

СИНТЕЗ ^{14}C -ЕТОКСОЗЕПАМУ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЙОГО ОСНОВНИХ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ТА РАДІОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ

Ключові слова: радіоактивно мічені сполуки, похідні 1,4-бенздіазепіну, ^{14}C -етоксозепам

Використання мічених радіоактивними ізотопами препаратів є одним з найзручніших методів вивчення їх біокінетики. Застосування цих препаратів дозволяє визначати концентрацію в органах та тканинах тварин, вивчати шляхи біотрансформації при реєстрації та ідентифікації метаболітів і здійснювати матеріальний баланс речовини, при вивченні процесів екскреції. Для отримання радіоактивно мічених аналогів вихідних сполук зазвичай використовують ізотопи з довгим періодом існування (^{14}C , ^3H та ^{35}S , ^{125}I для протеїнової мітки), кількість, шляхи та місця введення яких до молекули визначаються метою подальших біокінетичних досліджень.

У випадку похідних 1,4-бенздіазепіну розроблено декілька підходів щодо синтезу мічених сполук із радіоактивною міткою у різних положеннях молекули, які найчастіше використовують для введення ізотопів ^{14}C або ^3H .

Головними методами отримання 1,4-бенздіазепінів є конденсація ароматичних компонентів з різними похідними α -амінокислот. У зв'язку з цим існує декілька шляхів синтезу похідних 1,4-бенздіазепіну, які полягають у введенні в реакцію проміжних речовин: мічених похідних амінокетонів або похідних гліцину. Перший шлях дозволяє отримати сполуку з міткою у положенні 5 гетерокільця або ^{14}C , ^3H в структурі радикалів (феніл, *o*-хлорфеніл) та полягає у конденсації *para*-заміщеного аніліну з бензоїлхлоридом у присутності хлористого цинку з наступним гідролізом проміжного продукту [1]. Другий шлях синтезу включає використання проміжних речовин, при введенні у реакцію мічених похідних гліцину (галогенангідридів, гідрохлориду етилового естеру гліцину тощо [2]), що дозволяє отримати мічені сполуки у положеннях 2 чи 3 гетерокільця похідних 1,4-бенздіазепінів.

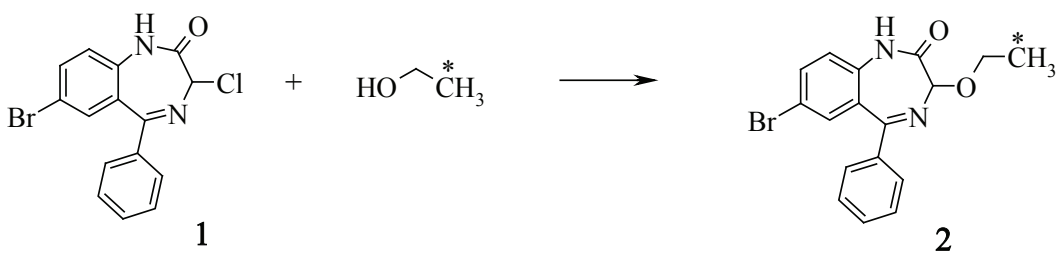
Третім шляхом включення радіоактивного ізотопу у молекулу 1,4-бенздіазепіну є приєднання мічених фрагментів (метил, ацетил) до структури сполуки вже після конденсації діазепінового циклу [3]. Також можливе введення ізотопу ^3H безпосередньо у молекулу 1,4-бенздіазепіну [4, 5], що здійснюється реакціями ізотопного обміну гетерогенного каталітичного ізотопного обміну у системі $^3\text{H}_2\text{O}$: диметилсульфоксид (1:1) та дозволяє отримати питому радіоактивність сполуки понад 100 Ки/моль.

Метою даної роботи є синтез, ідентифікація, та визначення радіохімічних характеристик 3-етокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону.

Експериментальна частина

Синтетична частина

$2[^{14}\text{C}]$ -7-бром-5-феніл-3-етокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-он синтезований взаємодією 7-бром-5-феніл-3-хлор-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону (**1**) з $2[^{14}\text{C}]$ - етиловим спиртом:



У плоскодонну колбу на 100 см³ із хлоркальцієвою трубкою вносять 0,5 г (0,00143 моль) 7-бром-5-феніл-3-хлор-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону (**1**) у 20 см³ сухого хлороформу, при інтенсивному перемішуванні додають 50 см³ сухого хлороформу, у якому міститься 0,13 см³ (0,00286 моль) 2[¹⁴С]-етилового спирту (загальна активність 200 МБк). Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі 24 ч, потім промивають водою (4×20 см³). Органічну фазу відділяють та упарюють у роторному випарювачі при зниженому тиску, отриманий залишок кристалізують із етанолу. Вихід 2[¹⁴С] 3-етокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону (**2**) 0,43 г (83,7 %), T_{пл.} = 218- 222 °С, EI-MS m/z 358 [M⁺].

Радіохімічні характеристики сполуки

Для визначення питомої радіоактивності точну наважку ¹⁴С-етоксозепаму (5–7 мг) розчиняли в етанолі 95 %, кількісно переносили до мірної колби на 50 см³ та доводили етанолом до мітки. Певні об'єми отриманого розчину (0,1–1,0 см³) переносили до сцинтиляційних флаконів, додавали 10 см³ ксилільно-спиртового сцинтилятора та визначали вміст радіоактивності на рідинному сцинтиляційному фотометрі TRI CARB Canberra PACKARD 2700. Питому активність зразку (в Кю/моль або Бк/моль) розраховували за формулою:

$$PP(Kю) = \frac{\left(\frac{aV}{mV_{al}} M \right)}{2,22 \cdot 10^9},$$

де: *PP(Kю)* – питома радіоактивність (Кю/моль); *a* – активність зразка (імп/хв); *m* – маса наважки зразку, мг; *V* – об'єм колби, см³; *V_{al}* – об'єм аліквоти, см³; *M* – молярна маса етоксозепаму (359,23 мг/ммоль), 2,22·10⁹ – активність 1 мКю.

Питому активність зразку в Бк визначали за формулою:

$$PP(Бк) = \frac{aMV}{mV_{al} 60} 10^3,$$

де: *PP(Бк)* – питома радіоактивність (Бк/моль); *a* – активність зразка, (імп/хв); *m* – маса наважки зразку, мг; *V* – об'єм колби, см³; *V_{al}* – об'єм аліквоти, см³; *M* – молярна маса етоксозепаму (359,23 мг/ммоль).

Визначення радіохроматографічної чистоти отриманого зразку проводили методом тонкошарової препаративної радіохроматографії. Для цього на лінію старту (на 5 см від краю хроматографічної пластини Sorbfil) наносили спиртовий розчин ¹⁴С-етоксозепаму. У якості стандартної сполуки використовували немічений етоксозепам (R_f=0,53). Попередньо проводили хроматографування у чотирьох-хлористому вуглеці до нижнього краю пластини, який відрізали після хроматографування на відстані 1,5 см від лінії старту. Після цього проводили хроматографування у системі ацетонітрил:бензол:гексан:метанол (15:25:5:1). Пластину висушували струмом теплого повітря та проявляли в УФ-світлі, розрізали на зони з визначеним R_f, поміщали у сцинтиляційні флакони, заливали 10 см³ ксилільно-

спиртового сцинтилятора та визначали вміст радіоактивності на рідинному сцинтиляційному фотометрі TRI CARB Canberra PACKARD 2700. Вміст радіоактивності (у % від загальної кількості на радіохроматограмі) та радіохроматографічну чистоту зразку розраховували за формулою:

$$PX = \frac{a_i - a_{bg}}{\sum (a - a_{bg})} 100\% ,$$

де: PX – радіохроматографічна чистота (відсоток вмісту радіоактивного матеріалу у кожній фракції); a_i – активність кожної окремої фракції, імп/хв; a_{bg} – активність фону, імп/хв.

Отримані дані оброблені за допомогою статистичного пакету програм MS Excel.

Обговорення результатів

Введення радіоактивної мітки (^{14}C) у молекулу етоксоzepаму було здійснено за допомогою ^{14}C -етилового спирту шляхом конденсації 7-бром-5-феніл-3-хлор-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону, що аналогічно введенню радіоактивно мічених замісників до сформованого скелету 1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону [6, 7].

Фізико-хімічні властивості отриманого зразку ^{14}C -етоксоzepаму відповідають аналогічним показникам нерадіоактивної сполуки:

$T_{\text{топл}}$ 218–222 °С. В ІЧ спектрах, що записані у таблетках КВг реєструються смуги поглинання, що відповідають коливанням N-H зв'язку асоційованої амідної групи при 3173 cm^{-1} , ароматичних C – H зв'язків при 3106 cm^{-1} , C=O зв'язку при 1702 cm^{-1} , та C=N зв'язку при 1604 cm^{-1} (рис. 1).

У спектрах ^1H -ЯМР в області 3,66–4,08 мд спостерігаються сигнали двох нееквівалентних протонів α -CH₂-групи у третьому положенні бенздіазепінового циклу (рис. 2). Імовірна причина нееквівалентності даних протонів полягає у впливу інверсії бенздіазепінового циклу на дані протони.

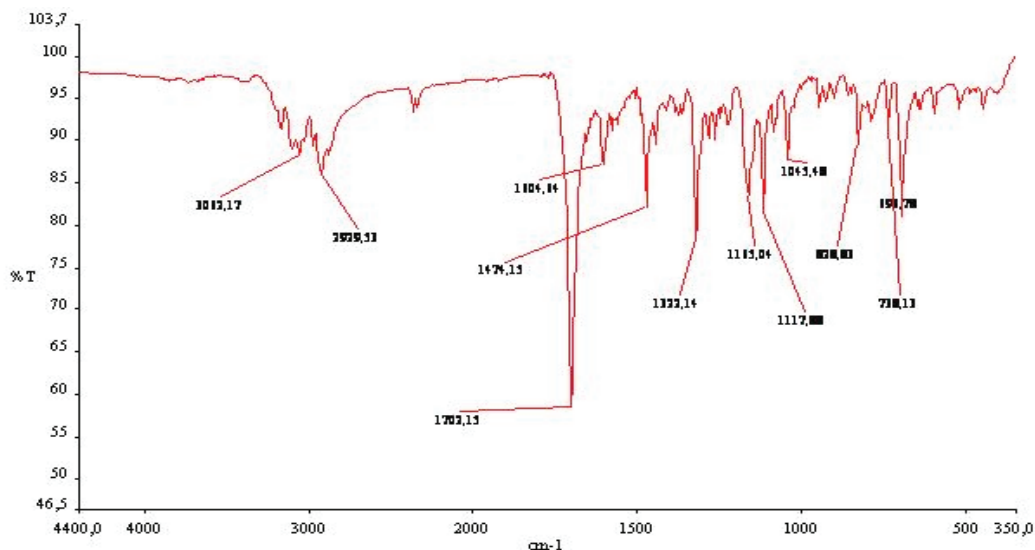


Рис. 1. ІЧ – спектр етоксоzepаму (у таблетках КВг)

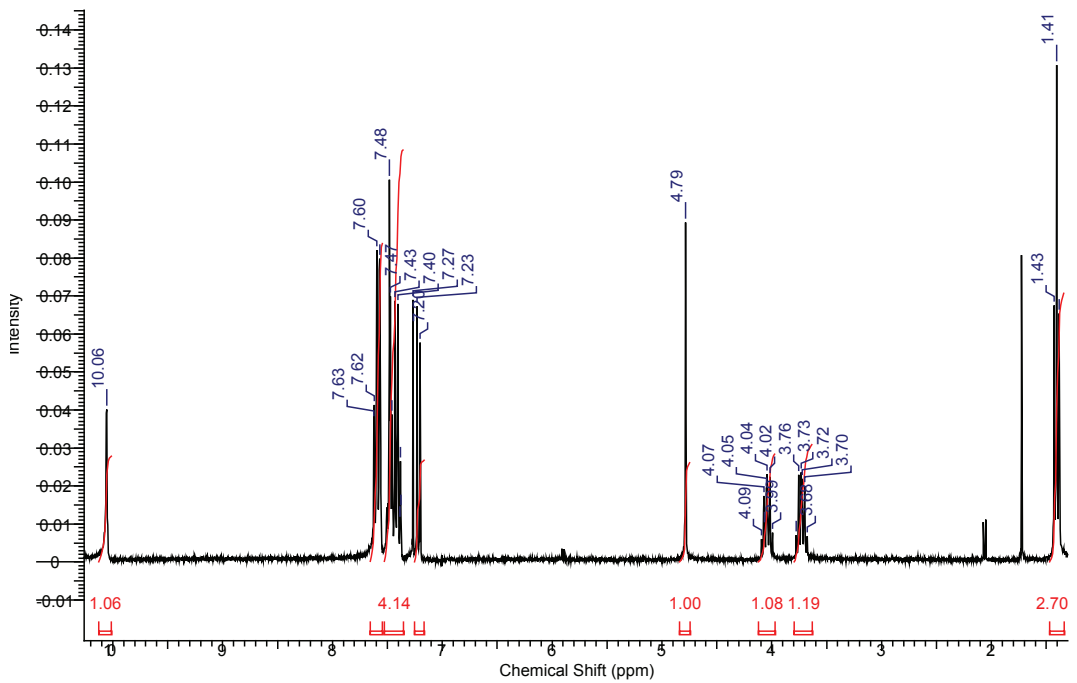
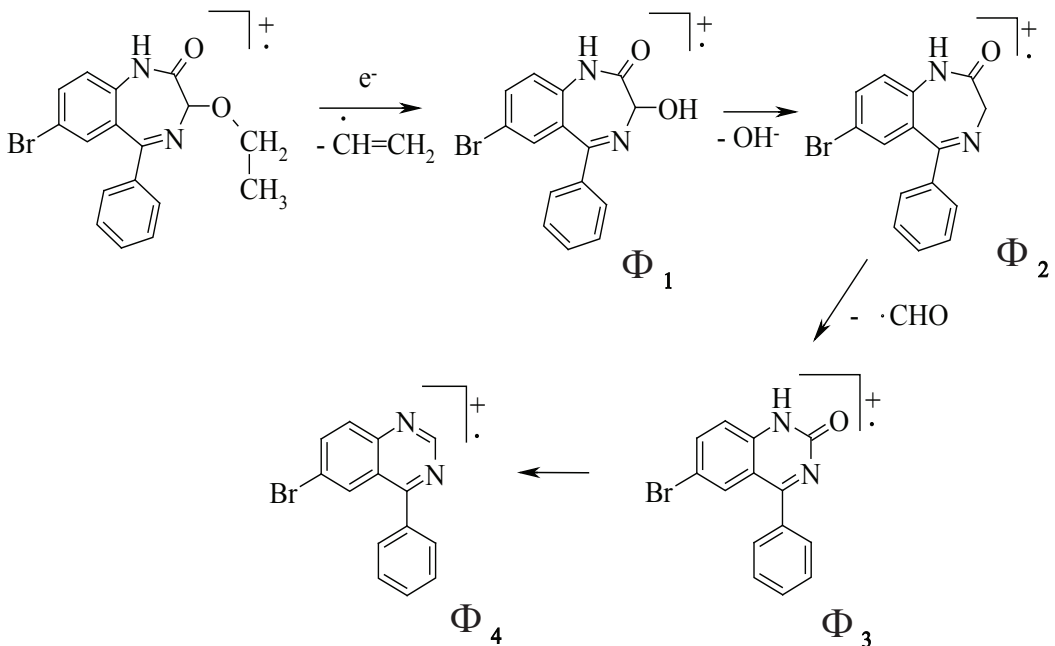


Рис. 2. ^1H -ЯМР-спектр етоксоzepаму (CDCl_3 , 300 МГц)

У мас-спектрі 7-бром-5-феніл-3-етокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону, що отриманий за методом електронного удару, присутній малоінтенсивний пік молекулярного іону (рис 3) з EI-MS m/z 358 [M^+].

Вірогідна схема фрагментації етоксоzepаму охоплює стадії послідовного відщеплення етильного радикалу з міграцією протону на атом кисню (Φ_1), відщепленням гідроксильної групи (Φ_2), розщеплення бенздіазепінового циклу (Φ_3), яке викликане елімінацією CHO -радикалу, та утворення молекулярного іону хіназоліну Φ_4 за схемою:



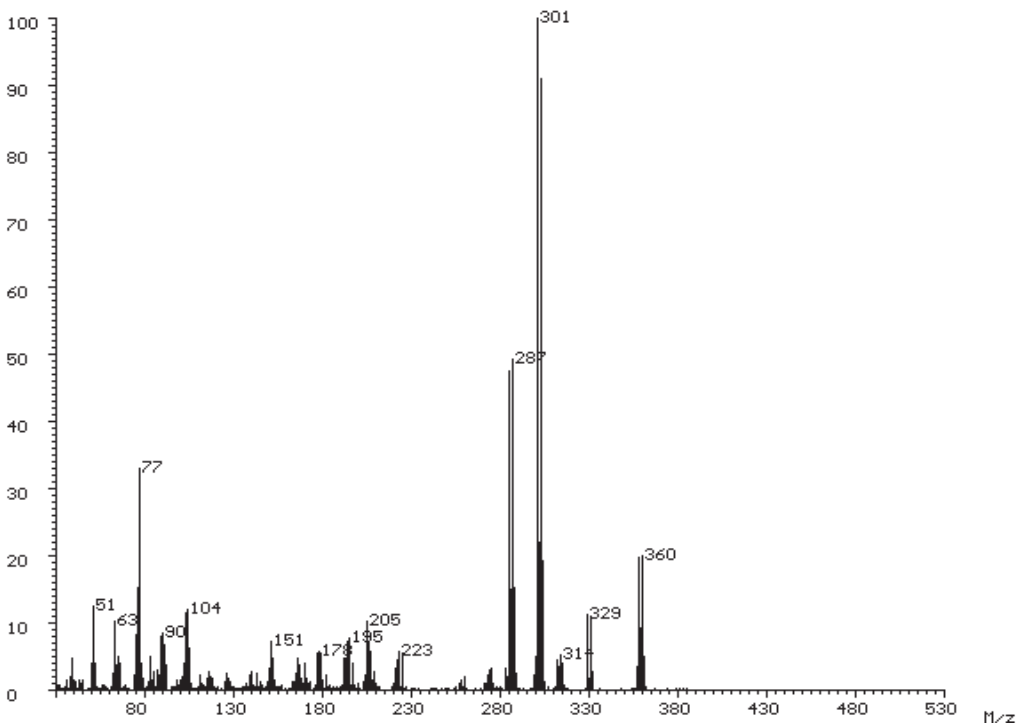


Рис. 3. Мас-спектр етоксозепаму, що отриманий методом електронного удару.

Для визначення питомої активності отриманого зразку ^{14}C -етоксозепаму готували розчин сполуки у етиловому спирту, різні об'єми якого (у перерахунку на речовину від 10 до 100 мкг, 10 паралелей) переносили до сцинтиляційних флаконів та визначали вміст радіоактивності у кожній пробі. З наведених даних помітно (табл. 1), що у вказаному діапазоні концентрацій радіоактивного матеріалу спостерігається лінійна кореляція між кількістю радіоактивного препарату та реєстрацією сцинтиляцій.

Т а б л и ц я

Визначення питомої активності зразку ^{14}C -етоксозепаму

Внесено, мкг	Активність, імп/хв	Питома активність, Кю/моль
11,6	1477 ± 76	0,206
23,2	2815 ± 49	0,196
34,8	4236 ± 47	0,197
46,4	5593 ± 57	0,195
58	7096 ± 55	0,198
69,6	8619 ± 79	0,200
81,2	9815 ± 106	0,196
92,8	11109 ± 169	0,194
104,4	13001 ± 207	0,202
116	14356 ± 256	0,200
Середнє		0,199 ± 0,001

Відсутність гасіння та висока ефективність рахунку дозволяють лінійно визначати вміст речовини у пробах. Питома активність зразку складає $0,199 \pm 0,001$ Кю/моль ($0,7$ МБк/моль), що є достатньою для проведення досліджень з фармакокінетики на тваринах.

Для визначення радіохроматографічної чистоти зразок ^{14}C -етоксозепаму хрома-

тографували в умовах майбутніх умов хроматографування екстрактів з біологічного матеріалу. Попереднє хроматографування у чотирьоххлористому вуглеці у такому випадку необхідно для видалення коекстрактивних речовин (пігменти, ліпіди тощо), що можуть погіршувати розділення сполуки та її можливих метаболітів. У випадку вихідної сполуки це необхідно для визначення її можливої рухомості з коекстрактивними речовинами.

Радіохроматограма зразку ^{14}C -етоксозепаму (рис. 4) містить лише один пік радіоактивності, R_f якого відповідає нерадіоактивній речовині, а відносна кількість якого складає 96,2 % від загальної кількості радіоактивного матеріалу на хроматограмі.

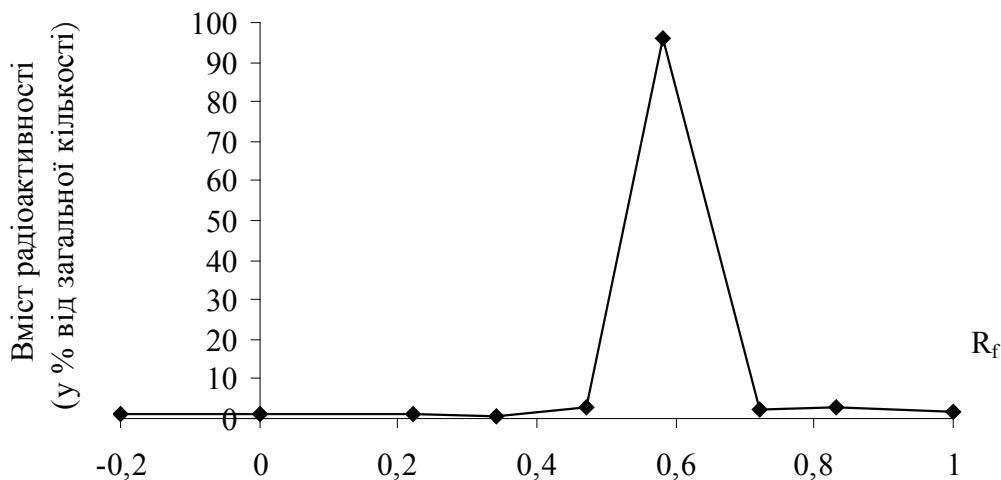


Рис. 4. Радіохроматограма зразку ^{14}C -етоксозепаму

Інші фракції, включаючи частину радіохроматограми, що оброблена чотирьоххлористим вуглецем, не містять значної кількості радіоактивних продуктів, що свідчить про високу радіохроматографічну чистоту отриманого зразку ^{14}C -етоксозепаму та відсутність його рухливості у неполярному елюенті (CCl_4), що є важливим у разі проведення фармакокінетичних досліджень.

В и с н о в к и

У роботі було синтезовано мічений зразок ^{14}C -етоксозепаму взаємодією 7-бром-5-феніл-3-хлор-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону з $2[^{14}\text{C}]$ - етиловим спиртом. За встановленими фізико-хімічними параметрами ($T_{\text{топл}}$, ІЧ-, ^1H -ЯМР- та мас-спектри) отримана сполука, ідентична стандартному зразку. Визначені радіохроматографічні показники сполуки склали: питома активність сполуки $0,199 \pm 0,001$ Кю/моль ($0,7$ МБк/моль), та радіохроматографічна чистота – 96,2 %.

1. Головенко Н.Я., Жук О.В., Зиньковский В.Г. и др. Расчеты фармакокинетических параметров лекарственных средств (линейные частевые модели). Методические рекомендации. – Киев. – Авицена, 2003. – 20 с.

2. Головенко Н.Я., Зиньковский В.Г., Якубовская Л.Н. Синтез меченных радиоактивными изотопами производных 1,4-бенздиазепина и установление структуры их метаболитов // Укр. хим. журн. – 1999. – Т.65, №9. – С. 34-44.

3. Чадр Г. Радиоиммунологические методы. М.: Мир, 1981. – 246 с.

4. Созинов В.А., Руденко О.П., Головенко Н.Я. и др. Синтез и корреляция между строением и фармакологической активностью производных 1,3-дигидро-2Н-1,4-бенздиазепин-2-она. // Хим.-фарм. журн. – 1984. - №10. – С. 67 – 71.

5. Вешурова О.Н., Колиновская Г.Я., Таханаев А.А. и др. Введение тритиевой метки в алкалоиды методом гетерогенного каталитического обмена. В кн. Биологически активные соединения, меченные радиоактивными изотопами. М.: Медицина, 1985. – С. 14 – 15.

6. Головенко Н.Я., Преподобная Е.В. Фармако-токсикологическая характеристика гидазепама и его метаболитов. // Современные проблемы фармакологии и токсикологии. – 2007. – № 4. – С. 41 – 44.

7. Синтез ^{14}C -гідазепаму та його потенційних метаболітів. / М.Я.Головенко, В.І.Павловський, К.В.Преподобна, В.Б.Ларіонов, К.О.Семенішина // Ukrainica Bioorganica ACTA. – 2007. – С. 20 – 23.

Надійшла до редакції 21.12.2011.

V. I. Pavlovskiy, E. A. Semenishina, V. B. Larionov, N. A. Zhukova

СИНТЕЗ ^{14}C -ЭТОКСОЗЕПАМА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕГО ОСНОВНЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И РАДИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

Ключевые слова: радиоактивно меченные соединения, производные 1,4-бенздиазепина, ^{14}C -этоксозепам

Целью работы был синтез, идентификация и определение радиохимических характеристик 3-этокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она.

Меченое изотопом ^{14}C соединение (^{14}C -этоксозепам) было получено взаимодействием 7-бром-5-фенил-3-хлор-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она с $2[^{14}\text{C}]$ - этиловым спиртом. Его физико-химические показатели ($T_{\text{пл}}$, ИК-, ^1H -ЯМР- и масс-спектры) соответствуют стандартному образцу.

Удельная активность образца составила $0,199 \pm 0,001$ Кю/моль ($0,7$ МБк/моль), а радиохроматографическая чистота – $96,2\%$.

V. I. Pavlovsky, E. A. Semenishina, V. B. Larionov, N. A. Zhukova

THE SYNTHESIS OF ^{14}C -ETOXOZEPAM AD DETERMINATION OF IT'S MAIN PHYSICO-CHEMICAL AND RADIOCHEMICAL PROPERTIES

Key words: radioactive labeled compounds, 1,4-benzodiazepine derivatives, ^{14}C -etoxozepam

The aim of this work was synthesis, identification and radiochemical characterization of 3-ethoxy-7-bromo-5phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one.

The ^{14}C -labeled compound (^{14}C -etoxozepam) was synthesized from 7-bromo-5-phenyl-3-chloro-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one with $2[^{14}\text{C}]$ – ethyl alcohol. The physics chemical constants (T_{melt} , IR-, ^1H -NMR- and mass-spectra) are identical to the standard sample.

The specific activity of the sample is $0,199 \pm 0,001$ Cu/mol ($0,7$ MBk/mol), and radiochromatographic purity – $96,2\%$.