chemistry. 1982. V. 257. № 9. P. 4894–4901.